



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-  
LOGÍA Y MATERIALES

DISEÑO DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO ASISTIDO DE BIOPELÍCULAS PARA  
LA REMOCIÓN DE PCBS EN AGUAS RESIDUALES

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

DANIELA BEATRIZ DUEÑAS ISRAEL

PROFESOR GUÍA:  
MARÍA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ANA PRIETO SANTA  
ALVARO OLIVERA NAPPA

SANTIAGO DE CHILE

2019

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: DANIELA BEATRIZ DUEÑAS ISRAEL  
FECHA: SEPTIEMBRE 2019  
PROF. GUÍA: MARÍA LIENQUEO CONTRERAS

## DISEÑO DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO ASISTIDO DE BIOPELÍCULAS PARA LA REMOCIÓN DE PCBS EN AGUAS RESIDUALES

Los policlorobifenilos son un compuesto orgánico persistente altamente tóxico y difícil de degradar. Debido a sus características fisicoquímicas suelen acumularse en sedimentos y tejidos grasos, sin embargo, su ingreso al medio ambiente está dado principalmente por el aire y el agua. A través de estas vías llegan finalmente a las plantas de tratamiento de aguas residuales, donde pueden reincorporarse a ríos y mares o bien pasar a formar parte de los biosólidos, lo cual permite su ingreso a la cadena alimenticia.

Su uso y producción se encuentra regulado por el Convenio de Estocolmo, el cual prohíbe la producción y promueve el desuso de artefactos que aún lo contengan. Dado que Chile se encuentra adscrito a este convenio, se hace necesario buscar formas de tratamiento que permitan removerlo de forma definitiva del ambiente.

Una de las técnicas utilizadas para el tratamiento de PCBs en aguas residuales corresponde al uso de biopelículas para su degradación. Este trabajo busca diseñar un sistema de tratamiento que permita remover PCBs de las aguas residuales mediante biopelículas de *Burkholderia xenovorans*. Para esto se estudia tanto el crecimiento de la biopelícula en carbón activo, biochar de pino y *carriers* de PLA, como la remoción de bifenilo lograda con cada uno. Se realiza además el diseño conceptual de un reactor de biopelícula de lecho móvil, utilizando como caso de estudio una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Santiago.

Se tiene que el crecimiento de las bacterias es mayor en adherencia al material soporte, logrando concentraciones mayores a las que se tienen en suspensión en todos los casos. Particularmente se tienen concentraciones de  $1,04 \times 10^{10}$  [UFC/mL] para el crecimiento en carbón activo,  $8,07 \times 10^9$  [UFC/mL] para biochar de pino y  $7,72 \times 10^9$  [UFC/mL] para *carriers* de PLA.

Se logran remover un 99,99% de bifenilo con biopelícula creciendo tanto en *carriers* de PLA como en biochar de pino y un 99,90% creciendo en carbón activo. En todos los casos se tiene una mayor remoción al utilizar la biopelícula versus la bacteria en suspensión y el material soporte por sí solo.

Utilizando los porcentajes de remoción anteriores y datos de planta de tratamiento, se diseñan reactores de 6,12 [L] usando *carriers* de PLA, 7,73 [L] usando carbón activo y 9,99 [L] utilizando biochar de pino como soporte de crecimiento.

A partir de estos resultados es posible concluir que la remoción de bifenilo mediante biopelículas de *Burkholderia xenovorans* es factible para todos los soportes probados, sin embargo se requieren pruebas adicionales para comprobar su factibilidad a escala industrial.



# Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la profesora Ana Lucía Prieto por permitirme trabajar en este proyecto y confiarme su desarrollo. Me gustaría agradecer a los miembros de la comisión, María Elena Lienqueo y Álvaro Olivera, por sus comentarios y apoyo durante este proceso.

A Bruno Grossi y su equipo en FabLab por su ayuda en la confección de los *carriers* utilizados en este proyecto. A Mercedes Becerra y Diego Pino del laboratorio de Química Analítica por su buena disposición y apoyo en el desarrollo del método de medición de bifenilo. Sin su contribución este trabajo no hubiese sido posible.

A mis compañeros y amigos de la carrera, gracias por acompañarme y hacer de este paso por la universidad el mejor posible. A Franco, Fran, Vicho y Claudio, gracias por todas las noches de juegos (aunque cada vez nos de sueño antes) y por los apañes durante esas ventanas largas.. todavía me deben ese completo gigante. A Lorna, Quemus, Veliz, Dani, Jose y Benja, gracias por mejorar mis tardes de estudio y por todas esas conversaciones a la hora de almuerzo.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por su cariño y su preocupación, sobretodo durante esta última etapa intensa. Gracias por su interés en lo que hago, aunque todavía no lo entiendan muy bien.

A Felipe, gracias por tu amor y apañe durante estos 6 años. Estoy demasiado agradecida de tenerte en mi vida, realmente no hubiese sido lo mismo sin ti.



# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes Generales y Motivación . . . . .	1
1.2. Objetivos . . . . .	2
1.2.1. Objetivo general . . . . .	2
1.2.2. Objetivos específicos . . . . .	2
1.3. Marco Teórico . . . . .	2
1.3.1. Policlorobifenilos . . . . .	2
1.3.2. Métodos de tratamiento . . . . .	4
1.3.3. <i>Burkholderia Xenovorans</i> . . . . .	6
1.3.4. Reactor de biopelícula de lecho móvil . . . . .	6
<b>2. Metodología</b>	<b>10</b>
2.1. Crecimiento bacteriano . . . . .	10
2.1.1. Cinética de crecimiento . . . . .	10
2.1.2. Caracterización biopelícula . . . . .	11
2.2. Remoción de bifenilo . . . . .	11
2.2.1. Medición concentración bifenilo . . . . .	11
2.2.2. Experimentos de adsorción . . . . .	11
2.2.3. Porcentaje de remoción . . . . .	12
2.3. Diseño reactor . . . . .	12
<b>3. Resultados y discusiones</b>	<b>14</b>
3.1. Determinación de la concentración de bifenilo en el medio . . . . .	14
3.2. Experimentos de adsorción . . . . .	15
3.2.1. Cinética de adsorción de bifenilo en distintos materiales soporte . . . . .	15
3.2.2. Isotermas de adsorción . . . . .	16
3.3. Crecimiento de biopelícula . . . . .	17
3.3.1. Cinética de crecimiento de <i>Burkholderia Xenovorans</i> . . . . .	17
3.3.2. Caracterización de biopelícula de <i>Burkholderia Xenovorans</i> . . . . .	19
3.4. Remoción bifenilo . . . . .	22
3.5. Diseño reactor de biopelícula de lecho móvil . . . . .	23
3.5.1. Parámetros relevantes . . . . .	23
3.5.2. Dimensionamiento . . . . .	25
3.5.3. Análisis de sensibilidad . . . . .	26
<b>4. Conclusión y Recomendaciones</b>	<b>29</b>

<b>Bibliografía</b>	<b>29</b>
<b>Anexos</b>	<b>35</b>
A. Metabolismo de bifenilo por cepa LB400 . . . . .	35
B. Medio mínimo M9 . . . . .	36
B.1. Medio líquido . . . . .	36
B.2. Medio sólido . . . . .	36
C. Curva de calibración . . . . .	37
D. Cálculo biopelícula total adherida a cada material soporte . . . . .	37
E. Cálculo área superficial específica . . . . .	38
F. Cálculo dimensionamiento MBBR . . . . .	39

# Índice de Tablas

1.1. Carriers producidos por AnoxKaldnes . . . . .	8
3.1. Resumen adsorción máxima de bifenilo lograda por cada material y el tiempo que se requiere para alcanzar esta adsorción . . . . .	15
3.2. Parámetros de isoterma de adsorción para ajustes de Langmuir y Freundlich . . . . .	17
3.3. Crecimiento total máximo de <i>B. Xenovorans</i> logrado en promedio para cada material soporte . . . . .	19
3.4. Análisis elemental de la película de <i>B. Xenovorans</i> creciendo en carbón activo en comparación al material sin biopelícula . . . . .	21
3.5. Análisis elemental de la película de <i>B. Xenovorans</i> creciendo en biochar de pino en comparación al material sin biopelícula . . . . .	22
3.6. Análisis elemental de la película de <i>B. Xenovorans</i> creciendo en <i>carrier</i> de PLA en comparación al material sin biopelícula . . . . .	22
3.7. Concentración de PCBs en distintas plantas de tratamiento . . . . .	24
3.8. Áreas superficiales específicas de los materiales utilizados . . . . .	25
3.9. Rangos de SARF utilizados para distintos procesos de remoción mediante MBBR . . . . .	25
3.10. Dimensionamiento MBBR para los distintos soportes . . . . .	25
3.11. Análisis de sensibilidad para el porcentaje de remoción de bifenilo . . . . .	26
3.12. Análisis de sensibilidad para la concentración de entrada de bifenilo . . . . .	27
3.13. Análisis de sensibilidad para el flujo de entrada . . . . .	28
3.14. Análisis de sensibilidad para el porcentaje de llenado de carriers . . . . .	28
A.1. Preparación de sales medio mínimo M9 concentrado . . . . .	36
A.2. Preparación de sales medio mínimo M9 . . . . .	36
A.3. Valores obtenidos para la curva de calibración . . . . .	37
A.4. Peso muestras carbón activo con biopelícula en triplicado . . . . .	38
A.5. Peso muestras biochar de pino con biopelícula en triplicado . . . . .	38
A.6. Datos utilizados para calcular áreas superficiales . . . . .	39
A.7. Variables y valores utilizados para dimensionar reactor con carbón activo como soporte . . . . .	39



# Índice de Ilustraciones

1.1.	Estructura molecular general de un congénere . . . . .	2
1.2.	Fuentes de ingreso y movimiento de PCBs en el medio ambiente [1] . . . . .	3
1.3.	Toneladas totales de aceites dieléctricos con PCBs declaradas por región . . . . .	4
1.4.	Mezclado en reactores de biopelícula de lecho móvil. En el caso aeróbico el movimiento es causado por la aireación mientras que en el anaerobio se usan mezcladores mecánicos. [2] . . . . .	7
1.5.	Carriers K1, K2 y K3 producidos de forma comercial [3] . . . . .	8
3.1.	Curva de calibración de bifenilo por espectroscopia de fluorescencia, análisis en triplicado . . . . .	14
3.2.	Cinética de adsorción para distintos materiales soportes y sus respectivos ajustes. Análisis en duplicado . . . . .	15
3.3.	Curvas de adsorción para distintos adsorbentes y sus respectivos ajustes. Análisis en duplicado . . . . .	16
3.4.	Crecimiento de LB400 en suspensión . . . . .	17
3.5.	Curvas de crecimiento de <i>B. Xenovorans</i> en disitintos soportes en comparación al crecimiento logrado suspensión . . . . .	18
3.6.	Crecimiento total de LB400 en biopelícula . . . . .	19
3.7.	Imágenes obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido para los distintos materiales usados como soporte, en su forma estéril y con <i>B.Xenovorans</i> formando biopelícula. (Las figuras presentan distintos aumentos) . . . . .	20
3.8.	Análisis elemental de biopelícula de <i>B. Xenovorans</i> en distintos materiales soportes . . . . .	21
3.9.	Porcentaje de remoción de bifenilo logrado en distintas configuraciones y mediante distintos materiales . . . . .	22
3.10.	Diagrama de línea de aguas en planta Mapocho incorporando tratamiento de PCBs . . . . .	24
A.1.	Ruta metabólica <i>bhp</i> [4] . . . . .	35

# Capítulo 1 : Introducción

## 1.1. Antecedentes Generales y Motivación

En las últimas décadas ha existido un gran interés por estudiar y comprender los efectos adversos provocados por contaminantes peligrosos en la salud y el medio ambiente. Del mismo modo, ha aumentado la preocupación por la correcta disposición de estos contaminantes y su tratamiento, para así evitar posibles consecuencias. [5, 6] Se ha tenido particular interés en los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) dada su alta estabilidad y su capacidad de ingresar a la cadena alimenticia y acumularse en los tejidos grasos, donde pueden causar problemas incluso a muy bajas concentraciones. [7]

Los policlorobifenilos (PCBs) son un COP de gran relevancia, dado el alto impacto que tienen sobre el medio ambiente y su alta toxicidad en animales y humanos. Esto ha llevado a desarrollar diversos métodos de tratamiento para removerlos de las aguas residuales de forma limpia y costo-efectiva, dentro de las cuales se encuentra la bioremediación. [8]

Si bien las comunidades bacterianas son capaces de degradar los contaminantes en su forma nativa, las velocidades de degradación no son lo suficientemente rápidas como para disminuir la concentración de contaminantes de forma considerable. En este contexto el uso de biopelículas ha atraído bastante interés, dada las ventajas que muestra en cuanto a la protección de los microorganismos y aumento de velocidades de conversión. [9, 10]

Para el tratamiento de altos volúmenes de aguas residuales se han utilizado distintos tipos de reactores de biopelículas. Estos se han utilizado tanto para el tratamiento de aguas municipales como industriales, puesto que requieren menos espacio que los reactores de lodos activados y el tratamiento no es dependiente de la separación de lodos. [2, 11]

Dado que Chile se encuentra suscrito al Convenio de Estocolmo, en el cual se busca proteger a los humanos y al medio ambiente de los contaminantes orgánicos persistentes, se deben implementar mecanismos para lograr una gestión ambiental racional de PCBs para el año 2028. Particularmente, se deben realizar esfuerzos decididos para gestionar aquellos residuos que contengan más de un 0,005% de PCBs. [6, 12]

A partir de lo anterior nace la idea de implementar nuevos métodos de tratamiento de PCBs en Chile. Este trabajo busca estudiar el tratamiento mediante la bioremediación con biopelículas de *Burkholderia xenovorans*, utilizando como superficies de crecimiento carbón activo, biochar de pino y carriers de ácido poliláctico (PLA) generados mediante impresión 3D. Se estudia esta forma de tratamiento con la intención de utilizar reactores de biopelícula en plantas de tratamiento de aguas residuales.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

Diseñar un proceso *sidestream* de tratamiento utilizando biopelículas para la remoción de PCBs en planta.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Analizar crecimiento de biopelículas de *Burkholderia xenovorans* en distintos soportes
- Analizar remoción de bifenil por medio de biopelículas de *Burkholderia xenovorans* en distintos soportes
- Diseñar conceptualmente un sistema de tratamiento de PCBs basado en un reactor de biopelícula de lecho móvil

## 1.3. Marco Teórico

### 1.3.1. Policlorobifenilos

Los PCBs son compuestos orgánicos sintéticos ampliamente utilizados en la industria. Consisten en anillos fenólicos unidos desde uno a diez átomos de cloro, existiendo 209 posibles configuraciones o congéneres. En la Figura 1.1 se muestra la estructura general de un congénere.

