



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIOREACTOR BATCH AEROBIO
PARA CULTIVO DE BACTERIAS BIODEGRADORAS DE
PETRÓLEO”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTADO POR

**MARÍA FERNANDA RIVERA CASTILLO
DENNIS PATRICIO SUÁREZ REA**

**RIOBAMBA – ECUADOR
2010**

DEDICATORIA

A mi Dios quién ha sido mi gran fortaleza en los momentos difíciles y me ha dado la sabiduría y discernimiento necesario en este largo camino.

A mis padres, Rocío Castillo y Eduardo Rivera, que con su amor, su apoyo incondicional y la confianza brindada, me dieron la oportunidad de alcanzar este gran logro.

A mis hermanos, que de una u otra manera supieron apoyarme en todo momento y ellos son mi inspiración para seguirme superando.

A todos los que confiaron en mí y supieron apoyarme, a quienes caminaron a mi lado en toda mi carrera en especial a Iván (por su amor, paciencia y apoyo en los buenos y malos momentos), mis abuelitos y tíos.

Fer Ri.

A mis padres: Isabel Rea y Plutarco Suarez por su ayuda incondicional, y su amor brindado en todos los momentos de mi vida ya que sin ellos no fuera posible este gran paso.

A mis hermanos en especial a Marcela, Maritza que con su ejemplo supieron inculcar en mi, valores morales y éticos.

A todos por el apoyo brindado en mis estudios universitarios, haciendo posible la terminación de mi carrera profesional.

Dennis S.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradecemos a Dios, por haber guiado nuestros pasos hasta esta etapa tan importante para nuestras vidas. A nuestras familias que con su apoyo incondicional supieron entregarnos todo su amor y comprensión.

De igual manera al Director de Tesis, y miembros del Tribunal quienes aportaron para la culminación de este trabajo de investigación.

No podemos dejar de dar las gracias a esas personas que siempre estuvieron con nosotros, que compartieron nuestras penas y alegrías, que fuimos avanzando y superando juntos todas las etapas de este proceso educativo, nuestros amigos y profesores.

Agradecemos al Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) que auspició este proyecto de Tesis; de manera especial a su Director Dr. Roberto Erazo y Dra. Nancy Veloz.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Díaz

DECANA FAC. CIENCIAS

Ing. Mario Villacrés

DIRECTOR ESC. ING. QUÍMICA

Ing. Mario Villacrés

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Roberto Erazo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Tlgo. Carlos Rodríguez

DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN

“Yo *María Fernanda Rivera Castillo*, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis de Grado; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO”

MARÍA FERNANDA RIVERA CASTILLO

“Yo *Dennis Patricio Suarez Rea*, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis de Grado; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO”

DENNIS PATRICIO SUÁREZ REA

INDICE DE ABREVIATURAS

A	Área de transferencia de calor
H_p	Alto de la paleta
C_p	Capacidad calorífica
q	Cantidad de calor
C	Grados centígrados
cm	Centímetros
ΔT	Gradiente de Temperatura
T_e	Temperatura de esterilización
P_e	Presión de esterilización
E_R	Espesor del rodete
Fig.	Figura
V_r	Volumen real
V_t	Volumen total
V_c	Volumen camisa
V_{rc}	Volumen real de la camisa
h	Altura de la cámara de cultivo
h_{f-r}	Altura entre el fondo del fermentador y el rodete
f_s	Factor de corrección
A	Agua
B	Nutrientes
C	Inoculo
D	Descarga
g	Gramos
H	Entalpía
%	Porcentaje
J	Joules
K	Conductividad térmica
Kg	Kilogramos
L	Longitud del eje
L_p	Largo de la paleta
L_B	Longitud del brazo

ml	Mililitros
min	Minutos
m	Metros
m ²	Metros cuadrados
N	Velocidad rotacional rpm
N_R	Número de Reynolds
N_{Pr}	Número de Prandtl
N_p	Numero de potencia
P	Potencia del agitador
Pa	Pascales
Q	Caudal
Rpm	Revoluciones por minuto
r	Radio del tanque
s	Segundos
T	Temperatura
T_a	Temperatura inicial
T_b	Temperatura final
V_R	Volumen Real de la cámara de calefacción
μ	Viscosidad
μ_w	Viscosidad del fluido a la temperatura de la pared
U	Coficiente de transferencia de calor
ρ	Densidad
π	Pi
D_r	Diámetro del rodete
d	Diámetro del tanque
D	Diámetro interno del tanque
D_r	Diámetro del rodete
W	Watts
a, b, m	Constantes según el tipo de agitador

TABLA DE CONTENIDO

	Pp.
RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
ANTECEDENTES.....	iii
JUSTIFICACIÓN.....	v
OBJETIVOS.....	vii
GENERAL.....	vii
ESPECIFICOS.....	vii
CAPITULO I	
1 MARCO TEÓRICO.....	2
1.1 MICROORGANISMOS BIODEGRADADORES DE PETRÓLEO.....	2
1.1.1. Microorganismos degradadores de petróleo.....	3
1.1.2. Condiciones de cultivo de las bacterias.....	5
1.1.3. Factores que afectan la biodegradación de crudo.....	6
1.2 BIORREMEDIACIÓN.....	6
1.3 BIORREACTOR.....	7
1.3.1 Clasificación de los biorreactores.....	7
1.3.2 Biorreactores y tipos de cultivo.....	9