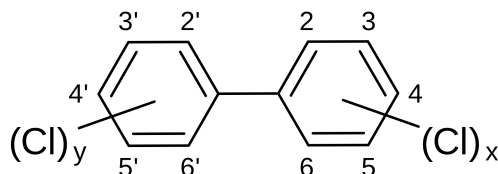


Figura 1.1: Estructura molecular general de un congénere

La fórmula molecular de los PCBs corresponde a  $C_{12}H_{10-(x+y)}Cl_{x+y}$  siendo x e y el número de átomos de cloro unidos a cada anillo fenil respectivamente, donde la suma de ellos debe ser menor o igual a 10. El grado de cloración de los distintos congéneres afecta sus propiedades. [1, 13]

Las propiedades características de los PCBs corresponden a una alta hidrofobicidad, baja presión de vapor y alta resistencia a la degradación química. Además de una baja conductividad eléctrica y alta conductividad térmica. Estas propiedades les han permitido ser utilizados como dieléctricos y líquidos aislantes en capacitores y transistores. [13, 14]

Las propiedades de los PCBs lo hacen ser persistente en el medio ambiente, siendo difícil su degradación. Suelen acumularse en sedimentos y tejidos grasos, donde son más afines. [14]

Dado lo anterior se clasifican como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), y como tal su producción y uso están regulados por la Convención de Estocolmo. En esta se busca

proteger a la salud humana y al medio ambiente de los efectos tóxicos de los COP, por lo que se prohíbe la producción de PCBs y se propone una serie de acciones para promover su desuso progresivo. [12, 15] Se han reportado diversos efectos debido a la exposición de PCBs tanto en animales como humanos. Su toxicidad suele aumentar según el grado de cloración, los PCBs más clorados son tóxicos solamente debido a su presencia en los tejidos, mientras que aquellos menos clorados pueden ser tóxicos debido a su participación en el metabolismo. [16]

La agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) clasifica a los PCBs como *probablemente carcinógeno para humanos*, afectando principalmente al hígado, tracto biliar y probablemente al cerebro. [13] Además se han reportado efectos en la piel, hígado, desarrollo de bronquitis crónica, inmunodeficiencia y efectos hormonales. Esto último se debe a la estructura de los PCBs, los cuales pueden reemplazar a las hormonas de la tiroides en sus sitios de reconocimiento, siendo potencialmente peligrosa la exposición a PCBs durante periodos de desarrollo [13, 17]

Si bien el uso de PCBs ha disminuido desde la promulgación del Convenio de Estocolmo, estos siguen estando presente en el ambiente. Dada su afinidad por material orgánico se bioacumulan en la cadena alimenticia, además de liberarse a la atmósfera por la incineración o mala disposición de equipos que contienen PCBs. Al liberarse al ambiente pueden transportarse a través del aire o el agua, llegando finalmente a las plantas de tratamiento, donde pueden reincorporarse a ríos o mares, o bien pasar a ser parte de los bio-sólidos e ingresar a la cadena alimenticia cuando estos son utilizados como fertilizantes. [18] En la figura 1.2 se muestran estas vías de ingreso de los PCBs al ambiente, y se puede notar el posible rol de las plantas de tratamiento de aguas como punto de remoción de los PCBs del ambiente

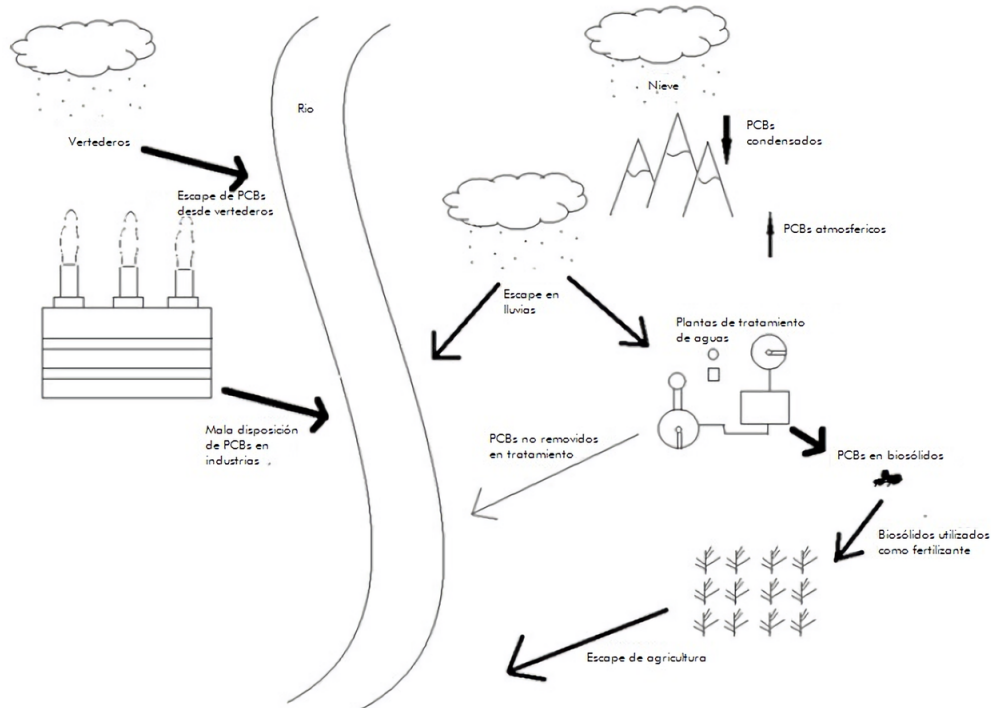


Figura 1.2: Fuentes de ingreso y movimiento de PCBs en el medio ambiente [1]

En Chile se han utilizado los PCBs durante los últimos 50 años. A pesar de haberse prohibido su uso al adscribirse al Convenio de Estocolmo, se ha encontrado la presencia de este contaminante tanto en los suelos, vegetación, animales y aire. [19]

En 2004 se realizó el Inventario Nacional de PCBs, donde se consideraron únicamente los equipos que utilizan este compuesto, como transformadores y dieléctricos. Se realizaron encuestas a las empresas usuarias para diferenciar entre los equipos en uso y aquellos en almacenamiento o dados de baja, dando como resultado la presencia de alrededor de 700 toneladas de PCBs a lo largo del país, donde un 46 % se encuentra en uso. Cabe destacar que se entrevistó a empresas de los rubros mineros, industriales, energéticos y petroquímicos, dado su alto consumo energético. En la Figura 1.3 es posible observar la distribución de PCBs por región. [19]

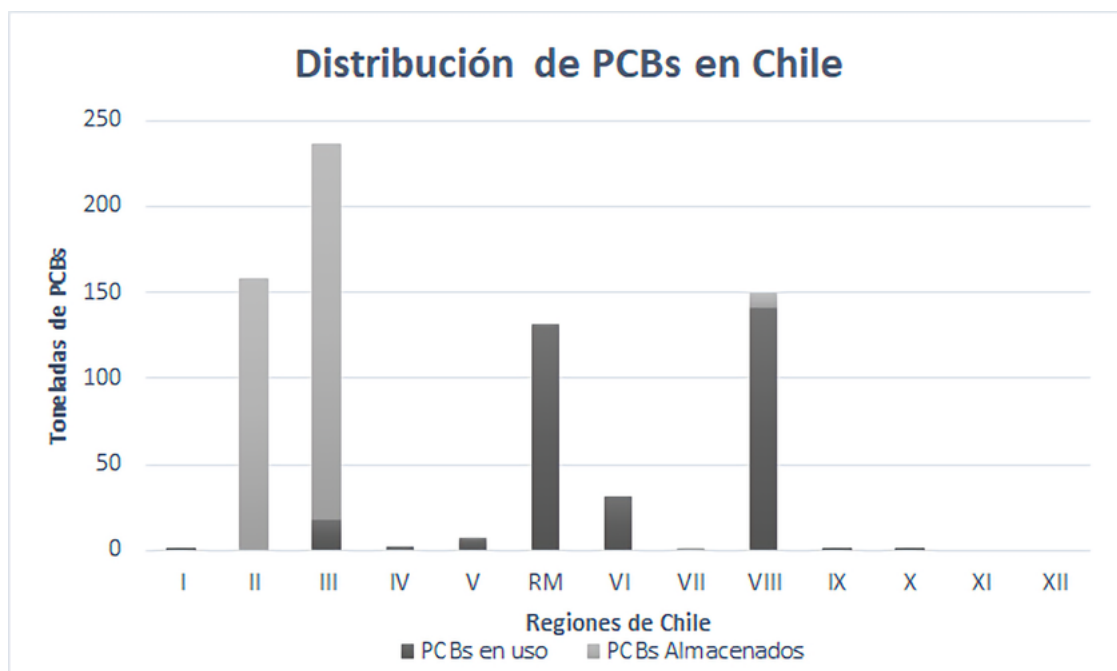


Figura 1.3: Toneladas totales de aceites dieléctricos con PCBs declaradas por región

### 1.3.2. Métodos de tratamiento

**Incineración** La incineración de PCBs es una técnica de tratamiento establecida a nivel industrial y ampliamente utilizada. En Estados Unidos esta técnica es la más usada debido a regulaciones ambientales: el Código de Regulaciones Federales indica la obligatoriedad de incinerar muestras contaminadas de más de 500 ppm de PCBs. [20, 21] Para una eliminación efectiva de PCBs mediante esta técnica, se recomienda incinerar durante 2 segundos a 1100°C, con un 3 % de oxígeno en exceso. [22]

**Métodos químicos** Este tipo de tratamiento busca bajar la toxicidad de los PCBs mediante el reemplazo progresivo de los cloros. Para un tratamiento efectivo se necesitan además altas temperaturas y presiones. [18, 23] Suelen utilizarse metales de baja valencia en soluciones

de alcohol, donde el magnesio es el más utilizado, o bien reactivos como los polietilenos glicolatos de metal alcalino, los cuales se producen mediante derivados del sodio o potasio. [22, 23] Si bien estas tecnologías permiten remover del orden del 99 % de los PCBs presentes en los sólidos, estas tienen un alto impacto dadas las altas temperaturas y condiciones ácidas utilizadas. [18, 20, 22]

**Tratamientos térmicos** Las microondas pueden utilizarse para tratar sedimentos contaminados con PCBs, puesto que estas ondas son ciegas a los componentes comunes del suelo y se concentran en los contaminantes presentes. [20] Se ha demostrado que el tratamiento térmico puede ser muy eficaz, logrando la remoción de entre el 90 y 95 % de PCBs en sedimentos, sin embargo, las condiciones de operación son fundamentales puesto que a bajas temperaturas se forman dioxinas, mientras que la descomposición se logra entre 300 y 600°C. [20, 23]

## Métodos biológicos

- (a) **Fitorremediación** La fitorremediación es una alternativa sustentable para el tratamiento de PCBs. En esta se utilizan plantas para extraer, secuestrar y detoxificar contaminantes desde los suelos. [18, 20] Este tratamiento se basa en la absorción de contaminantes por parte de las raíces de las plantas, para luego ser degradadas tanto por enzimas de la propia planta, como por microorganismos arraigados en las raíces. [20] Mediante esta técnica es posible degradar PCBs de baja cloración, puesto que los altamente clorados suelen ser resistentes a los procesos metabólicos [18]
- (b) **Bioremediación** La bioremediación es un método de tratamiento natural basado en el uso de microorganismos para degradar contaminantes. [18] En el caso de los PCBs se tienen dos posibles mecanismos de degradación: aerobios y anaerobios.

El tratamiento anaerobio permite degradar PCBs con un alto grado de cloración, logrando disminuir la toxicidad mediante la sustitución de cloros por hidrógeno. La de-cloración mediada por microorganismos suele centrarse en la remoción de cloros en las posiciones *meta* y *para*, dejando principalmente PCBs clorados en la posición *orto*. [18, 20, 24] El tratamiento aeróbico en cambio, logra degradar aquellos PCBs con bajo nivel de cloración, transformándolos en primer lugar en ácido clorobenzoico y degradándolos posteriormente a compuestos menos tóxicos. [18, 20]

Se han utilizado principalmente dos técnicas de bioremediación para la degradación de PCBs, la bioestimulación y la bioaumentación. La bioestimulación busca estimular la flora microbiana nativa, proporcionando las condiciones óptimas para que esta se desarrolle, mientras que la bioaumentación se refiere a la suplementación de la flora nativa, mediante la adición de bacterias o consorcios microbianos capaces de degradar el contaminante deseado. [18, 25]

Para la bioestimulación anaerobia se han utilizado compuestos aromáticos alogenados los cuales inducen genes relacionado con la de-cloración. Se ha demostrado también que la adición de hierro estimula el crecimiento de bacterias de-cloradoras de PCBs y disminuye la fase *lag* antes del inicio de este proceso, por lo que ha sido utilizado como

bioestimulante tanto como  $Fe^0$  como en  $FeSO_4$ . En el caso de los tratamientos aerobios, se utiliza principalmente bifenilos como bioestimulante puesto que puede inducir la degradación aeróbica de PCBs, sin embargo, también es posible utilizar oxígeno o surfactantes para estimular el tratamiento. [8, 18, 25]

En el caso de la bioaumentación se ha utilizado principalmente *Dehalobium chloro-coercia* DF1, la cual es capaz de intensificar la dechloración de PCBs en condiciones anaerobias. [8, 18] Para el tratamiento aeróbico en cambio, suelen utilizarse consorcios bacterianos de *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Rhodococcus* y *Bacillus* las cuales en conjunto son capaces de degradar un amplio rango de congéneres de PCBs. [18, 25]

Si bien la bioremediación permite remover PCBs de manera sustentable debido a su bajo impacto ambiental, existen diversas limitaciones con este tipo de tratamiento. La velocidad de remoción a escala industrial es bastante más lenta que la reportada para estudios a nivel de laboratorio, debido a restricciones en el transporte de masa. [26] Si bien la degradación puede mejorarse mediante las técnicas mencionadas anteriormente, existe un límite dado por la desorción del material orgánico desde los sedimentos. [20, 26]

Actualmente Chile no cuenta con incineradores o rellenos de seguridad para el tratamiento efectivo o disposición de PCBs. Dado que los volúmenes generados de este contaminante son bastante bajos, se requieren tecnologías de tratamiento que permitan eliminarlos de forma costo-efectiva. [6]

### 1.3.3. *Burkholderia Xenovorans*

La bacteria *Burkholderia Xenovorans* cepa LB400 ha sido una de las especies más estudiadas que poseen la capacidad de degradar PCBs, puesto que pueden degradar un amplio rango de congéneres. [27, 28] Esta bacteria Gram negativa y aeróbica se ha convertido en un modelo de estudio para la comprensión de la degradación aeróbica de PCBs. [29, 30]

La secuenciación del genoma de este organismo permitió identificar la presencia de al menos 11 vías centrales de degradación de compuestos aromáticos, dentro de las cuales se encuentra la ruta metabólica *bhp*, la cual permite degradar bifenilo. [29, 30] En la Figura A.1 se muestra esta ruta, la cual permite obtener piruvato y benzoato. (ver Anexo A)

La cepa LB400 es capaz de crecer con bifenilo como única fuente de carbono. Se ha logrado su crecimiento utilizando medio mínimo M9 como medio de cultivo y 5mM de bifenilo como fuente de carbono. [28]

### 1.3.4. Reactor de biopelícula de lecho móvil

Los reactores de biopelícula de lecho móvil (MBBR por sus siglas en inglés) son reactores continuos con una alta superficie específica de biopelícula. Esto se logra mediante el crecimiento de bacterias adheridas a *carriers* con alta área superficial. [2] Estos pueden funcionar tanto de forma aeróbica como anaerobia, cambiando únicamente el método de mezcla, como se observa en la Figura 1.4. [2, 31]

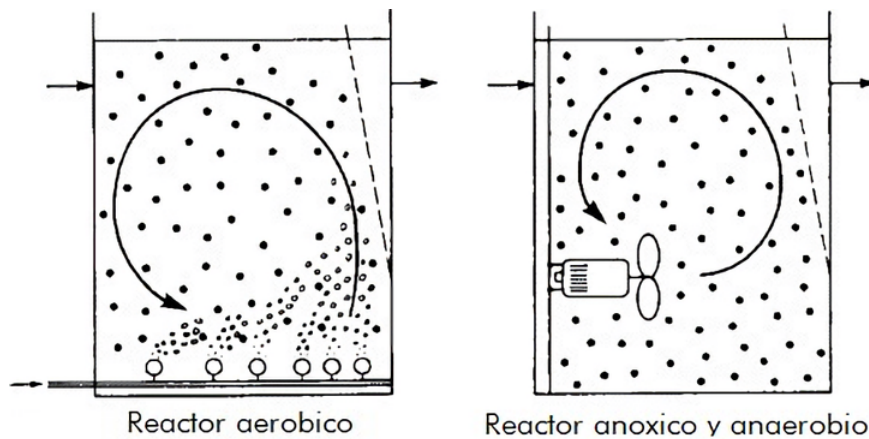


Figura 1.4: Mezclado en reactores de biopelícula de lecho móvil. En el caso aeróbico el movimiento es causado por la aireación mientras que en el anaeróbico se usan mezcladores mecánicos. [2]

Inicialmente los MBBR se diseñaron con la idea de remover nitrógeno de aguas residuales municipales, sin embargo desde entonces se han desarrollado aplicaciones tanto en tratamiento municipal como industrial. [2, 32] Se han utilizado a escala industrial en más de 50 países tanto para remover nitrógeno como materia orgánica soluble. [3, 31, 32]

Por otro lado los MBBR han sido utilizados para el tratamiento de distintos tipos de contaminantes peligrosos, particularmente ha sido satisfactorio su uso para la remoción de contaminantes orgánicos. Se ha demostrado la factibilidad de remoción de fenoles mediante MBBR en serie, utilizando una configuración anaerobio-aerobio. Del mismo modo, se ha logrado el post-tratamiento de pigmentos azoicos, donde MBBR en serie han sido utilizados para el tratamiento de aminas aromáticas, formadas durante la descomposición de estos pigmentos. [33–35]

Con respecto al tratamiento de PCBs mediante el uso de MBBR, se ha logrado remover al rededor de un 84 % de PCBs presentes en aguas residuales utilizando una configuración anaerobia-aerobia. Si bien los estudios realizados no han sido implementados a escala industrial, parece ser una buena alternativa de tratamiento. [35]

**Sistema de soporte: uso de carriers** El principio bajo el cual trabajan los MBBR corresponde a la inmovilización de biomasa en los *carriers*, de esta forma se logra un proceso continuo y se elimina la necesidad de recircular lodos. [3, 32] Para que el proceso funcione correctamente, es necesario mantener una alta proporción de biomasa activa en el reactor, con lo cual se hace relevante el material utilizado como superficie de soporte de la biopelícula [32]

Se requiere que el material utilizado como *carrier* permita el anclaje de microorganismos de forma estable y rápida, además de poseer una alta área superficial por unidad de volumen. [32, 36] En este contexto se han utilizado rocas, grava, arena, carbón activo y una amplia gama de plásticos y materiales sintéticos, dentro de los cuales se han utilizado *carriers* impresos en 3D. [3, 32, 37] En la Tabla 1.1 se muestra la información de diseño de alguno de los *carriers* producidos comercialmente por AnoxKaldes, quienes diseñaron el primer soporte utilizado para este tipo de tratamiento. [38] En la Figura 1.5 se observan los *carriers* anteriormente



nombrados.

Tabla 1.1: Carriers producidos por AnoxKaldnes

	Tipo de <i>carrier</i>		
	K1	K2	K3
Diámetro [mm]	9,1	15	25
Largo [mm]	7,2	15	12
Área superficial específica [ $m^2/m^3$ ]	500	350	500

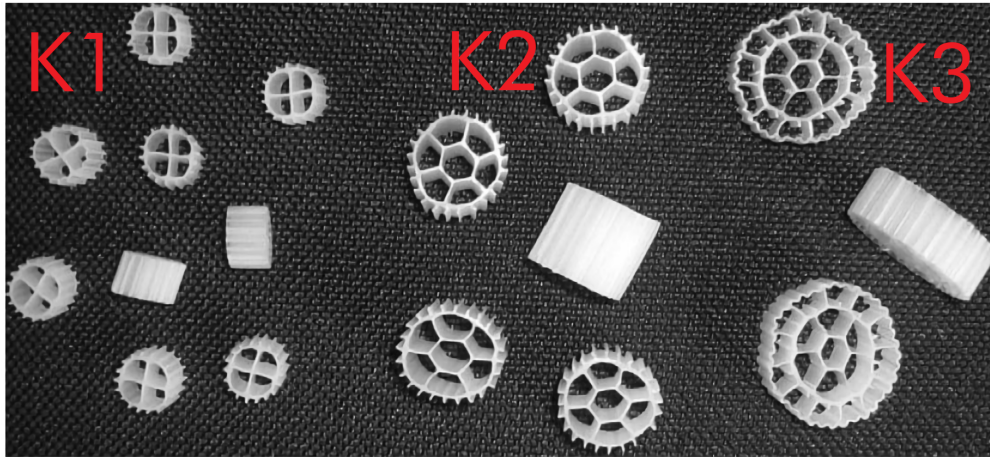


Figura 1.5: Carriers K1, K2 y K3 producidos de forma comercial [3]

**Operación y diseño** Una gran ventaja del MBBR es que la fracción de llenado del reactor ( $f$ ) con los *carriers* puede definirse de acuerdo a las necesidades de cada aplicación, es decir, el volumen del tanque relleno de *carriers* se escoge dependiendo del tratamiento a realizar. Sin embargo, no debe sobrepasarse el 70 % de llenado, puesto que los soportes deben moverse libremente, minimizando los choques para evitar el desprendimiento de la biopelícula. [3,32]

Puesto que se trata de un proceso de biopelícula, la difusión de compuestos dentro y fuera de esta son muy relevantes. Es necesario mantener una biopelícula delgada pero que cubra una alta área superficial para minimizar la distancia que deben recorrer los contaminantes. Para lograr una biopelícula con estas características se debe controlar la turbulencia en el reactor. [3,38]

La formación de biopelícula se ve afectada a su vez por la velocidad de carga orgánica (Ver ecuación (1.1)). Velocidades bajas y moderadas producen biopelículas más variadas, lo cual a su vez aumenta la eficiencia de remoción. [38,39]

$$VCO = Q \text{ [L/s]} \cdot \frac{\text{Concentración de materia orgánica [g DQO/L]}}{\text{Volumen útil [L]}} \quad (1.1)$$

Existen tres distintos enfoques para el diseño de MBBR: cálculos en base a los parámetros de rendimiento del proceso, ecuaciones empíricas o simulación avanzada del proceso. [40] El

método más utilizado corresponde al uso de la velocidad de carga de área superficial (SALR) como parámetro de rendimiento. [41]

La SALR indica los gramos de material ingresando al reactor por día, por  $m^2$  de superficie de *carrier*. Un valor de diseño de SALR permite obtener el área superficial total de *carriers* requerido junto con el volumen de reactor, tal como se muestra en la ecuación (1.2). [36, 41]

$$V_{MBBR} = \frac{Q \cdot S_0}{SALR \cdot A_{spec} \cdot f} \cdot 100 \quad (1.2)$$

$V_{MBBR}$ = volumen del reactor [ $m^3$ ]       $Q$ = flujo que ingresa al reactor [ $m^3/d$ ]  
 $f$ = fracción de llenado del reactor [%]       $A_{spec}$ = área específica de carrier [ $m^2 \cdot m^{-3}$ ]  
 $S_0$ = Concentración del contaminante en el flujo de entrada [ $g/m^3$ ]

De forma similar, el diseño de MBBR puede realizarse utilizando el parámetro flujo de remoción por área superficial (SARF). Este corresponde a la cantidad de contaminante removido por unidad de superficie por día. [40] Como se observa en la ecuación (1.3), este parámetro permite obtener el volumen del reactor.

$$V_{MBBR} = \frac{Q \cdot S_0 \cdot E}{SARF \cdot A_{spec} \cdot f} \cdot 100 \quad (1.3)$$

$V_{MBBR}$ = volumen del reactor [ $m^3$ ]       $Q$ = caudal que ingresa al reactor [ $m^3/d$ ]  
 $A_{spec}$ = área específica de carrier [ $m^2 \cdot m^{-3}$ ]       $E$ = porcentaje de remoción de contaminante [%]  
 $f$ =fracción de llenado del reactor [%]  
 $S_0$ = Concentración del contaminante en el flujo de entrada [ $g/m^3$ ]

Si bien el tiempo de residencia no suele utilizarse como parámetro de diseño, este se puede calcular a partir del volumen del reactor. Cabe destacar que para procesos de tratamiento con biomasa adherida, puede tenerse una separación entre el tiempo de residencia de la biomasa y del líquido. [36, 42] En la ecuación (1.4) se muestra el tiempo de residencia hidráulico (HRT)

$$HRT(\theta) = \frac{V_{MBBR}}{Q} \cdot \frac{24[h]}{1[d]} \quad (1.4)$$

# Capítulo 2: Metodología

## 2.1. Crecimiento bacteriano

El crecimiento general de la cepa *Burkholderia xenovorans* se realiza mediante el siguiente procedimiento.

En un matraz de 250 mL se colocan 330 $\mu$ L de bifenilo en acetona 1.5M, este se deja evaporar de modo que quede únicamente el bifenilo al fondo del recipiente. A esto se le añaden 100 mL de medio mínimo M9, el cual se prepara según lo estipulado en el Anexo B.1 y se agregan 100 $\mu$ L de inóculo. Se incuba a 30°C y una agitación de 100 rpm.

Para el crecimiento de biopelícula se sigue el mismo procedimiento pero agregando 3 gramos de carbón activo, 0,5 gramos de biochar de pino, o bien *carriers* de PLA según corresponda.

### 2.1.1. Cinética de crecimiento

Se preparan cultivos según el procedimiento mencionado en la sección 2.1, preparando en suspensión, de biopelícula y con agente adsorbente. Cada cultivo se prepara en triplicado

Se toman muestras de 1 mL al iniciar el cultivo y al rededor de las 8, 20, 24, 25, 27, 29, 45, 55 y 75 horas siguientes. Para los cultivos correspondientes se toman muestras del agente adsorbente. En el caso del carbón activo y el biochar se utiliza un asa bacteriológica para retirar suficiente material para llenar la punta de un tubo de 1,5 mL, mientras que al utilizar *carriers* de PLA, se toma un *carrier* de 10 mm de diámetro por cada muestra.

Para analizar las muestras de crecimiento en suspensión se realiza una dilución en serie de cada muestra hasta un factor de 10<sup>6</sup>, y homogeneizando en cada paso mediante *vortex*. Se siembran las diluciones de 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> en placas con medio mínimo M9 agar (Ver Anexo B.2) y se incuban a 30°C. Finalmente se cuentan las colonias en cada placa y se calcula la concentración inicial de bacterias mediante la ecuación (2.1).

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{N \cdot D}{V} \quad (2.1)$$

Donde UFC corresponde a unidades formadoras de colonias, N corresponde al número de colonias contadas, D al factor de dilución y V al volumen de muestra sembrada.

Las muestras de crecimiento en adherencia se analizan de forma similar a las de crecimiento

en suspensión. En primer lugar se suspende la muestra en medio mínimo M9 suficiente para cubrirlo por completo, luego se realizan 3 ciclos de sonicación de 3 minutos, recuperando el sobrenadante entre cada uno. El medio recuperado total se utiliza para realizar una dilución seriada, con la cual se continua con el mismo procedimiento de análisis que para las muestras líquidas.

### 2.1.2. Caracterización biopelícula

Para observar el crecimiento de la biopelícula se prepararon cultivos según el procedimiento mostrado en la sección 2.1, se tomaron muestras de cada material para ser analizadas por microscopio electrónico de barrido (SEM) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Microanálisis de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile. Las muestras se metalizaron en oro y se examinaron al vacío a 20 kV.

Se analiza la composición de las muestras mediante fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDS).

## 2.2. Remoción de bifenilo

### 2.2.1. Medición concentración bifenilo

En primera instancia se realizó una curva de calibración de concentración de bifenilo versus intensidad de fluorescencia, para lo cual se prepararon muestras de bifenilo de  $5000\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$  y  $0,5\mu\text{M}$ . El bifenilo se encuentra originalmente disuelto en acetona, por lo que para preparar las muestras esta se deja evaporar y el bifenilo se resuspende en medio M9. La fluorescencia fue medida en un espectroscopio Hitachi F-2700 a una excitación de 250 nm, obteniéndose la máxima emisión a una longitud de 312 nm.

A partir de los resultados obtenidos se genera la curva de calibración, con la cual se obtienen las concentraciones de bifenilo para todas las mediciones realizadas posteriormente. El detalle de esta curva se encuentra en la sección 3.1

### 2.2.2. Experimentos de adsorción

#### Cinética de adsorción

Se preparan muestras de 100mL de medio M9 con una concentración inicial de bifenilo de 5mM. Se agregan 3 gramos de carbón activo o un *carrier* de PLA de 20mm de diámetro, según corresponda. Se mezclan las soluciones durante 90 minutos en un agitador incubadora orbital Yihder LM-450D a 30°C y 100 rpm, tomando muestras a los 5, 10, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos.

Se mide la concentración de bifenilo según el procedimiento mencionado en la sección 2.2.1, y se realiza un gráfico de porcentaje de bifenilo adsorbido en función del tiempo. El porcentaje adsorbido se calcula según la ecuación (2.2)

$$\text{Porcentaje bifenilo adsorbido} = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100 \quad (2.2)$$

## Isoterma de adsorción

Se preparan soluciones de 100mL de medio M9 a distintas concentraciones de bifenido, para lo cual se agrega bifenido disuelto en acetona y se deja evaporar. Se agrega el medio M9 y 3 gramos de carbón activo, 0,5 gramos de biochar de pino, o un *carrier* de PLA de 20 mm de diámetro (2,35 gr. aprox.) , según corresponda. Se preparan muestras de  $30\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $150\mu\text{M}$ ,  $300\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$  y  $700\mu\text{M}$  y se dejan a  $30^\circ\text{C}$  y 100 rpm en un agitador incubadora orbital Yihder LM-450D durante 48 horas, hasta alcanzar el equilibrio.

Se mide la concentración de bifenido en solución utilizando el procedimiento mencionado en la sección 2.2.1. A partir de estos datos y la concentración inicial se calcula la capacidad de adsorción, como se observa en la ecuación (2.3).

$$q_e = V [L] \cdot \frac{C_0 - C_e [mg/L]}{m [g]} \quad (2.3)$$

Donde V corresponde al volumen de muestra y m a la masa de adsorbente utilizado.