	Pp.
1.4 MODO DE OPERACIÓN Y SISTEMAS DE CULTIVO.....	10
1.5 DISEÑO DE BIORREACTORES.....	11
1.5.1. Componentes básicos para el diseño del reactor.....	12
1.5.1.1.Sistema de aireación.....	13
1.5.1.2.Sistema de control de temperatura.....	15
1.5.1.3.Sistema de agitación.....	17
1.5.1.4.Sistemas de intercambio térmico.....	23
1.5.2. Presión interna.....	25
1.6 CONTROL AUTOMATICO DE PROCESOS.....	26
1.6.1 Términos importantes del control automático de procesos.....	26
1.1.2 Componentes básicos de un sistema de control.....	27
1.1.3 Controladores lógicos programables (PLC).....	27
1.1.4 Razones principales para el control de procesos.....	28
CAPITULO II	
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	29
2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.....	29
2.2 MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	29

	Pp.
2.2.1 Métodos.....	29
2.2.2 Técnicas.....	31
2.3 DATOS OBTENIDOS PARA EL DISEÑO.....	40
2.3.1 Variables de proceso.....	40
 CAPITULO III	
3 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN.....	42
3.1 CÁLCULOS PARA EL DISEÑO DEL REACTOR.....	42
3.1.1 Cálculos del volumen de la cámara de cultivo.....	42
3.1.2 Cálculo de la altura de la cámara de cultivo.....	42
3.1.3 Cálculo del volumen de la camisa.....	43
3.1.4 Cálculo del volumen real de la camisa.....	43
3.1.5 Cálculo para el sistema de agitación.....	44
3.1.6 Cálculo de la potencia del agitador.....	46
3.1.7 Cálculo para determinar el calor necesario para calentar el sustrato.....	50
3.2 BALANCE SIMULTÁNEO DE MASA Y ENERGÍA.....	50

	Pp.
3.2.1 Balance de masa.....	51
3.2.2 Balance de energía.....	52
3.3 DIMENSIONAMIENTO.....	54
3.4 AUTOMATISMO Y TIPOS DE MATERIALES.....	55
3.4.1 Automatismo.....	55
3.4.2 Tipos de materiales.....	57
3.4.2.1 Materiales para el equipo.....	57
3.4.2.2 Materiales para automatización.....	58
3.5 REQUERIMIENTO PRESUPUESTARIO.....	59
3.5.1 Recursos humanos.....	59
3.5.2 Recursos materiales.....	59
3.5.3 Recursos totales.....	60
3.6 RESULTADOS.....	60
3.6.1 Pruebas de validación del equipo.....	60
3.6.1.1 Pruebas de esterilización del reactor, contando con el vapor de un caldero.....	60
3.6.1.2 Pruebas de masificación de las bacterias biodegradadoras de petróleo.....	63
3.6.1.3 Pruebas en el campo.....	65

CAPITULO IV

	Pp.
4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	66

CAPITULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
5.1 CONCLUSIONES.....	68
5.2 RECOMENDACIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

TABLA		Pp.
1.1.1-1	Principales microorganismos degradadores de petróleo.....	3
1.5.1.3-1	Intensidad o grado de agitación.....	22
2.2.2-1	Determinación de la temperatura.....	38
1.2.2-2	Determinación del pH.....	39
2.2.2-3	Determinación de la densidad del cultivo.....	39
2.2.2-4	Determinación de la viscosidad del cultivo.....	40
2.3.1-1	Variables del proceso.....	41
2.3.2-1	Datos adicionales.....	41
3.2.1-1	Datos para balance de masa.....	51
2.3-1	Dimensionamiento del reactor.....	55
3.4.2.1-1	Materiales utilizados en la construcción del reactor.....	57
3.4.2.2-1	Materiales utilizados en la automatización del reactor.....	58
3.5.1-1	Recursos humanos.....	59
3.5.2-1	Recursos materiales.....	59
3.5.3-1	Recursos totales.....	60
3.6.1.1-1	Tiempo y temperatura hasta alcanzar esterilización.....	61
3.6.1.1-2	Tiempo y temperatura hasta alcanzar esterilización.....	62
3.6.1.2-1	Tiempo y población bacteriana en el proceso.....	64

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pp.
3.1.1-1	Biodegradación.....	3
1.2-1	Diseños típicos de biorremediación ex situ e in situ.....	6
1.5-1	Diseño de Biorreactor.....	12
1.5.1.3-1	Agitadores de paleta.....	17
1.5.1.3-2	Sistema de Agitación.....	21
2.2.2-1	Toma de muestras de suelo contaminado con hidrocarburo para la elaboración de un consorcio bacteriano.....	32
2.2.2-2	Procesamientos de muestras de suelo en el laboratorio.....	32
2.2.2-3	Cepas bacterianas previo el aislamiento.....	33
2.2.2-4	Cepas bacterianas previo el aislamiento.....	33
2.2.2-5	Visualización características microscópica de las cepas bacterianas aisladas.....	34
2.2.2-6	Vial que contiene cepa bacteriana aislada.....	34
2.2.2-7	Bancos bacterianos de almacenamiento.....	34
2.2.2-8	Cepas bacterianas durante la prueba de actividad emulsificante.....	35
2.2.2-9	Cepas bacterianas durante la prueba de actividad degradativa.....	35
2.2.2-10	Prueba de antagonismo bacteriano.....	36
2.2.2-11	Pruebas de identificación bacteriana.....	37
2.2.2-12	Prehinóculo bacteriano.....	37
2.2.2-13	Pruebas de masificación.....	38
3.6.1.1-1	Temperatura en función del tiempo de esterilización.....	62
3.6.1.1-2	Temperatura en función del tiempo de esterilización.....	63
3.6.1.2-1	Población bacteriana en función del tiempo-curva de crecimiento.....	65

RESUMEN

Se diseñó y construyó un biorreactor batch aerobio para cultivar bacterias biodegradadoras de petróleo, para el Centro de Servicios Técnicos de Transferencia Tecnológica Ambiental “CESTTA” de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

El dimensionamiento del equipo se realizó en base a pruebas de laboratorio realizadas en el CESTTA, con las cuales, mediante variación de parámetros que intervienen en el proceso se establecieron las siguientes condiciones de funcionamiento: Trabaja con una temperatura de 35°C a $120^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Los cálculos de ingeniería se realizaron para determinar los volúmenes de la cámara de cultivo y de la camisa, potencia y características del sistema de agitación. De acuerdo con estos cálculos el biorreactor es de tipo Batch, de doble camisa, contiene un calderín con 2 resistencias eléctricas utilizada para el calentamiento y esterilización del cultivo, es controlado por termocuplas y PLC. El equipo tiene 100 L de capacidad, con un diámetro de 40 cm, y una altura de 46 cm, cuenta con una potencia del motor para la agitación de 0,48HP, se empleó para la estructura acero inoxidable AISI 304 de 4 mm de espesor.