Se grafica la capacidad de adsorción en función de la concentración de equilibrio.

### 2.2.3. Porcentaje de remoción

El porcentaje de remoción de bifenido logrado se obtiene a partir de las muestras tomadas durante la cinética de crecimiento. Como se indica en la sección 2.1.1, para cada tiempo se toma una muestra de 1 mL de la cual se utilizan 100  $\mu\text{L}$  para realizar una dilución en serie. El resto de la muestra se utiliza para medir la concentración de bifenido.

Se utiliza unicamente la muestra final (75 horas), la cual es filtrada mediante un filtro de jeringa con un tamaño de poro 0,22  $\mu\text{m}$  para remover las bacterias. Esta muestra filtrada es utilizada para medir la concentración restante de bifenido mediante el procedimiento mencionado en la sección 2.2.1, y a partir de este dato y la concentración inicial se calcula el porcentaje removido, tal como se observa en la ecuación (2.4)

$$\text{Porcentaje bifenido removido} = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100 \quad (2.4)$$

## 2.3. Diseño reactor

En primer lugar se hace una revisión bibliográfica con respecto a los reactores de biopelícula de lecho móvil, investigando su modo de operación, condiciones de operación y métodos de diseño utilizados. Se analizan las ventajas y desventajas de los distintos métodos encontrados, y se selecciona uno en base a la información disponible y al tiempo y complejidad de desarrollo.

Luego se realiza una búsqueda de valores apropiados para los parámetros relevantes para el diseño, buscando datos de plantas de tratamiento tanto chilenas como extranjeras. Se toman supuestos con respecto a los datos para los cuales no se tiene información de planta y se incorporan los datos obtenidos a partir de los resultados experimentales.

Finalmente se realiza un análisis de sensibilidad para rangos de porcentaje de remoción de bifenilo logrados, concentraciones y flujos de entrada y el porcentaje de llenado de carriers, los cuales se establecen luego de una investigación previa.

# Capítulo 3: Resultados y discusiones

## 3.1. Determinación de la concentración de bifenilo en el medio

En la Figura 3.1 es posible observar la curva realizada para la medición de bifenilo, donde se grafican los resultados en escala logarítmica para apreciar la curva en su totalidad. Además en el Anexo C se presentan los valores promedio y desviaciones estándares obtenidas para las muestras en triplicado. Esta curva es utilizada para todas las mediciones que se presentarán en las secciones siguientes.

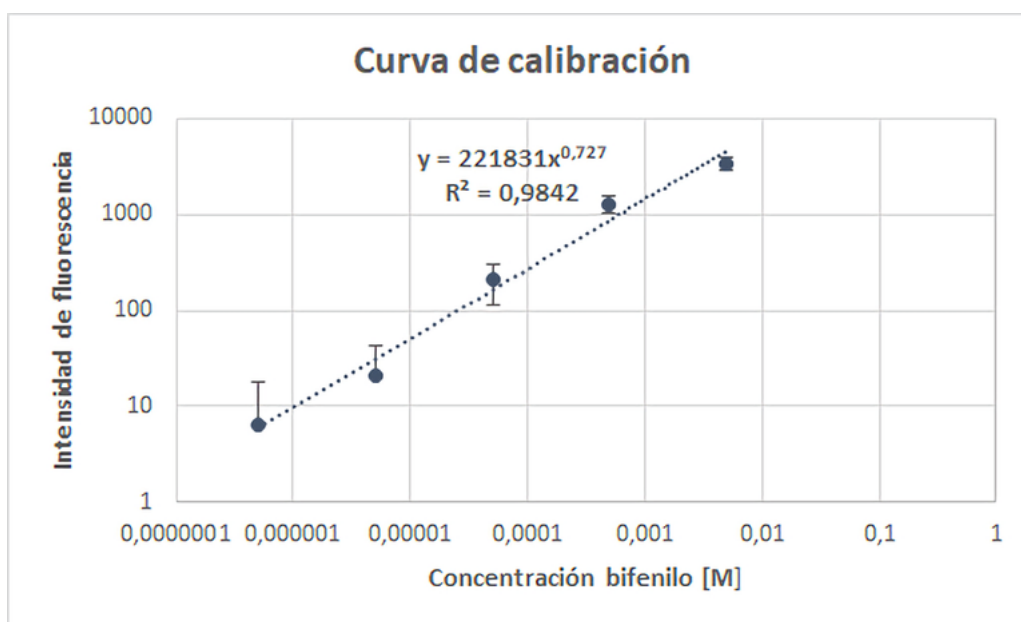


Figura 3.1: Curva de calibración de bifenilo por espectroscopia de fluorescencia, análisis en triplicado

Si bien la línea de tendencia que se observa en el gráfico es de la forma  $y = a \cdot x^b$ , para obtener las concentraciones de bifenilo en las secciones correspondientes, se utiliza su forma logarítmica como se muestra en la ecuación (3.1).

$$\log_{10}(x) = \frac{\log_{10}(y) - 5,34}{0,727} \quad (3.1)$$

## 3.2. Experimentos de adsorción

### 3.2.1. Cinética de adsorción de bifenilo en distintos materiales soporte

Se estudia la cinética de adsorción del bifenilo en los distintos materiales utilizados como soporte de crecimiento de biopelícula para determinar el tiempo que demora en alcanzarse la concentración de equilibrio.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.2, donde es posible observar el comportamiento para cada uno de los materiales utilizados. Se muestran los resultados obtenidos para análisis en duplicado, junto con su respectiva tendencia calculada a partir de una media móvil de dos periodos. En la Tabla 3.1 se muestra un resumen de las adsorciones máximas logradas para cada material, así como el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en cada caso.

Tabla 3.1: Resumen adsorción máxima de bifenilo lograda por cada material y el tiempo que se requiere para alcanzar esta adsorción

Material	Tiempo equilibrio [min]	Adsorción máxima [%]
Carbón activado	40	99,87
<i>Carriers</i> de PLA	30	99,60
Biochar de pino	10	99,99

Cabe destacar que para el carbón activado se tiene una adsorción más lenta que para los demás materiales, no solo por el tiempo que demora en llegar al equilibrio, sino también por la diferencia de adsorción que existe entre un punto y el siguiente. Para el carbón activado se tienen saltos del orden de 0,1 % entre muestra y muestra, mientras que para el biochar de pino estos son de 0,001 %. Dado lo anterior no es posible unificar los resultados en un mismo eje.

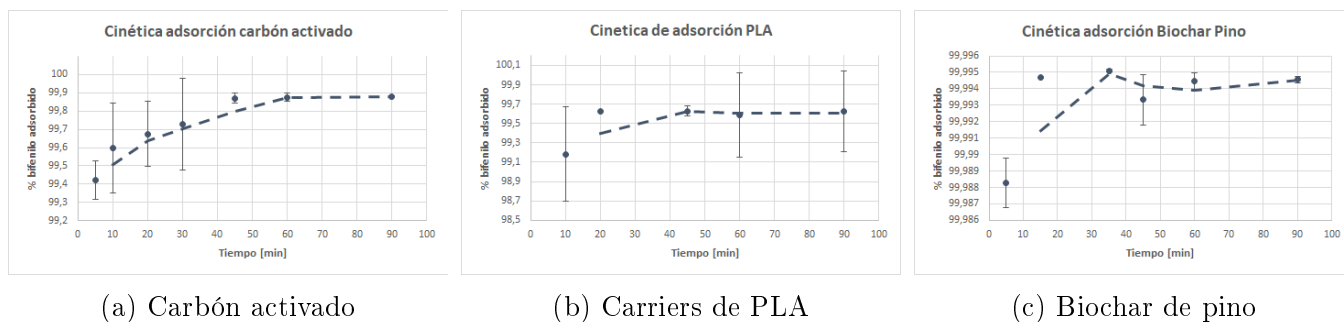


Figura 3.2: Cinética de adsorción para distintos materiales soportes y sus respectivos ajustes. Análisis en duplicado

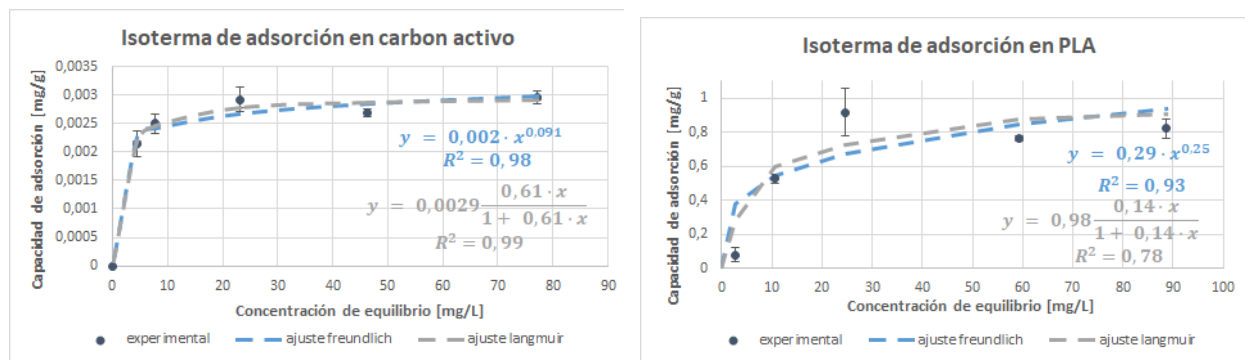


### 3.2.2. Isotermas de adsorción

Se analizan los datos de adsorción mediante los ajustes de Langmuir y Freundlich. En la Figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos para cada material, mientras que en la Tabla 3.2 se tienen los parámetros obtenidos para cada modelo.

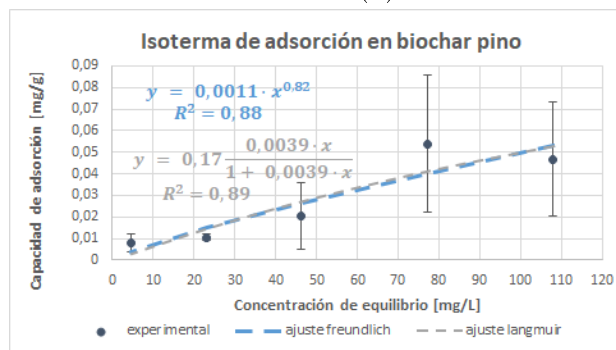
El ajuste de Langmuir muestra un buen comportamiento para la isoterma en carbón activado, con un  $R^2$  de 0,99, sin embargo para este mismo material el ajuste de Freundlich presenta un  $R^2$  de 0,98, por lo que no es posible afirmar el mecanismo de adsorción por el cual se rige. Por otro lado, puesto que el valor del exponente  $n$  es mayor que 1, se puede asegurar que se tienen condiciones favorables para la adsorción de bifenilo en este material.

En el caso de los *carriers* de PLA y el biochar de pino ni el ajuste de Langmuir ni Freundlich muestran correlaciones altas con los resultados obtenidos. En el caso del biochar, es posible que el comportamiento se asimilara más a estos ajustes para concentraciones mayores. Estudios realizados con azul de metileno muestran un  $R^2$  de 0,95 para la isoterma de Freundlich en biochar de pino, utilizando concentraciones de hasta 500 mg/L. [43]. De todas formas los valores de  $n$  para ambos materiales es mayor que 1, por lo que se tiene una adsorción favorable.



(a) Curva de adsorción en carbón activado

(b) Curva de adsorción en carriers de PLA



(c) Curva de adsorción en biochar de pino

Figura 3.3: Curvas de adsorción para distintos adsorbentes y sus respectivos ajustes. Análisis en duplicado

A partir de los ajustes realizados y los datos obtenidos, es posible notar que los *carriers* de PLA muestran una mayor capacidad de adsorción, lo cual indica que para una misma cantidad de adsorbente, se tendrá mayor adsorción con los *carriers* que con el carbón activado o el

Tabla 3.2: Parámetros de isoterma de adsorción para ajustes de Langmuir y Freundlich

Material	Constantes Langmuir			Constantes Freundlich		
	$Q_0$ [mg/g]	$K_L$ [L/mg]	$R^2$	$K_F$ [mg/g]	$n$	$R^2$
Carbón activado	0,0029	0,61	0,99	0,002	10,96	0,98
Carries PLA	0,98	0,14	0,78	0,29	3,88	0,89
Biochar pino	0,17	0,0039	0,89	0,0011	1,21	0,88

biochar. Tal como se muestra en la Tabla 3.2 la capacidad máxima de adsorción del PLA es de 0,98 [mg/g] mientras que para el carbón activado y biochar es de 0,0029 y 0,17 [mg/g] respectivamente.

### 3.3. Crecimiento de biopelícula

#### 3.3.1. Cinética de crecimiento de *Burkholderia Xenovorans*

Se estudia el crecimiento de la biopelícula de *B. Xenovorans* LB400 en los distintos soportes a partir de la cuantificación de bacterias mediante las unidades formadoras de colonia presente por mL de muestra. Los resultados presentados a continuación se encuentran normalizados por la concentración inicial de bacterias en el medio, esto dado que se utilizaron inóculos distintos en cada caso. Al normalizar los resultados, es posible realizar una mejor comparación entre experimentos.

En la Figura 3.4 se observa el crecimiento de *B. Xenovorans* en suspensión, es decir, sin un soporte en el medio. Se tiene un crecimiento exponencial de al rededor de 28 horas,

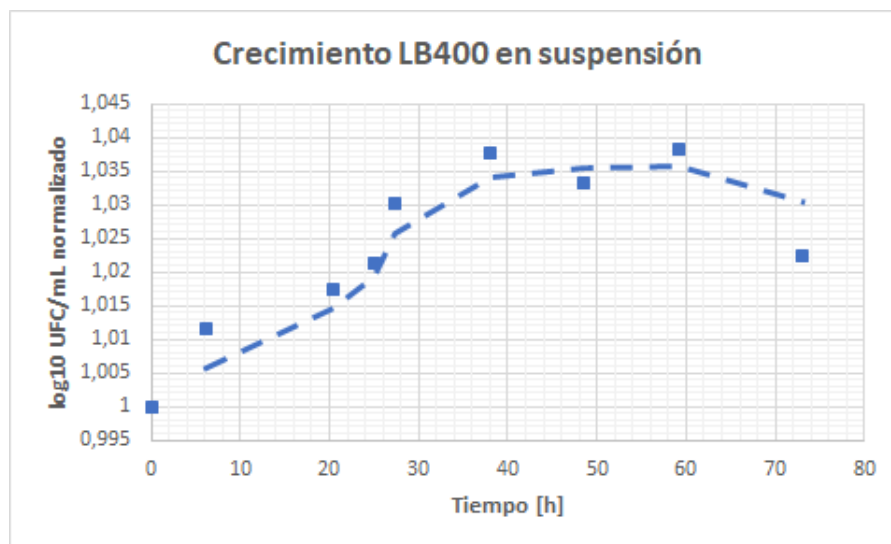
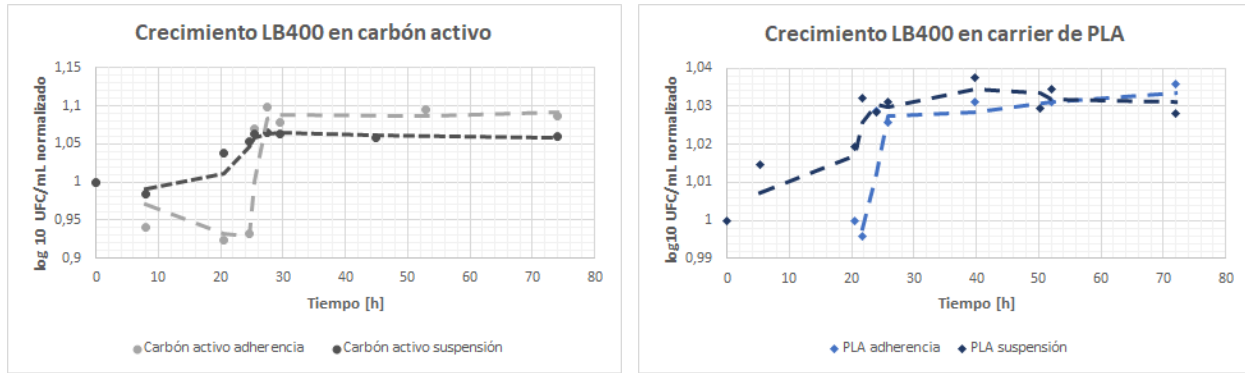
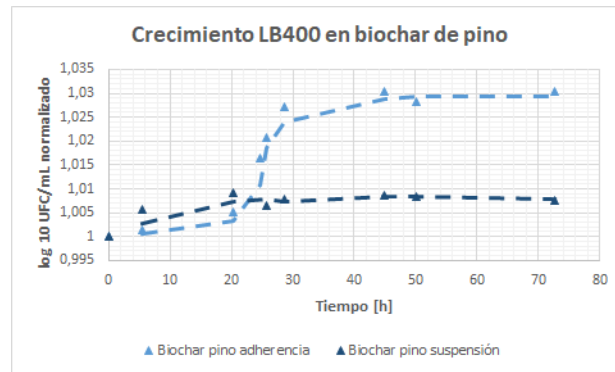


Figura 3.4: Crecimiento de LB400 en suspensión

En la Figura 3.5 se muestra la cinética de crecimiento de las bacterias creciendo adheridas a los distintos soportes, en comparación al crecimiento logrado en suspensión. En todos los casos se tiene una fase *lag* mayor para las bacterias creciendo en adherencia versus el crecimiento en suspensión. Sin embargo, el tiempo de adaptación es bastante rápido para el desarrollo de una biopelícula, tardando al rededor de 30 horas para alcanzar un crecimiento estable. Esto es consistente con los tiempos reportados en la literatura, donde se muestran crecimientos desde los dos días de incubación. [44, 45].



(a) Comparación crecimiento *B. Xenovorans* en adherencia a carbón activo y en suspensión (b) Comparación crecimiento *B. Xenovorans* en adherencia a *carriers* de PLA y en suspensión



(c) Comparación crecimiento *B. Xenovorans* en adherencia a biochar de pino y en suspensión

Figura 3.5: Curvas de crecimiento de *B. Xenovorans* en disitintos soportes en comparación al crecimiento logrado suspensión

Tanto para el carbón activo como para el biochar de pino se tiene mayor crecimiento en adherencia que en suspensión, mientras que los *carriers* de PLA muestran un crecimiento similar en ambos casos. Se ha demostrado en la literatura que el crecimiento de biopelículas presenta ventajas por sobre el crecimiento en suspensión para este tipo de bacterias, por lo cual se cumple con lo esperado. [9, 45]

En la Figura 3.6 se muestra el crecimiento en adherencia en los distintos materiales soporte, donde es posible notar que se alcanza un mayor crecimiento en el carbón activo que en cualquier otro material.

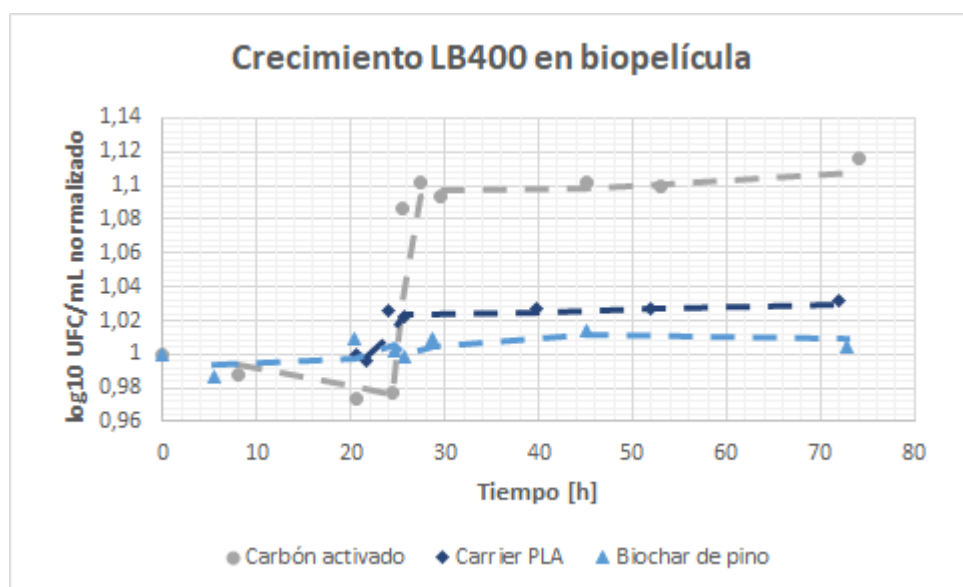


Figura 3.6: Crecimiento total de LB400 en biopelícula

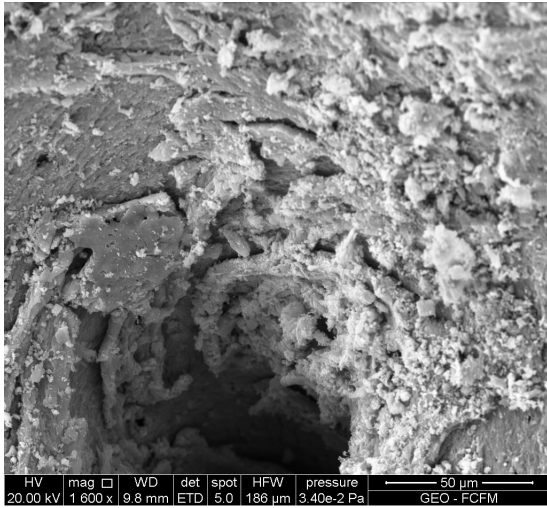
En la Tabla 3.3 se observan las concentraciones totales de bacterias obtenidas en cada caso. Para obtener la cantidad total de bacterias se considera que el crecimiento de la biopelícula es uniforme en cada material, teniendo la misma cantidad de bacterias por gramo. En el Anexo D se muestra el procedimiento utilizado para obtener estos valores.

Tabla 3.3: Crecimiento total máximo de *B. Xenovorans* logrado en promedio para cada material soporte

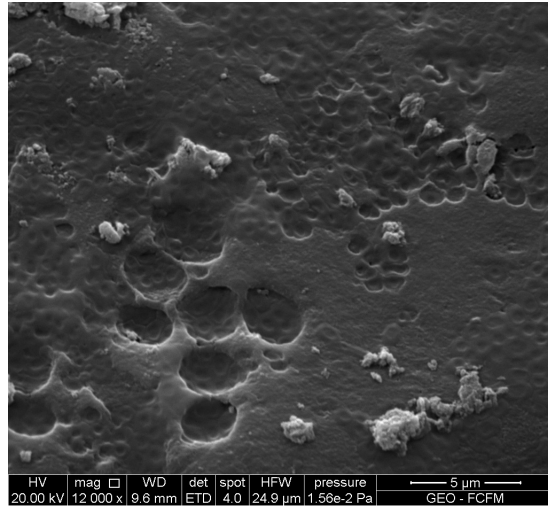
Material	Máximo número de bacterias viables promedio[UFC/mL]
Carbón activado	$1,04 \times 10^{10}$
Carriers de PLA	$7,72 \times 10^9$
Biochar de pino	$8,07 \times 10^9$

### 3.3.2. Caracterización de biopelícula de *Burkholderia Xenovorans*

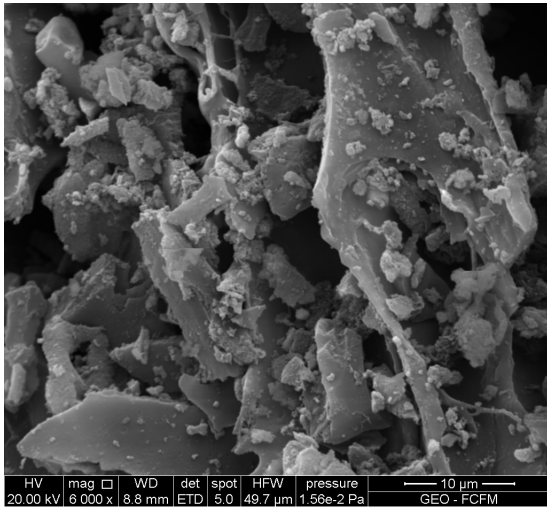
Se verifica la presencia de biopelículas formadas en la superficie de los distintos materiales mediante imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido. En la Figura 3.7 se muestran las imágenes obtenidas para cada material, donde la primera columna corresponde al material estéril, y la segunda a las imágenes obtenidas luego de 6 días de cultivo.



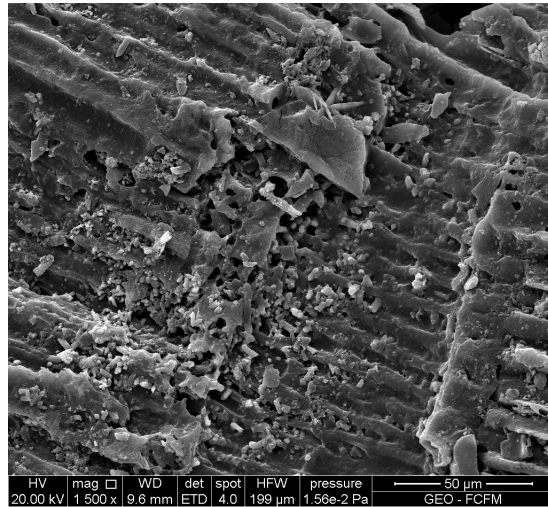
(a) Carbón activo estéril



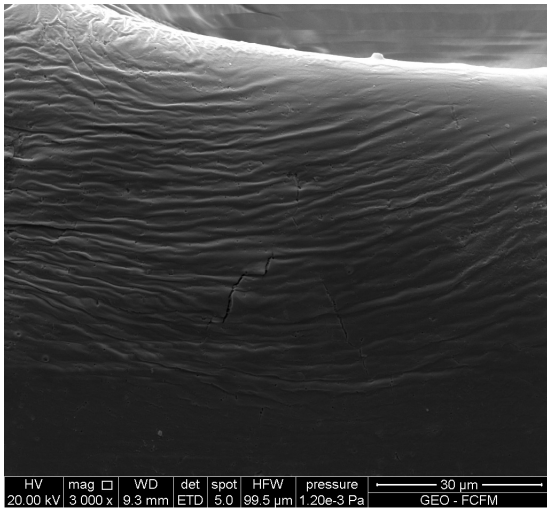
(b) Biopelícula en carbón activo



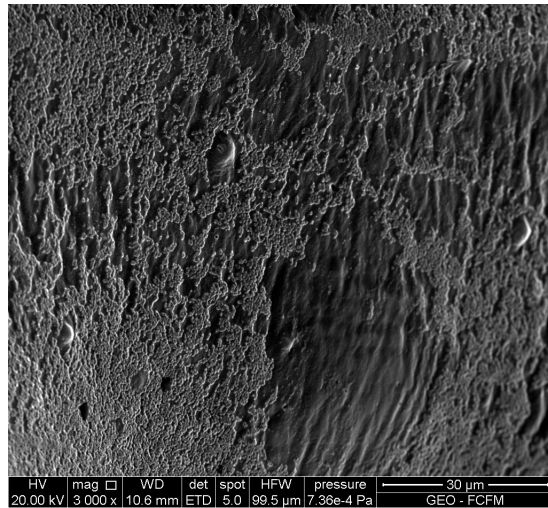
(c) Biochar de pino estéril



(d) Biopelícula en carbón activo



(e) *Carrier* de PLA estéril



(f) Biopelícula en *carrier* de PLA

Figura 3.7: Imágenes obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido para los distintos materiales usados como soporte, en su forma estéril y con *B.Xenovorans* formando biopelícula. (Las figuras presentan distintos aumentos)

Es posible observar ciertos agregados en las imágenes correspondientes a las muestras de biopelículas. En particular en las figuras 3.7b y 3.7f se observan cúmulos que podrían corresponder a biopelícula. En el caso de los *carriers* de PLA, no fue posible obtener imágenes con mayor aumento, dado que al aumentar la corriente de electrones estos derretían el material, por lo cual no es posible comparar si los agregados formados presentan una estructura similar. Para el biochar de pino, no se encuentran agregados a simple vista.

Dado que no se conocía la estructura que toma *B. Xenovorans* al formar biopelículas, no se puede saber con certeza si los agregados encontrados corresponden efectivamente a biopelículas. Esto además dificultó la búsqueda de biopelículas durante la toma de imágenes, puesto que no se sabía donde apuntar el haz.

Es posible que el tiempo de cultivo no haya sido suficiente para desarrollar una biopelícula visible. Si bien los resultados de crecimiento muestran que luego de dos días se alcanza la estabilidad, es probable que la macro-estructura de la biopelícula demore más tiempo en formarse. En estudios similares se indica que la biopelícula comienza a adherirse luego de 2 semanas de cultivo. [45]

Se analiza la composición de la superficie de la posible biopelícula mediante EDS. En la Figura 3.8 se muestran los análisis elementales obtenidos para cada material. En las Tablas 3.4, 3.5 y 3.6 se muestra el detalle de la composición obtenida para cada material.