Se obtuvo un Biorreactor Batch Aerobio, con las condiciones de operación requeridas, que realiza una producción de bacterias al 100%, teniendo un rendimiento de biodegradar el suelo tratado en un 90%. Convirtiéndose así en un equipo práctico para el desarrollo y crecimiento en el ámbito microbiológico para el CESTTA.

Es posible cultivar microorganismos en un biorreactor batch aerobio, logrando disminuir el costo de su obtención y controlando las variables que gobiernan la óptima realización del proceso de crecimiento bacteriano.

Se recomienda aplicar el Biorreactor Batch Aerobio para cultivar bacterias biodegradadoras de petróleo y de esta manera biorremediar suelos y evitar la contaminación ambiental.

SUMMARY

An aerobic batch bio-reactor was designed and constructed to grow biodegrading oil bacteria for the Environmental Technological Transfer technical Service Center CESTTA of the science Faculty of the Chimborazo carried out the basis of lab tests carried out at CESTTA with which through variation of parameters of the process the following functioning conditions were established: work with a temperature of 35C to 120C \pm 3C. The engineering calculi were carried out to determine the volumes of the culture chamber and of the cooling case, power and characteristics of the shaking system. According to these calculi the bio-reactor is Batch type, double chamber; it contains a little boiler with 2 electric resistances used for culture heating and sterilization; it is controlled by thermal couples and PLC.

The equipment has 100L capacity, with a diameter of 40cm and a height of 46 cm; it has a motor power for shaking of 0.48HP; it was used for the stainless steel AISI 304 structure, 4mm thick. The aerobic Batch bio-reactor was obtained with the required operation conditions, carrying out a bacteria production at 100% and having a degrading yield of the treated soil by 90%.

Thus it has become a practical equipment for development and growth in the microbiological field for the CESTTA. It is possible to grow microorganisms in an aerobic batch bio-reactor diminishing cost and controlling the variables which govern the optimum realization of the bacterial growth process. It is recommended to apply the Aerobic Batch Bio-reactor to grow biodegrading oil bacteria so as to bioremediate soils and avoid environmental contamination.

ANTECEDENTES

Como todos conocemos, los suelos amazónicos del Ecuador sufren periódicamente los efectos nocivos del derrame de hidrocarburos. Los sistemas naturales resultan seriamente dañados y la evacuación por medios físicos (como el drenaje) no es un remedio eficiente.

Frente a tal problema, desde 1995, biólogos y colaboradores del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Católica de Quito conjuntamente con el equipo de científicos de las facultades de Geología, Minas y Petróleos, han desarrollado técnicas que facilitan la recuperación de aquellos suelos, aprovechando el poder que tienen algunas bacterias para digerir incluso los componentes más dañinos del petróleo. Sin embargo, para lograr este objetivo fue necesario cultivar las bacterias en cantidades industriales y no contaron con los implementos técnicos necesarios por lo tanto se vieron en la necesidad de diseñar biorreactores para el cultivo de microorganismos.

En 1998 estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, realizaron un proyecto de Aplicación de filosilicatos y bacterias en áreas contaminadas con hidrocarburos, que consiste en aplicar bacterias en los grandes derrames para depurar los suelos y aguas invadidos por petróleo, para lo cual diseñaron un biorreactor para masificar las bacterias en cantidades mayores.

En la actualidad existen estudios previos al diseño y construcción de biorreactores o fermentadores de tipo Batch para el cultivo de microorganismos en la Facultad de Recursos Naturales en la ESPOCH, utilizados para control de plagas en la agricultura, pero no específicamente para microorganismos biodegradadores de petróleo.

En la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo se encuentra el CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICO AMBIENTAL “CESTTA”, ubicada en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

El Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) nace con el propósito de ayudar a la comunidad empresarial e industrial del país, a solucionar los diversos problemas que en su diario vivir enfrentan, mediante la oferta de soluciones viables y acorde a la realidad nacional, sin descuidar la calidad de nuestros servicios.

Con el fin de ayudar a la industria petrolera y a las empresas que comercializan los productos derivados de la misma, el CESTTA se encuentra calificado en la Dirección Nacional de protección Ambiental (DINAPA) y se encuentra acreditada por el Organismo de Acreditación Ecuatoriana (OAE). Disponiendo todos los recursos técnicos necesarios para el desempeño de las actividades que exige este organismo de control.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la contaminación de suelos por hidrocarburos se ha hecho necesario utilizar técnicas para biorremediación. Afortunadamente la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversas estrategias que pueden ser utilizadas con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema a solucionar.

Otro aspecto importante es para evitar los dispersantes químicos utilizados para favorecer la remediación de los ambientes contaminados ya que pueden causar un mayor impacto ecológico que el mismo derrame, por su toxicidad y recalcitrancia a la biodegradación. Por tanto, una mejor alternativa de solución es el proceso de biorremediación, que es el tratamiento biológico del suelo, aire y agua, mediante la biodegradación de compuestos tóxicos para transformarlos en compuestos de menor impacto ambiental. Así en la biodegradación de hidrocarburos, se utilizan bacterias o microorganismos con alta capacidad degradativa, las cuales deben ser cultivadas en biorreactores e inoculadas en los suelos contaminados para disminuir la concentración de hidrocarburos presentes en el ambiente y al mismo tiempo son inocuas para la salud y el medio ambiente.

Por esta razón se ha propuesto el diseño y construcción de un biorreactor aerobio batch que será usado en el cultivo de estos microorganismos.

El diseño en bioingeniería no es solo la aplicación de conceptos básicos y teóricos que conlleven a lograr un prototipo; para la realización íntegra de un modelo, otra gran parte, trata de la adaptación creativa y de la utilización del ingenio propio para lograr el objetivo de conjuntar el ambiente biológico de un cultivo vivo con el ambiente artificial de un dispositivo controlado; este es el resultado denominado biorreactor o reactor biológico.

Un biorreactor es por tanto un dispositivo biotecnológico que debe proveer internamente un ambiente controlado que garantice y maximice la producción y el crecimiento de un cultivo vivo.

La idea de emplear un biorreactor es para disminuir costos de obtención de microorganismos y costos de importación de equipos que en comparación con los costos que ocupa el diseño y construcción realizado en el Ecuador son mucho menores, el biorreactor debe por tanto suministrar los controles necesarios para que la operación o proceso (bioproceso) se lleve a cabo con economía, alto rendimiento (productividad) y en el menor tiempo posible, contando con todos los servicios que son necesarios para el cultivo, tales como mezclado, esterilizado, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control de temperaturas, etc.

OBJETIVOS

GENERAL

- Diseñar y construir un biorreactor batch aerobio para el cultivo de bacterias biodegradadoras de petróleo.

ESPECÍFICOS

- Conocer las condiciones óptimas de crecimiento de las bacterias biodegradadoras de petróleo.
- Efectuar los cálculos de ingeniería para el diseño del biorreactor y realizar el respectivo dimensionamiento del equipo.
- Determinar las especificaciones de los materiales utilizados en el equipo y para la automatización del mismo.
- Ejecutar el ensamble y armado del equipo.
- Verificar la implementación y validar el diseño del biorreactor.
- Determinar las curvas de crecimiento de los microorganismos, y comprobar la efectividad del equipo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MICROORGANISMOS BIODEGRADADORES DE PETRÓLEO

“Entre estos se encuentran los microorganismos que presentan una gran versatilidad metabólica al llevar a cabo reacciones muy variadas usando a veces aceptores y dadores de electrones que no se encuentran en organismos superiores. Esta versatilidad está relacionada con la rapidez que los microorganismos sufren mutaciones que modifican su maquinaria enzimática, los que le permite una gran adaptación a los cambios ambientales.

En la biorremediación los microorganismos transforman contaminantes orgánicos en sustancias inocuas, que pueden integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales.

Para la reproducción de estas bacterias se utilizan biorreactores para realizar la "bioaumentación", es decir reproducirlas: generalmente en ellos se utilizan poblaciones con varias de ellas para favorecer la adaptación en el ambiente a utilizar.

Esta bioaumentación puede realizarse "insitu"(en el mismo lugar del derrame) o "exsitu"(biorreactores).”¹

¹ CRUEGER, W., 1993. Biotecnología: Manual de microbiología Industrial, pp. 110-121