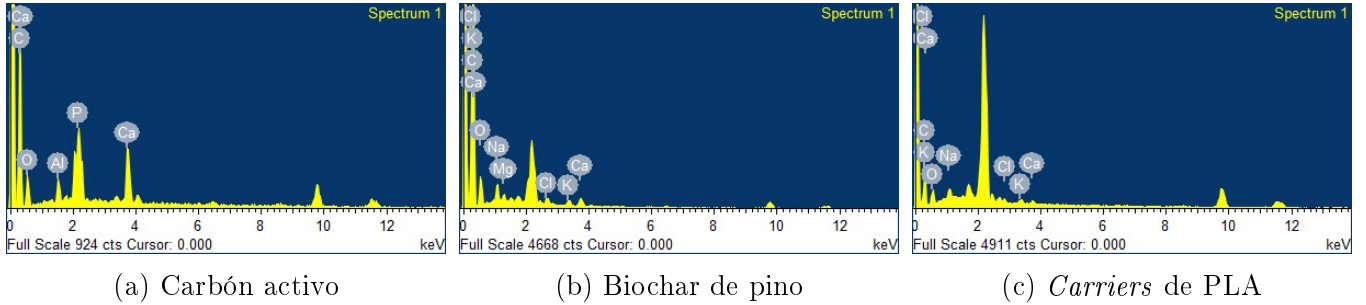


Figura 3.8: Análisis elemental de biopelícula de *B. Xenovorans* en distintos materiales soportes

Tabla 3.4: Análisis elemental de la película de *B. Xenovorans* creciendo en carbón activo en comparación al material sin biopelícula

		C	Na	Al	P	Ca	O
Peso %	Estéril	16,45	0,82	5,02	5,28	12,18	60,25
	Biopelícula	25,44	0	0,82	0,67	2,64	70,43

No es posible obtener información relevante al crecimiento de la biopelícula a partir del análisis elemental, puesto que no se puede diferenciar de dónde proviene el carbón encontrado. Es posible que el aumento dado entre el material estéril y la biopelícula provenga tanto del bifenilo como de la biopelícula o incluso del mismo material soporte. Los demás elementos presentes corresponden a elementos utilizados en los reactivos del medio de cultivo.

Tabla 3.5: Análisis elemental de la película de *B. Xenovorans* creciendo en biochar de pino en comparación al material sin biopelícula

		C	Na	Mg	Cl	K	Al	Si	P	Ca	O
Peso %	Estéril	26,59	-	0,34	-	-	0,13	0,2	0	0,96	71,79
	Biopelícula	26,75	0,69	0,19	0,18	0,16	-	-	-	0,26	71,77

Tabla 3.6: Análisis elemental de la película de *B. Xenovorans* creciendo en *carrier* de PLA en comparación al material sin biopelícula

		C	Na	Cl	K	Ca	O
Peso %	Estéril	26,59	-	-	-	1,83	71,57
	Biopelícula	24,57	3,96	1,64	1,22	1,09	67,52

Este análisis podría aportar mayor información al utilizar PCBs más complejos, puesto que la presencia de cloro puede indicar la adsorción de PCBs directo al material. [45]

### 3.4. Remoción bifenilo

Al medir la concentración de bifenilo en el medio una vez finalizado los experimentos de crecimiento, es posible calcular el porcentaje de remoción de bifenilo bajo distintas configuraciones. En la Figura 3.9 es posible observar la remoción lograda por las biopelículas en las distintas superficies versus el material adsorbente por si solo. Se calcula además la remoción lograda mediante el uso de *B. Xenovorans* LB400 creciendo en suspensión, la cual corresponde a un 99,78 %.

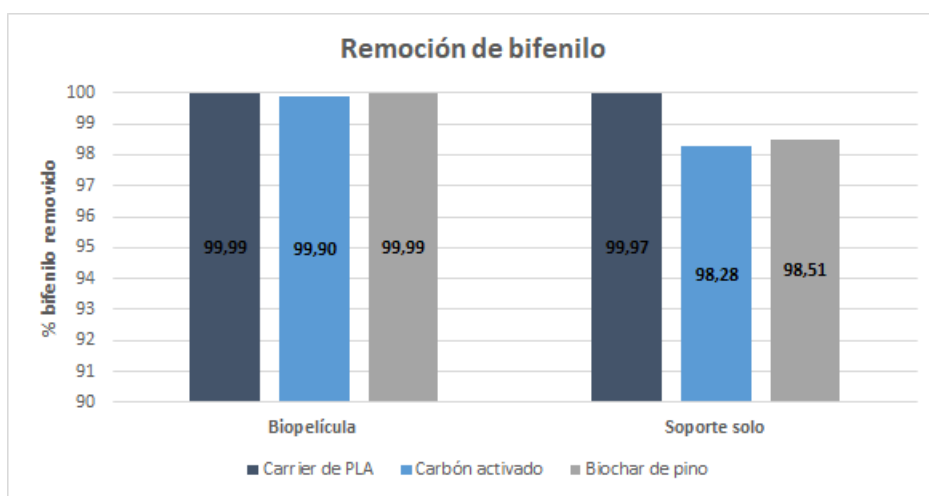


Figura 3.9: Porcentaje de remoción de bifenilo logrado en distintas configuraciones y mediante distintos materiales

En primer lugar se tiene que entre los materiales utilizados la mayor remoción se logra

mediante los *carriers* de PLA, lo cual es consistente con los resultados obtenidos anteriormente en la sección 3.2.2. Solamente para el caso de los *carriers* se logra una mayor remoción al utilizar el material adsorbente en lugar de la bioremediación con *B. Xenovorans* LB400 en suspensión. Para el caso del carbón activo y biochar, el uso de bacterias supone un aumento de 1,4 % y 1,2 % respectivamente.

Al considerar el efecto de la biopelícula versus el material adsorbente solo, se tiene un aumento en la remoción en todos los casos. Si bien la mayor remoción es lograda mediante la biopelícula de LB400 creciendo en *carriers* de PLA, la diferencia lograda no es significativa en comparación al uso del *carrier* por sí mismo, puesto que se tiene una diferencia del 0,027 % en comparación al 1,615 % y 1,484 % de aumento logrados al utilizar carbón activo y biochar de pino respectivamente.

Es importante destacar que el mecanismo de remoción mediante biopelícula y material adsorbente es distinto. Al utilizar biopelículas no solo se tiene adsorción del bifenilo al material usado como soporte, sino que también se logra degradar el bifenilo mediante el metabolismo de las bacterias, logrando una remoción definitiva desde el agua, lo que no ocurre al utilizar únicamente el soporte.

Si se considera que la degradación lograda por las bacterias es independiente del material en el que crecen, se tiene que el aporte de la biopelícula corresponde a un aumento de la remoción en 1,6 % (máximo aumento logrado). De lo contrario se tendría una degradación del 1,5 % de bifenilo en el caso de los *carriers* de PLA, y de 0,11 % para el biochar de pino.

## 3.5. Diseño reactor de biopelícula de lecho móvil

A continuación se presenta el diseño conceptual de un reactor MBBR para el tratamiento de PCBs en una planta a escala industrial. Se utilizan tanto parámetros obtenidos de la literatura como resultados obtenidos en las secciones anteriores de este trabajo. Se presentan los parámetros escogidos y el dimensionamiento logrado a partir de estos.

### 3.5.1. Parámetros relevantes

**Caudal** Como caudal a tratar se utilizan datos de la planta de tratamiento de aguas servidas Mapocho. Esta corresponde a una ampliación de la planta El Trebal, las cuales en conjunto atienden las aguas residuales de las subcuencas Maipo y las aguas de la subcuenca Mapocho que no son tratadas por la planta La Farfana. [46]

En particular se utiliza como referencia el caudal de entrada al tratamiento biológico, puesto que suele incorporarse el uso de MBBR después del tratamiento primario. [36, 38] Puesto que no se busca reemplazar al tratamiento biológico por completo, se utiliza una fracción del caudal de diseño de la planta Mapocho, dividiendo el flujo entre el tratamiento biológico y el tratamiento de PCBs. En la Figura 3.10 se muestra la configuración escogida.

El caudal que ingresa al tratamiento biológico, sin considerar la recirculación de lodos,



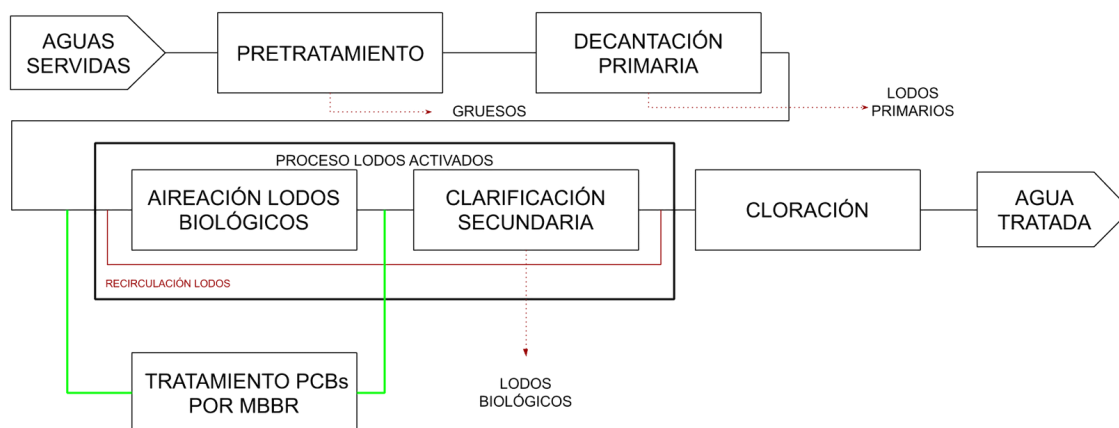


Figura 3.10: Diagrama de línea de aguas en planta Mapocho incorporando tratamiento de PCBs

corresponde aproximadamente a  $206000 \text{ [m}^3/\text{d]}$ , considerando que se divide el flujo a la mitad para ingresar al tratamiento de PCBs, se tendría un caudal de  $103000 \text{ [m}^3/\text{d]}$ .

**Concentración de PCBs** Puesto que no se tienen datos de concentración de PCBs en plantas de tratamiento de Chile, se realiza una búsqueda bibliográfica de este parámetro en plantas del mundo. En la Tabla 3.7 se muestran los resultados encontrados.

Tabla 3.7: Concentración de PCBs en distintas plantas de tratamiento

Lugar	Tipo de aguas tratadas	Flujo tratado $[\text{m}^3/\text{d}]$	Concentración PCBs $[\text{ng}/\text{L}]$	Referencia
Montreal	Industrial y municipal	1300000	18	[47]
Zhejiang	Industrial y municipal	90000	15	[48]
Umea	Municipal	30000	0,3	[49]
Siauliai	Municipal	20000	1	[49]
Washington	Municipal	946000	0,062	[50]

Si bien las concentraciones y flujos encontrados corresponden al ingreso a las plantas de tratamiento y no al tratamiento biológico, se asume que la remoción de PCBs en el pretratamiento y tratamiento primario no es significativo. No parece existir una correlación entre el flujo tratado y la concentración de PCBs, se tiene únicamente que la concentración es mayor al tratarse aguas industriales. Dado que en la planta Mapocho se tratan tanto aguas municipales como industriales, se escoge la concentración de  $18 \text{ [ng}/\text{L}]$  para trabajar con el peor de los casos.

**Área superficial específica** En la Tabla 3.8 se muestran las áreas superficiales específicas de cada material utilizado. Tanto el área del carbón activado como del biochar de pino fueron calculados a partir de los datos obtenidos en la sección 3.2.2, mientras que para los *carriers* de PLA este valor se obtuvo del proveedor. En el Anexo E se muestra el procedimiento realizado para calcular las áreas superficiales específicas.

Tabla 3.8: Áreas superficiales específicas de los materiales utilizados

Material	Área superficial específica [ $m^2/m^3$ ]
Carbón activado	1654
Carriers de PLA	1310
Biochar de pino	1014

**SARF** El flujo de remoción por área superficial es un parámetro de diseño obtenido a partir de tablas, según el tipo de proceso a realizar con un MBBR. En la Tabla 3.9 se muestran los distintos rangos utilizados para diferentes procesos.

Tabla 3.9: Rangos de SARF utilizados para distintos procesos de remoción mediante MBBR

	Rango SARF [ $g/m^2 \cdot d$ ]	Referencia
Remoción DBO	5-20	[40]
Remoción DBO previo a nitrificación	2-4	[40]
Nitrificación	0,6-1,4	[36]

Dado que ninguno de los rangos encontrados se refiere al tratamiento de contaminantes orgánicos, se utilizará el menor valor de cada uno, puesto que estos están asociados a un mayor porcentaje de remoción. [36]

### 3.5.2. Dimensionamiento

En la Tabla 3.10 se muestra el dimensionamiento del reactor para los distintos materiales utilizados como soporte. Se utilizan los parámetros indicados en la sección 3.5.1 y un porcentaje de llenado del 30 %. En el Anexo F se muestran los detalles de cálculo.

Tabla 3.10: Dimensionamiento MBBR para los distintos soportes

Soporte	Volumen [L] SARF= 5 [ $g/m^2 \cdot d$ ]	Volumen [L] SARF = 2 [ $g/m^2 \cdot d$ ]	Volumen [L] SARF= 0,6 [ $g/m^2 \cdot d$ ]
Carbón activado	0,75	1,87	6,12
Carrier PLA	0,94	2,36	7,73
Biochar pino	1,22	3,05	9,99

Se tienen mayores volúmenes para los reactores utilizando biochar, lo cual se debe a la menor área superficial específica que presenta. Además, se tiene que mientras menor sea el SARF, mayor es el volumen del reactor.

Si bien los MBBR tienen la ventaja de disminuir el volumen necesario con respecto al proceso de lodos activados convencional, los volúmenes obtenidos se encuentran muy por debajo de las dimensiones utilizadas en planta. Para plantas de tratamiento con flujos de ingreso

similares, los reactores utilizados tienen un volumen de 6300 [m<sup>3</sup>]. [2,31]. Es importante destacar que actualmente no se han implementado MBBRs a gran escala para el tratamiento de PCBs, sin embargo, en estudios a escala piloto se han utilizado reactores de 12 [L] para el tratamiento de 0,15 [ $\frac{m^3}{d}$ ]. [35]

Por otro lado, al calcular los tiempos de retención con los volúmenes calculados, se tienen tiempos del orden de milisegundos, lo cual confirma que los resultados obtenidos son menores que los reportados para el uso en planta, puesto que se utilizan tiempos de retención del orden de 3 horas para procesos de alta remoción. Dado que en este caso se logra remover el 99 % del contaminante, era esperable que se obtuviesen tiempos de retención similares. [2,36]

Esta diferencia en los dimensionamientos obtenidos puede deberse al hecho que los SARF utilizados no corresponden a parámetros de diseño específicos para la remoción de contaminantes orgánicos. Dado que el SARF depende de las concentraciones, es importante notar que la concentración de BOD que ingresa al proceso de remoción es del orden de 100 mg/L, al proceso de nitrificación es del orden de 10 mg/L, mientras que las concentraciones de PCBs son del orden de ng/L, por lo que es probable que el SARF a utilizar debiese ser dos ordenes de magnitud menor a los obtenidos de la literatura. [31,36]

### 3.5.3. Análisis de sensibilidad

A continuación se estudia cómo distintas variables afectan el dimensionamiento del reactor. En particular se escogen para sensibilizar la eficiencia de remoción, las concentraciones de PCBs que ingresan al sistema, los flujos de entrada y el porcentaje de llenado de *carriers*. Para cada variable se plantean escenarios pesimistas y optimistas, utilizando el carbón activo como caso de ejemplo.

**Porcentaje de remoción de bifenilo** Es importante estudiar como esta variable afecta al dimensionamiento puesto que los valores utilizados se obtuvieron de experimentos a pequeña escala y realizados en *batch*. Es probable que la remoción a esca industrial sea mucho menor.