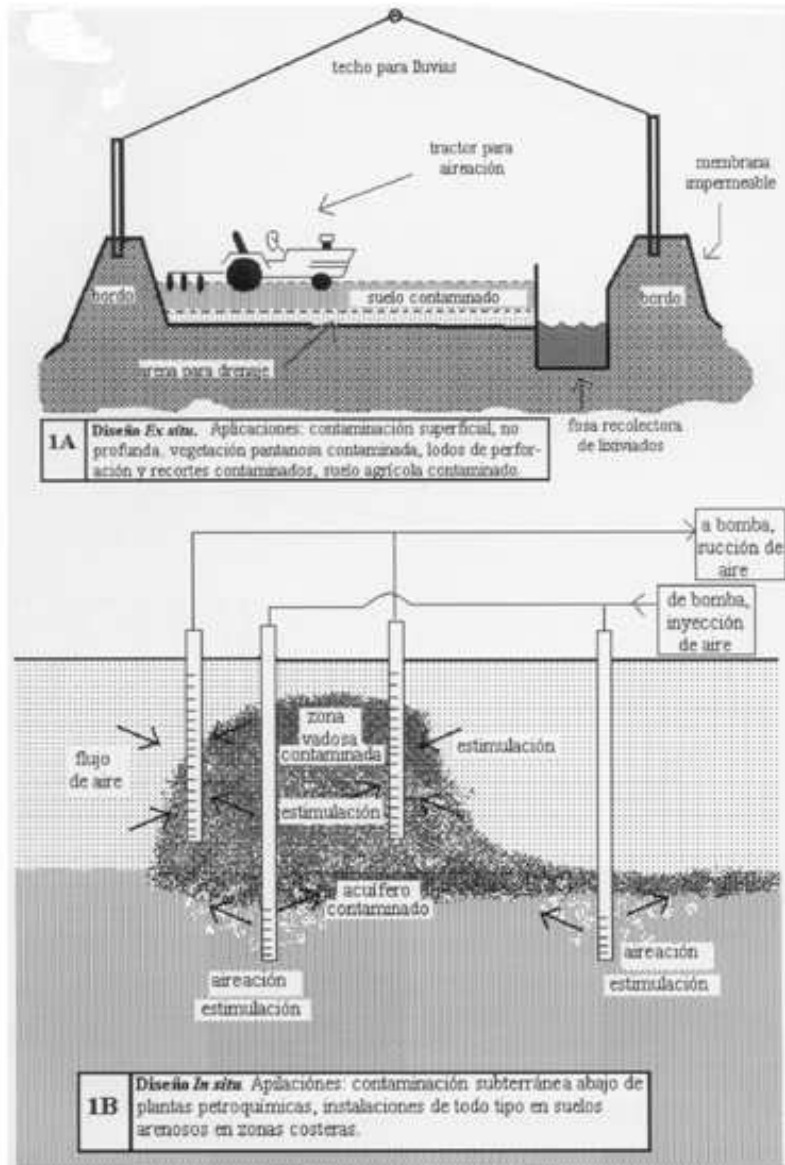


Fig. 1.1-1 Diseños típicos de biorremediación ex situ e in situ

1.1.1 PRINCIPALES MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO

Velocidad de degradación:

HC saturados > aromáticos ligeros > aromáticos de alto PM > asfaltenos, resinas

Tabla 4.1.1-1

Principales microorganismos degradadores de petróleo

Bacterias	Hongos
<i>Achrornobacter</i>	<i>Allescheria</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Aureobasidium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Botrytis</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Candida</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Brevebacterium</i>	<i>Debaromyces</i>
<i>Coryneforms</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Gonytrichum</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Hansenula</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Helminthosporium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Mucor</i>
<i>Leumthrix</i>	<i>Oidiodendrum</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Paecylomyces</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Phialophora</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodospiridium</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Spherotilus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Spirillum</i>	<i>Saccharomycopsis</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Scopulariopsis</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Xanthomyces</i>	<i>Torulopsis</i>

Fuente: Microorganismos Degradadores de Petróleo

<http://www.solociencia.com/biologia/microorganismosbiodegradadoresdepetroleo-industria.htm>

1.1.2 CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS BACTERIAS

Temperatura

- Las bacterias y los hongos crecen bien a temperaturas entre los 15 y los 45 °C.
- Decrecen a temperaturas por encima de los 45 o inferiores.
- Se inhiben a temperaturas inferiores a los 0 °C.

Oxígeno

- Su disponibilidad no suele ser limitante en ambientes marinos
- La biodegradación aerobia es mucho mayor que la anaerobia
- Depende de su ubicación en el ambiente, por ejemplo es mucho menor en sedimentos, playas de baja energía, etc.

Nutrientes

- Los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general suelen estar presentes en el suelo en cantidades suficientes, si no los hay es necesario añadirlos al suelo.
- Su disponibilidad suele ser mas limitante que la de O₂
- La mayoría de los ambiente marinos son deficiente en algunos nutriente esenciales como N, P o Fe
- Relación C/N/P necesaria: 120:10:1

pH

- El crecimiento de la mayoría de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH entre 6 y 8.

Humedad

- Los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su desarrollo.
- Un exceso de humedad puede reducir la concentración de oxígeno en el suelo inhibiendo el crecimiento bacteriano.

1.1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA BIODEGRADACIÓN DE CRUDO

- Rango de temperatura:

-2 - 35 °C

- Menor degradación a menor temperatura

25 - 5 °C; la velocidad de degradación disminuye 10 veces

- Menor volatilidad, mayor viscosidad

1.2 BIORREMEDIACIÓN

“La biorremediación es la adición de materiales a ambientes contaminados para producir una aceleración del proceso natural de biodegradación.

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. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas.”²

² Anderson, T., y Otros., 1993. Biorremediation. Environ. Sci. Technol, p.327



Fig. 1.2-1 Biodegradación

1.3 BIORREACTOR

Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados de acero inoxidable.

En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) al elemento que se cultiva.

CLASIFICACIÓN DE LOS BIORREACTORES

Clasificación Operativa

Tanto biorreactores como fermentadores se clasifican de acuerdo al modo de operación: discontinuo, semicontínuo, continuo. Esta es una clasificación operativa y se aplica a cualquier reactor, sea químico o biológico (biorreactor). En los reactores biológicos el modo de operación define el sistema de cultivo que es el mismo y delimita la clasificación procesal-productiva del bioproceso (cultivo). Al operar un biorreactor en una determinada categoría (discontínuo, semicontínuo, contínuo), automáticamente queda determinado el modo de cultivo del sistema y se definen los parámetros y las características operativas y de diseño que intervienen en el proceso productivo del sistema.

Clasificación Biológica

Los sistemas biológicos deben interactuar con el ambiente externo para poder crecer y desarrollarse; es por eso que los biorreactores se clasifican biológicamente de acuerdo al metabolismo procesal del sistema de cultivo: anaeróbico, facultativo, aeróbico. Los bioprocesos de cultivo y las fermentaciones están basados en el metabolismo celular del cultivo.

El metabolismo define los parámetros y características operativas-biológicas de diseño y de operación del biorreactor. Estas características son las que intervienen en la parte biológica del sistema y tienen que ver con el crecimiento, productividad y rendimiento del cultivo; por lo que, definen la clasificación biológica-procesal del sistema de cultivo.

Clasificación Biológica-Operativa

Ambas clasificaciones; la biológica y la operativa, son procesalmente interdependientes y en su conjunto afectan el diseño final del biorreactor. Al conjuntarse ambas clasificaciones, se conjuntan también la función operativa y la biológica para establecer entre ambas un propósito de utilización, el modo de cultivo y el bioproceso. Siendo el propósito de utilización, el destino de cultivo del biorreactor; para qué tipo de cultivo va a ser utilizado el biorreactor; el modo de cultivo es sinónimo de sistema de cultivo y el bioproceso es en sí, todo el proceso.