Para determinar los valores entre los cuales fluctuar la eficiencia de remoción se utiliza la mínima remoción lograda en la planta de tratamiento de Montreal como el peor de los casos, el cual corresponde a un 33 %. Como escenario optimista se escoge un 100 % de remoción puesto que es el máximo logrado en la planta mencionada. Se considera además como caso pesimista la remoción del 50 %, dado que este corresponde al promedio logrado en plantas industriales. [47] Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11: Análisis de sensibilidad para el porcentaje de remoción de bifenilo

Escenario	Variación variable [%]	Remoción bifenilo [%]	Volumen reactor [L]	Variación volumen [%]
Optimista	+0,1	100	6,13	+0,1
Caso base	0	99,90	6,12	0
Pesimista	-50	50	3,06	-50
Pesimista	-67	33	2,02	-67

En los resultados se puede apreciar que no existe variación con respecto al volumen al aumentar el porcentaje de remoción, esto puede deberse a que las diferencias en remoción

logradas no son significativas. Al disminuir la remoción en cambio, se tiene una disminución en el volumen del reactor la cual ocurre de forma lineal. Si bien disminuciones en la remoción conllevan a disminución en el tamaño del reactor, esto tiene sentido con el modelo empleado, puesto que disminuciones en la eficiencia de remoción implican un aumento de la concentración de salida, la cual es directamente proporcional al volumen del reactor.

**Concentración de entrada** Esta variable se estudia puesto que existen grandes diferencias en las concentraciones medidas entre planta y planta. Dado que no se cuentan con datos específicos para Chile, es importante estudiar qué tanto afecta en el dimensionamiento de los equipos.

Como escenario optimista se escoge la menor concentración reportada en la literatura para tratamientos de aguas municipales e industriales, correspondiente a 15 [ng/L]. Esta es un 17% menor que el valor utilizado en este trabajo, por lo que se estudia como caso pesimista una concentración un 17% mayor. Se analiza también las variaciones en un 50% superior e inferior. Se muestran los resultados en la Tabla 3.12

Tabla 3.12: Análisis de sensibilidad para la concentración de entrada de bifenilo

Escenario	Variación variable [%]	Concentración de entrada [ng/L]	Volumen reactor [L]	Variación volumen [%]
Pesimista	+50	27	9,18	+50
Pesimista	+17	21	7,14	+17
Caso base	0	18	6,12	0
Optimista	-17	15	5,10	-17
Optimista	-50	9	3,06	-50

Al igual que en el caso anterior, se tiene una variación lineal del volumen con respecto a la concentración de entrada, esto es concordante con el modelo utilizado, puesto que se afecta la concentración de salida del mismo modo que al variar la eficiencia de remoción. El volumen entonces es igualmente sensible al porcentaje de remoción y a la concentración de entrada.

**Flujo de entrada** Es importante estudiar esta variable puesto que pueden existir fluctuaciones en el flujo de entrada que maneja la planta. El flujo utilizado corresponde al caudal de diseño de la planta, equivalente a un caudal promedio anual.

La planta Mapocho trata un máximo diario de aproximadamente 232000 [ $m^3/d$ ] en el proceso de lodos activados. Considerando la misma división de flujo que para el dimensionamiento base, se tendría como máximo un flujo de entrada de 116000 [ $m^3/d$ ] el cual se considera como caso pesimista. [46] Se considera una disminución del mismo rango como escenario optimista. Se analizan además variaciones de un 50% para flujos mayores y menores. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.13

Dado que la relación entre el volumen y el flujo de entrada es igual que la relación que tiene con las variables anteriores, se tiene el mismo comportamiento, donde la variación dada es de forma lineal. Con esto se tiene entonces que el volumen es igualmente sensible al porcentaje de remoción, concentración de entrada y flujo de entrada.

Tabla 3.13: Análisis de sensibilidad para el flujo de entrada

Escenario	Variación variable [%]	Flujo de entrada [ $m^3/d$ ]	Volumen reactor [L]	Variación volumen [%]
Pesimista	+50	154500	9,18	+50
Pesimista	+13	116000	6,89	+13
Caso base	0	103000	6,12	0
Optimista	-13	89610	5,32	-13
Optimista	-50	51500	3,06	-50

Puesto que se tiene una variación lineal, pequeñas variaciones en estas variables no impondrán un efecto significativo en el diseño del reactor. Sin embargo, si se tienen altas variaciones, es importante tomarlas en consideración para el dimensionamiento.

En el caso del porcentaje de remoción, dado que no es posible aumentar la influencia sobre el volumen, esta variable no es especialmente relevante. Con respecto a la concentración de entrada se deben tener mediciones específicas para las aguas a tratar para diseñar correctamente. Por último, las fluctuaciones del flujo durante el día si son significativas para el diseño del reactor, por lo que es fundamental considerar un volumen de seguridad, o bien analizar el cierre de la línea de tratamiento de PCBs en caso que el flujo aumente por sobre lo establecido (en caso de lluvias por ejemplo)

**Porcentaje de llenado** Dado que el porcentaje de llenado de carriers es un parámetro flexible, es importante estudiar su impacto en el dimensionamiento del reactor. Originalmente se escoge un llenado del 30 %, puesto que es un valor conservador. [36]

Se escoge como escenario optimista un 45 % de llenado, puesto que este es utilizado en plantas a escala industrial. [31] Se analiza además un segundo caso optimista del 70 % de llenado, el cual corresponde al máximo posible. No se analiza un caso pesimista puesto que el 30 % es el menor recomendado. [2,38] En la Tabla 3.14 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.14: Análisis de sensibilidad para el porcentaje de llenado de carriers

Escenario	Variación variable [%]	Carrier fill [%]	Volumen reactor [L]	Variación volumen [%]
Optimista	+133	70	2,62	-57
Optimista	+50	45	4,08	-33
Caso base	0	30	6,12	0

En este caso se tiene una menor disminución del volumen del reactor al modificar la variable en una misma proporción que con los parámetros anteriores, por lo cual el dimensionamiento es menos sensible al llenado de carriers que a las variables analizadas anteriormente.

Dado que el porcentaje de llenado influye en la cantidad total de biomasa presente en el reactor, es importante definir este parámetro de forma adecuada. Se recomienda entonces definir el área potencial de biopelícula deseada y escoger este parámetro acordemente, cuidando que no exceda el 70 % recomendado. Es posible además diseñar para un llenado conservador y dejar un volumen de seguridad en caso que sea necesario aumentar la cantidad de *carriers* utilizados.

## Capítulo 4: Conclusión y Recomendaciones

El proceso planteado permite remover bifenilo desde muestras de agua, lo cual entrega una primera aproximación al tratamiento de PCBs en aguas residuales.

Se estudia el crecimiento de biopelículas de *Burkholderia xenovorans* en carbón activo, biochar de pino y *carriers* de PLA, logrando en todos los casos un crecimiento mayor en biopelícula que en suspensión. Se tiene el mayor crecimiento de biopelícula total en adherencia al carbón activo, alcanzando una concentración de  $1,04 \times 10^{10}$  [UFC/mL] mientras que en *carriers* de PLA y biochar de pino se tienen concentraciones máximas de  $7,72 \times 10^9$  [UFC/mL] y  $8,07 \times 10^9$  [UFC/mL] respectivamente.

Del desarrollo de este trabajo se concluye que tanto los soportes por si solos como la biopelícula de *Burkholderia Xenovorans* permiten remover bifenilo desde las aguas. Al utilizar la biopelícula creciendo en los distintos soportes se logra un mayor porcentaje de remoción en cada caso, aumentando la remoción en un 0,025 %, 1,615 % y 1,484 % para los *carriers* de PLA, carbón activo y biochar de pino respectivamente en comparación al soporte sin crecimiento de bacterias. Se logra una mayor remoción mediante el uso de *carriers* de PLA y biochar de pino, eliminando un 99,99 % del bifenilo total. Para el carbón activo se logran remociones del 99,90 %.

Se dimensiona un reactor de biopelícula de lecho móvil para el tratamiento de PCBs en una planta industrial, considerando como caso base el tratamiento de un 50 % del flujo tratado biológicamente en la planta Mapocho. Se obtienen volúmenes de 6,12 [L] para el caso del carbón activo, 7,73 [L] para los *carriers* de PLA y 9,99 [L] para el biochar de pino. Se tiene una diferencia de 5 ordenes de magnitud con los reactores actualmente utilizados para tratar flujos similares debido a la falta de constantes de diseño específicas para la remoción de contaminantes orgánicos.

Si bien los resultados obtenidos permiten concluir que las biopelículas de *Burkholderia xenovorans* en distintos soportes son un buen mecanismo para remover bifenilos del agua, se requieren experimentos adicionales para asegurar el correcto funcionamiento a escala industrial.

Para continuar con la siguiente fase de este proyecto se recomienda estudiar el crecimiento de biopelícula mediante técnicas como DAPI para asegurar un crecimiento total de células vivas. Se recomienda medir la remoción de PCBs más complejos y medir los intermediarios generados a partir de su metabolismo para cuantificar concretamente la cantidad de PCBs degradados mediante la biopelícula versus la cantidad adsorbida. Finalmente se recomienda realizar experimentos en modo de operación continuo para estimar correctamente un flujo de remoción por área superficial acorde al proceso de remoción estudiado.

# Bibliografía

- [1] S. C. Fusi, A. Y. Chan, y B. V. Kjellerup, “Processes of microbial transformation and physical removal of polychlorinated biphenyls (PCBs) in wastewater treatment,” en *Optimization and Applicability of Bioprocesses*, pp. 101–113, Springer, 2017.
- [2] H. Ødegaard, B. Rusten, y T. Westrum, “A new moving bed biofilm reactor-applications and results,” *Water Science and Technology*, vol. 29, no. 10-11, p. 157, 1994.
- [3] B. Rusten, B. Eikebrokk, Y. Ulgenes, y E. Lygren, “Design and operations of the kaldnes moving bed biofilm reactors,” *Aquacultural engineering*, vol. 34, no. 3, pp. 322–331, 2006.
- [4] V. Deneff, J. Park, T. Tsoi, J.-M. Rouillard, H. Zhang, J. Wibbenmeyer, W. Verstraete, E. Gulari, S. Hashsham, y J. Tiedje, “Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in burkholderia xenovorans lb400,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 8, pp. 4961–4970, 2004.
- [5] B. Nabavi, M. Nikaeen, M. Amin, y H. Farrokhzadeh, “Biological treatment of polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminated transformer oil by anaerobic–aerobic sequencing batch biofilm reactors,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 85, pp. 451–457, 2013.
- [6] CONAMA, “Plan nacional de implementación para la gestión de los contaminantes orgánicos persistentes en Chile,” 2005.
- [7] H. Bouju, G. Buttiglieri, y F. Malpei, “Perspectives of persistent organic pollutants (POPS) removal in an MBR pilot plant,” *Desalination*, vol. 224, no. 1-3, pp. 1–6, 2008.
- [8] K. R. Sowers y H. D. May, “In situ treatment of PCBs by anaerobic microbial dechlorination in aquatic sediment: are we there yet?,” *Current opinion in biotechnology*, vol. 24, no. 3, pp. 482–488, 2013.
- [9] S. J. Edwards y B. V. Kjellerup, “Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, no. 23, pp. 9909–9921, 2013.
- [10] J. Borja, J. Auresenia, y S. Gallardo, “Biodegradation of polychlorinated biphenyls using biofilm grown with biphenyl as carbon source in fluidized bed reactor,” *Chemosphere*,

- vol. 64, no. 4, pp. 555–559, 2006.
- [11] N. Das, L. V. G. Basak, J. A. Salam, y M. Abigail, “Application of biofilms on remediation of pollutants—an overview,” *J. Microbiol. Biotechnol. Res*, vol. 2, pp. 783–790, 2012.
- [12] P. L. Lallas, “The stockholm convention on persistent organic pollutants,” *American Journal of International Law*, vol. 95, no. 3, pp. 692–708, 2001.
- [13] W. H. Organization *et al.*, “Air quality guidelines for europe.” WHO, 2000.
- [14] W. Y. Shiu y D. Mackay, “A critical review of aqueous solubilities, vapor pressures, henry’s law constants, and octanol–water partition coefficients of the polychlorinated biphenyls,” *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 15, no. 2, pp. 911–929, 1986.
- [15] D. Supremo, “Promulga el convenio de estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y sus anexos,” 2005.
- [16] O. Hutzinger, *The Chemistry of PCB’S*. CRC press, 2018.
- [17] B. Ulbrich y R. Stahlmann, “Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data,” *Archives of toxicology*, vol. 78, no. 5, pp. 252–268, 2004.
- [18] R. Jing, S. Fusi, y B. V. Kjellerup, “Remediation of polychlorinated biphenyls in contaminated soils and sediments: State of knowledge and perspectives,” *Frontiers in Environmental Science*, vol. 6, p. 79, 2018.
- [19] CONAMA, “Manual de chile para el manejo de bifenilos policlorados (PCBs; askareles) un estudio de casos sobre la aplicación de aguas,” 2004.
- [20] H. I. Gomes, C. Dias-Ferreira, y A. B. Ribeiro, “Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application,” *Science of the Total Environment*, vol. 445, pp. 237–260, 2013.
- [21] U. S. E. P. Agency, “PCB regulations at 40 c.f.r part 761.” Toxic Substances Control Act, 2012.
- [22] G. Robinson y M. Lenn, “The bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): problems and perspectives,” *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 12, no. 1, pp. 139–188, 1994.
- [23] P. S. Kulkarni, J. G. Crespo, y C. A. Afonso, “Dioxins sources and current remediation technologies—a review,” *Environment international*, vol. 34, no. 1, pp. 139–153, 2008.
- [24] J. F. Brown, D. L. Bedard, M. J. Brennan, J. C. Carnahan, H. Feng, y R. E. Wagner, “Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments,” *Science*, vol. 236, no. 4802, pp. 709–712, 1987.



- [25] J. K. Sharma, R. K. Gautam, S. V. Nanekar, R. Weber, B. K. Singh, S. K. Singh, y A. A. Juwarkar, "Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 17, pp. 16355–16375, 2018.
- [26] S. Agarwal, S. R. Al-Abed, y D. D. Dionysiou, "In situ technologies for reclamation of PCB-contaminated sediments: current challenges and research thrust areas," 2007.
- [27] F. P. Chávez, F. Gordillo, y C. A. Jerez, "Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls," *Biotechnology advances*, vol. 24, no. 3, pp. 309–320, 2006.
- [28] L. Agulló, B. Cámara, P. Martínez, V. Latorre, y M. Seeger, "Response to (chloro) biphenyls of the polychlorobiphenyl-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins also induced by heat shock and oxidative stress," *FEMS microbiology letters*, vol. 267, no. 2, pp. 167–175, 2007.
- [29] B. Chirino, "Estudio funcional de la via de degradación de 2-aminofenol presente en *Burkholderia Xenovorans* LB400 y sus posibles aplicaciones en biotecnología ambiental," Tesis para optar al grado de magister, Universidad de Chile, Valparaiso, Chile, 2009.
- [30] V. Deneff, M. Patrauchan, C. Florizone, J. Park, T. Tsoi, W. Verstraete, J. Tiedje, y L. Eltis, "Growth substrate-and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and c1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400," *Journal of bacteriology*, vol. 187, no. 23, pp. 7996–8005, 2005.
- [31] J. P. McQuarrie y J. P. Boltz, "Moving bed biofilm reactor technology: process applications, design, and performance," *Water Environment Research*, vol. 83, no. 6, pp. 560–575, 2011.
- [32] S. Adabju, "Specific moving bed biofilm reactor for organic removal form synthetic municipal wastewater," Tesis para optar al grado de magister, University of Technology, Sydney, Australia, 2013.
- [33] B. P. Sahariah y S. Chakraborty, "Kinetic analysis of phenol, thiocyanate and ammonia-nitrogen removals in an anaerobic–anoxic–aerobic moving bed bioreactor system," *Journal of hazardous materials*, vol. 190, no. 1-3, pp. 260–267, 2011.
- [34] E. H. Koupaie, M. A. Moghaddam, y S. Hashemi, "Post-treatment of anaerobically degraded azo dye acid red 18 using aerobic moving bed biofilm process: enhanced removal of aromatic amines," *Journal of hazardous materials*, vol. 195, pp. 147–154, 2011.
- [35] B. Dong, H.-Y. Chen, Y. Yang, Q.-b. He, y X.-H. Dai, "Biodegradation of polychlorinated biphenyls using a moving-bed biofilm reactor," *CLEAN–Soil, Air, Water*, vol. 43, no. 7, pp. 1078–1083, 2015.
- [36] H. Bengston, "Biological wastewater treatment processes ii: MBBR processes." Continuing Education and Development, Inc., 2012.