1.3.2 BIORREACTORES Y TIPOS DE CULTIVO

Cultivos y Fermentaciones

Lo primero que hay que entender en el diseño de reactores biológicos es que contrario a los químicos, su cinética no está determinada exclusivamente por la velocidad de reacción y las variables que la determinan. Aunque se puede describir de manera similar a la química, la cinética biológica también depende de características intrínsecas del organismo o cultivo tales como crecimiento y tasa de división celular, así como, del tipo de operación que se lleve a cabo. Por eso, lo primero que se define en el diseño de un biorreactor es el propósito

de utilización; es decir, que tipo de cultivo se va a utilizar, el modo de operar y/o el proceso de cultivo.

El conjunto biorreactor-sistema de cultivo debe cumplir con los siguientes objetivos:

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- Mantener constante y homogénea la temperatura.
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
- Prevenir la sedimentación y la floculación.
- Permitir la difusión de gases nutrientes a la velocidad requerida por el cultivo.
- Mantener el cultivo puro.
- Mantener un ambiente aséptico.
- Maximizar el rendimiento y la producción.
- Minimizar el gasto y los costos de producción.
- Reducir al máximo el tiempo.

Una fermentación es un proceso biológico o bioproceso que consiste en la descomposición de la materia orgánica por microorganismos fermentadores (bacterias y hongos).

Un cultivo también es un bioproceso; pero generalmente se asocia a organismos o microorganismos superiores (en orden jerárquico) a las bacterias; los cultivos son casi todos del Reino Eucariota.

Los sistemas biológicos que determinan el metabolismo celular de cultivo y el modo procesal-biológico del sistema son:

Células y microorganismos anaeróbicos

Bacterias en su gran mayoría, son microorganismos de metabolismo degradativo (catabólico); generalmente unicelulares, estos microorganismos son autónomos y nutricionalmente independientes (autótrofos); sus células (cuerpos) no respiran (no utilizan la glucólisis para la respiración celular), en cambio, utilizan vías alternas, donde una molécula orgánica, producida durante el proceso metabólico (catabolismo), es utilizada

como aceptor de electrones, en un proceso bioquímico conocido como respiración oxidativa; esta molécula es reducida a producto orgánico en un proceso comúnmente denominado fermentación.

Células y microorganismos facultativos

Son ambivalentes, tienen la capacidad de vivir o sobrevivir entre ambientes: aeróbico (presencia de oxígeno) y anaeróbico (ausencia de oxígeno); son microorganismos de metabolismo mixto por lo que, pueden tanto degradar (catabolismo) como construir (anabolismo) materia orgánica, a partir de diferentes sustratos (materia prima), tanto orgánicos como inorgánicos. Pese a su versatilidad, sus mayores representantes son microorganismos que presentan relaciones parásitas o simbiotes tales como: hongos y levaduras, por lo que no son muy extensos.

Células y microorganismos aeróbicos

Pertenecen en su mayoría al Reino Eucariota – pero también los hay procariota – son microorganismos y células que respiran (utilizan la glucólisis como forma de respiración celular); por lo que su metabolismo es constructivo (anabólico) y deben obtener sus nutrientes de diferentes fuentes. Sus principales grupos están representados por: bacterias y microorganismos aeróbicos, plantas y animales; cuyas células se puedan cultivar en suspensiones celulares o bien, en diferentes arreglos artificiales o modificadas.

1.4 MODO DE OPERACIÓN Y SISTEMAS DE CULTIVO

El modo de operación de un sistema de cultivo, es sinónimo del modo de operar del biorreactor o fermentador. Éste no solo influye en el diseño propio del reactor, también, en el modelo cinético de crecimiento del cultivo y en el proceso de producción. Existen tres modos de cultivo aunados a tres modos básicos de operación:

- **Discontinuo** (batch): por lotes o tandas, sin alimentación (F); se coloca dentro del biorreactor la carga total de cada proceso (tanda o lote) de cultivo o fermentación y

se dejar que se lleve a cabo el proceso productivo o la fermentación por el tiempo que sea necesario; el cuál se denomina tiempo de retención.

- **Semicontinuo** (feed batch): por lotes alimentados, con alimentación de entrada (F1); se alimenta una línea de entrada o alimentación (F1) para que el sistema de cultivo tenga un producto (biomasa) con máximo de crecimiento (exponencial) y aumente la productividad.
- **Continuo** (continuos): por quimioestado, se alimenta una línea de entrada F1 o alimentación y se drena una línea de salida F2 o lavado; de manera que los flujos o caudales de ambas líneas sean iguales y la producción sea continua.

1.5 DISEÑO DE BIORREACTORES

“El diseño de biorreactores es una tarea de ingeniería bastante compleja. Los microorganismos o células son capaces de realizar su función deseada con gran eficiencia bajo condiciones óptimas. Las condiciones ambientales de un biorreactor tales como flujo de gases (por ejemplo, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, etc.), temperatura, pH, oxígeno disuelto y velocidad de agitación o circulación, deben ser cuidadosamente monitoreadas y controladas.

La misma propagación celular puede afectar la esterilidad y eficiencia del biorreactor, especialmente en los intercambiadores de calor. Para evitar esto, el biorreactor debe ser fácilmente limpiable y con acabados lo más sanitario posible.”³

Los biorreactores industriales usualmente emplean bacterias u otros organismos simples que pueden resistir la fuerza de agitación. También son fáciles de mantener ya que requieren sólo soluciones simples de nutrientes y pueden crecer a grandes velocidades.

El biorreactor está provisto de un sistema de agitación, a demás se requiere de un sistema que inyecte aire en el cultivo.

³ ATKINSON B., 1983. Reactores Bioquímicos. pp: 36-59

El aire se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente.

El sistema de agitación se completa con cuatro o seis deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado.