- [37] O. Elliott, S. Gray, M. McClay, B. Nassief, A. Nunnelley, E. Vogt, J. Ekong, K. Kardel, A. Khoshkhoo, G. Proaño, *et al.*, “Design and manufacturing of high surface area 3d-printed media for moving bed bioreactors for wastewater treatment,” *Journal of Contemporary Water Research & Education*, vol. 160, no. 1, pp. 144–156, 2017.
- [38] H. Ødegaard, “The moving bed biofilm reactor,” *Water Environmental Engineering and Reuse of Water*, pp. 250–305, 1999.
- [39] A. Aygun, B. Nas, y A. Berktaç, “Influence of high organic loading rates on COD removal and sludge production in moving bed biofilm reactor,” *Environmental Engineering Science*, vol. 25, no. 9, pp. 1311–1316, 2008.
- [40] G. Z. Syed Qasim, *Wastewater Treatment and Reuse*. CRC Press, 2017.
- [41] H. Ødegaard, “MBBR and IFAS systems,” en *Advances in Wastewater Treatment* (M. Giorgio, E. George, Ø. Hallvard, y O. Gustaf, eds.), ch. 3, pp. 101–154, London: IWA Publishing, 2018.
- [42] M. Makowska, M. Sychała, y R. Mazur, “Removal of carbon and nitrogen compounds in hybrid bioreactors,” en *Biomass Now-Cultivation and Utilization*, IntechOpen, 2013.
- [43] L. Lonappan, T. Rouissi, R. K. Das, S. K. Brar, A. A. Ramirez, M. Verma, R. Y. Surampalli, y J. R. Valero, “Adsorption of methylene blue on biochar microparticles derived from different waste materials,” *Waste management*, vol. 49, pp. 537–544, 2016.
- [44] A. Mercier, G. Wille, C. Michel, J. Harris-Hellal, L. Amalric, C. Morlay, y F. Battaglia-Brunet, “Biofilm formation vs. pcb adsorption on granular activated carbon in pcb-contaminated aquatic sediment,” *Journal of Soils and Sediments*, vol. 13, no. 4, pp. 793–800, 2013.
- [45] B. Kjellerup y S. Edwards, “Application of biofilm covered activated carbon particles as a microbial inoculum delivery system for enhanced bioaugmentation of pcbs in contaminated sediment,” tech. rep., GOUCHER COLL BALTIMORE MD, 2013.
- [46] A. andinas, “Planta de tratamiento de aguas servidas mapocho: Memoria de dimensionamiento de la planta.” Proyecto 16700, 2010.
- [47] T.-T. Pham y S. Proulx, “Pcbs and pahs in the montreal urban community (quebec, canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the st lawrence river,” *Water Research*, vol. 31, no. 8, pp. 1887–1896, 1997.
- [48] M. Yao, Z. Li, X. Zhang, y L. Lei, “Polychlorinated biphenyls in the centralized wastewater treatment plant in a chemical industry zone: source, distribution, and removal,” *Journal of Chemistry*, vol. 2014, 2014.
- [49] P.-A. Bergqvist, L. Augulytė, y V. Jurjonienė, “Pah and pcb removal efficiencies in umeå (sweden) and šiauliai (lithuania) municipal wastewater treatment plants,” *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 175, no. 1-4, pp. 291–303, 2006.

- [50] S. L. Capozzi, R. Jing, L. A. Rodenburg, y B. V. Kjellerup, “Positive matrix factorization analysis shows dechlorination of polychlorinated biphenyls during domestic wastewater collection and treatment,” *Chemosphere*, vol. 216, pp. 289–296, 2019.
- [51] M. Yenkie y G. Natarajan, “Determination of specific surface area of granular activated carbon by aqueous phase adsorption of phenol and from pore size distribution measurements,” *Separation science and technology*, vol. 28, no. 5, pp. 1177–1190, 1993.
- [52] W. P. Schoor, *Theoretical Model and Solubility Characteristics of Aroclor 1254 in Water: Problems Associated with Low-Solubility Compounds in Aquatic Toxicity Tests*, vol. 74. National Environmental Research Center, 1974.
- [53] Metcalf, I. Eddy, T. Asano, F. L. Burton, H. Leverenz, R. Tsuchihashi, y G. Tchobanoglous, *Water reuse*. McGraw-Hill Professional Publishing, 2007.

# Anexos

## A. Metabolismo de bifenilo por cepa LB400

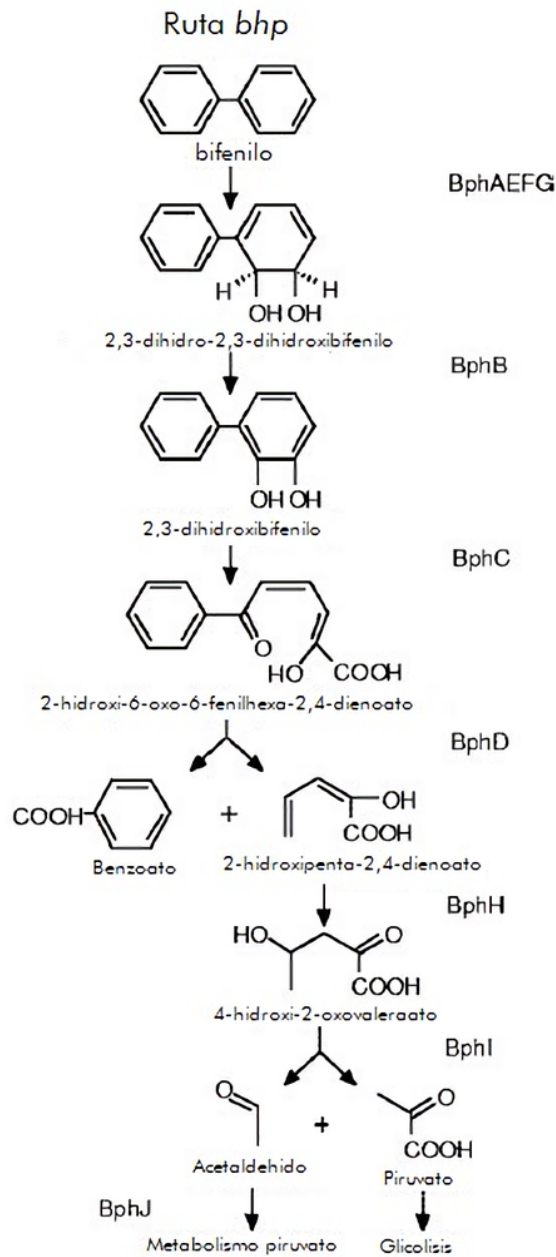


Figura A.1: Ruta metabólica *bhp* [4]

## B. Medio mínimo M9

### B.1. Medio líquido

Se preparan inicialmente las sales del medio M9 de forma concentrada, utilizando los reactivos y cantidades indicadas en la Tabla A.1. Estos se mezclan en 1L de agua destilada, se agita y se ajusta el pH entre 7 y 7.4 para finalmente esterilizar.

Tabla A.1: Preparación de sales medio mínimo M9 concentrado

Reactivo	Cantidad [g]
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	64
$KH_2PO_4$	15
NaCl	2,5
$NH_4Cl$	5

Para preparar 100 mL de medio de cultivo se agregan 20 mL de las sales concentradas, 200  $\mu$ L de  $MgSO_4$  1M estéril, 10  $\mu$ L de  $CaCl_2$  1M estéril y 80 mL de agua destilada. En caso que se utilice glucosa como fuente de carbono, se reemplazan 2 mL de agua por glucosa al 20 %.

### B.2. Medio sólido

Se preparan por un lado las sales del medio siguiendo lo indicado en la Tabla A.2 y se disuelven en 478 mL de agua . Por otro lado se prepara la solución de agar, para lo cual se utilizan 15 g de agar en 500 mL de agua. Ambas soluciones se esterilizan en autoclave a 121°C.

Tabla A.2: Preparación de sales medio mínimo M9

Reactivo	Cantidad [g]
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	12,8
$KH_2PO_4$	3
NaCl	0,5
$NH_4Cl$	1

Una vez estériles las soluciones, estas se mezclan y se agregan 2 mL de  $MgSO_4$  1M estéril y 0,1 mL de  $CaCl_2$  1M estéril. Esta solución se coloca en placas a las cuales previamente se les añadieron 340  $\mu$ L de bifenilo 1.5 M en acetona, la cual se deja evaporar.

## C. Curva de calibración

Tabla A.3: Valores obtenidos para la curva de calibración

Concentración [M]	Promedio intensidad fluorescencia	Desviación estandar
0,005	3476,91	522,93
0,0005	1295,81	267,58
0,00005	208,18	91,98
0,000005	21,06	21,60
0,0000005	6,32	11,76

## D. Cálculo biopelícula total adherida a cada material soporte

La biopelícula total adherida a cada material se calcula bajo el supuesto que todo el material se encuentra uniformemente cubierto por la biopelícula. Se asume entonces que por gramo de material se tiene la misma concentración de bacterias.

Para cada material se pesaron las muestras de biopelícula tomadas. Estos datos se utilizaron para calcular el número de colonias por gramo, para luego obtener el número de colonias totales al multiplicar por la cantidad total de material añadido a cada cultivo. En la ecuación (4.1) se muestra el procedimiento descrito.

$$N^{\circ} \text{ Colonias totales} = \frac{N \cdot \text{peso muestra}}{\text{peso total}} \quad (4.1)$$

Donde  $N$  corresponde al número de colonias contadas.

Finalmente, para obtener las concentraciones totales de biopelícula se utiliza la ecuación (2.1) reemplazando  $N$  por el  $N^{\circ}$  Colonias totales.

En las Tablas A.4 y A.5 se detallan los pesos de cada muestra para el carbón activo y biochar de pino. Para los *carriers* de PLA se tiene un peso de 2,35 [g].

Tabla A.4: Peso muestras carbón activo con biopelícula en triplicado

Muestra	Peso [g]		
	1	2	3
0	0,0663	0,1174	0,1072
1	0,0206	0,0425	0,0878
2	0,025	0,0572	0,0586
3	0,0342	0,0579	0,0528
4	0,0436	0,0418	0,0778
5	0,0722	0,0662	0,0508
6	0,0576	0,0671	0,0368
7	0,0157	0,0207	0,0694
8	0,0494	0,0651	0,0717
9	0,0381	0,0252	0,0573

Tabla A.5: Peso muestras biochar de pino con biopelícula en triplicado

Muestra	Peso [g]		
	1	2	3
0	0,017	0,017	0,017
1	0,022	0,023	0,026
2	0,017	0,019	0,011
3	0,02	0,027	0,021
4	0,028	0,046	0,014
5	0,024	0,03	0,017
6	0,016	0,031	0,022
7	0,046	0,041	0,022
8	0,025	0,035	0,024

## E. Cálculo área superficial específica

Las áreas superficiales específicas del carbón activo y del biochar de pino se obtienen a partir del parámetro  $Q_0$  del ajuste de Langmuir realizado para las isotermas de adsorción. Este parámetro indica la capacidad de monocapa que presenta el adsorbente y es posible establecer una relación entre esta capacidad y el área superficial específica del material. [51] En la ecuación (4.2) se muestra esta relación

$$S = Q_0 \cdot N_A \cdot A \quad (4.2)$$

Donde  $S$  corresponde al área superficial específica en [ $m^2/g$ ],  $Q_0$  a la capacidad de adsorción en [ $mg/g$ ],  $N_A$  a la constante de avogadro y  $A$  al área transversal de una molécula de bifenil en [ $m^2$ ].

Finalmente para obtener el área superficial específica en [ $m^2/m^3$ ] se multiplica el valor obtenido por la densidad del material.

En la Tabla A.6 se muestran los datos utilizados para calcular las áreas superficiales específicas del carbón activo y del biochar de pino.

Tabla A.6: Datos utilizados para calcular áreas superficiales

	Carbón activo	Biochar	Referencia
A [ $nm^2$ ]	0,356		[52]
$Q_0$ [mg/g]	0,0029	0,17	ver Tabla 3.2
$\rho$ [ $kg/m^3$ ]	400	6,74	[43, 53]

## F. Cálculo dimensionamiento MBBR

Para dimensionar el reactor de biopelícula de lecho móvil se utiliza la ecuación (1.3), la cual permite obtener el volumen en función de parámetros encontrados en bibliografía y valores obtenidos a partir de los experimentos realizados.

A continuación se muestra el cálculo realizado tomando como ejemplo los valores utilizados para el carbón activo. En la Tabla A.7 se resumen los valores utilizados

Tabla A.7: Variables y valores utilizados para dimensionar reactor con carbón activo como soporte

Variable	Valor	Unidad
$Q$	102613	$[\frac{m^3}{d}]$
$S_0$	18	$[\frac{ng}{L}]$
$E$	0,9990	[-]
$SARF$	0,6	$[\frac{gr}{m^2 \cdot d}]$
$A_{spec}$	1654	$[\frac{m^2}{m^3}]$
$f$	0,3	[-]

$$V_{MBBR} = \frac{Q \cdot S_0 \cdot E}{SARF \cdot A_{spec} \cdot f} \cdot 100$$

$$V_{MBBR} = \frac{102613[\frac{m^3}{d}] \cdot 18[\frac{ng}{L}] \cdot \frac{1[gr]}{10^9[ng]} \cdot \frac{1000[L]}{1[m^3]} \cdot 0,9990}{0,6[\frac{gr}{m^2 \cdot d}] \cdot 1654[\frac{m^2}{m^3}] \cdot 0,3} \cdot 100$$

$$V_{MBBR} = 0,062[m^3]$$

$$V_{MBBR} = 6,20[L]$$

Los demás volúmenes se calculan de forma similar, variando el porcentaje de remoción, el área superficial específica y el SARF según corresponde.