El tanque está rodeado por una camisa por la que circula agua, lo que permite controlar la temperatura.

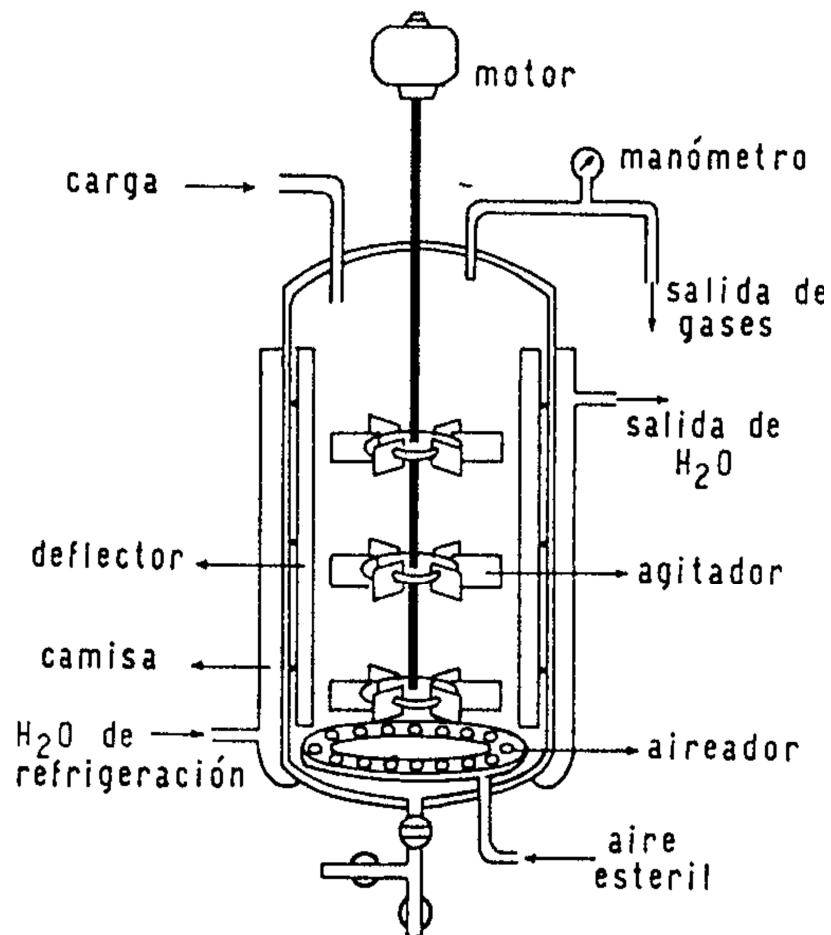


Fig. 1.5-1 Diseño de Biorreactor

1.5.1 COMPONENTES BÁSICOS PARA EL DISEÑO DEL REACTOR

El recipiente debe ser esterilizable, resistente a la corrosión, construido con materiales que no sean tóxicos (acero inoxidable).

Entrada/salida de aire o gases

Entrada del medio de cultivo y salida del producto obtenido

Alimentación del inóculo

Panel de control

Sistemas de agitación mecánica

1.5.1.1 Sistema de Aireación

El sistema de aireación externamente comprende las líneas de entrada F_i y salida de aire F_f e internamente debe optimizar la transferencia de gases nutrientes (aire) hacia el medio líquido. Un sistema de aireación consta de cuatro partes mecánicas: fuente de aire; tubería y filtros de entrada; boquilla y difusor de aire; tubería y filtros de salida. Y tres partes de control: control de flujo aire; control de presión de aire; control de difusión de oxígeno disuelto.

Fuente de Aire: dado que el sistema de aireación, en su conjunto, depende de la correcta elección del dispositivo que suministrará la fuente de aire, se siguieren dos opciones:

a) **Compresor de Aire:** su principal característica es que opera con: alta presión y bajo caudal de aire; por eso, cuando operan, es de manera continua o, cuando se requiere capacidad, debe haber un tanque de almacenamiento a alta presión como parte del sistema. Una segunda e importante característica es que produce un alto nivel de ruido $\approx 80\text{dB}$ y una tercera es que, si el compresor es de tipo pistón debe lubricarse con aceite, por lo que, ésta característica se incluye en el diseño como: autolubricado (oilless) o no lubricado (oil lubricated). Existen dos tipos de diseño constructivo para compresores de aire:

- El **compresor de diafragma:** está diseñado para un trabajo de operación continua; su presión operación es moderada ≈ 60 psia y como su nombre lo indica, utiliza un

diafragma o fuelle para impulsar y comprimir el aire. El compresor de diafragma resulta adecuado para oxigenar volúmenes medianos de cultivos o microorganismos aeróbicos.

- El **compresor de pistón**: es más utilizado comercialmente, no obstante, para cultivos celulares sensibles (células de membrana plasmática), no es recomendable, por cuanto, su presión de operación es muy alta (80 psia o más) para estos cultivos y puede causar daño celular severo o la lisis de las células; y porque, el pistón debe lubricarse con aceite y esto ocasiona que se filtre en pequeñas cantidades a la corriente de aire.

b) **Soplador Regenerativo**: se caracteriza por funcionar como si fuera una bomba centrífuga de succión y desplazamiento de aire por lo que, opera con presión negativa (vacío) en la succión y presión positiva (compresión) en el desplazamiento. Aunque su rango de acción es pequeño: $\pm 20''\text{H}_2\text{O}$ a $\pm 40''\text{H}_2\text{O}$ en cuanto a las presiones de operación, su capacidad de desplazamiento de aire es muy alta 30 cfm - 50 cfm o 1000 L/min - 1500 L/min por lo que, puede movilizar grandes volúmenes de aire.

Tubería - Línea de Aire: esta debe ser de acero inoxidable.

Filtros de las Líneas de Aire: para sistemas pequeños de diámetros de tubería estándar, se utilizan filtros en línea con la tubería; estos son de membrana microporo que filtran el 99,99% de los contaminantes. Para sistemas mayores (industriales) debe diseñarse un método de esterilizar in situ la línea de aire; generalmente se hace calentando fuertemente la línea de aire y luego enfriarla.

Las membranas microporo que filtran el aire tienen un punto de burbuja que es la presión de agua máxima que pueden soportar antes de romperse (recuerde que el sistema tiene un medio líquido) y un flujo máximo el cual es el máximo caudal que puede soportar la membrana antes de su ruptura.

Difusor de Aire: los cultivos aeróbicos requieren que la corriente de aire estéril que se difunda en la forma de miles de pequeñas burbujas, desde el difusor de aire, hacia el volumen del líquido; esta acción se realiza mediante un plato o domo cilíndrico de acero inoxidable finamente perforado.

Alternativamente y si el sistema es pequeño o mediano en escala, se puede utilizar un difusor de material cerámico poroso el cual, tiene la ventaja de que, provee una cama más fina de burbujas (de menor diámetro) y mayor área de transferencia (volumen de burbujas).

1.5.1.2 Sistema de control de temperatura

Mantiene estable y dentro de un rango óptimo requerido por el cultivo para su máximo crecimiento, la temperatura interna del sistema.

Un sistema de control de temperatura consta de:

Dos sistemas de intercambio térmico:

- **Intercambiador de Calor:** dispositivo de intercambio térmico que genera calor o absorbe el calor excedente. El intercambiador de calor de caso y tubos es el más usado y se define por su área de transferencia de calor; a mayor área de transferencia de calor, mayor capacidad de absorber calor.
- **Serpentín:** medio físico por el cual el calor es absorbido o transmitido al fluido. El tubo del serpentín debe ser de acero inoxidable 304 o 316 (preferiblemente) y se recomienda que sea delgado para una mejor transferencia de calor.

Un sistema de control:

- **Controlador de Temperatura:** sistema que ordena y regula la acción del motor que controla las servo válvulas que regulan el flujo de líquido frío o caliente.

Un sistema de medición:

- **Sensor de temperatura:** sonda (termocopla) que mide la temperatura.

Un servo control:

- **Servo Controlador de Temperatura:** controla la temperatura a la que debe abrir o cerrar la válvula solenoide.

Un sistema regulador de paso de flujo:

- **Válvula Solenoide:** servo mecanismo actuador que regula el flujo (paso) de líquido por la tubería o línea de paso (abre o cierra el flujo del líquido)

Un sistema de conducción de fluido:

- **Tuberías de Conducción de Agua:** el agua es fluido térmico por excelencia para la transferencia de calor por conducción a través de las paredes metálicas de la tubería. Éstas deben ser de acero inoxidable.

Nota: las tuberías deben anclarse al cuerpo del biorreactor mediante un puerto de entrada que es soporte hermético que la sujeta a la superficie plana.

Temperatura Óptima: la temperatura es otro factor ambiental que influye y que afecta el crecimiento del cultivo microbiano y celular; poniendo el juego, la propia supervivencia de la célula o microorganismo. La temperatura afecta a las células y microorganismos cultivados de dos formas distintas:

- **Conforme aumenta la temperatura,** aumenta también la velocidad de las reacciones enzimáticas y el crecimiento se hace más rápido;
- **Por encima de un máximo temperatura,** se produce la desnaturalización de las proteínas celulares y la descomposición de los componentes celulares esenciales para mantener la vida, causando la muerte de las células o microorganismos en cultivo.

1.5.1.3 Sistema de Agitación

“Tiene la función de generar la potencia necesaria para producir una mezcla perfecta para el sistema de cultivo y producir un régimen de agitación adecuado que, maximice la difusión

de gases en el líquido y minimice la producción de esfuerzos cortantes y la presión hidrodinámica local y global, para optimizar los fenómenos de transferencia de momentum, calor y masa.

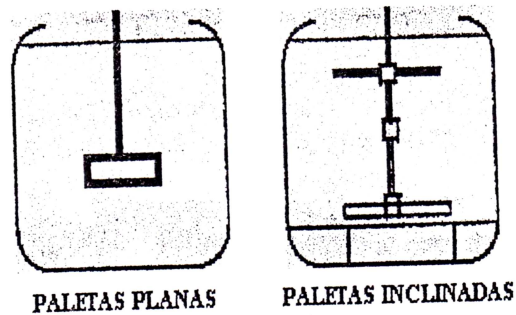


Fig. 1.5.1.3-1 Agitadores de Paleta

Un sistema de agitación consta de cuatro partes mecánicas:

- **Motor Impulsor:** suministra la potencia al eje de potencia; debe ser de corriente alterna (a.c), preferiblemente de inducción y su potencia debe calcularse para manejar el doble (200%) de la potencia teórica requerida para agitar el fluido y el cultivo a $Re \geq 3000$. Motor de Inducción (A.C): dado que un biorreactor debe operar de forma continua durante todo el proceso de cultivo; se requiere un motor capaz de resistir largos periodos de operación continua y trabajo duro; por eso, el motor debe ser de inducción de corriente alterna (a.c) y debe ser acorazado, preferiblemente en acero inoxidable.
- **Eje transmisor de la potencia:** es una barra cilíndrica de acero inoxidable 316L y por lo general se diseña en diámetros estándar: $\frac{3}{4}$ ", $\frac{1}{2}$ ", etcétera para mayor facilidad de ajuste a los estándares de motores a.c. Su longitud depende de la profundidad del contenedor (tanque).
- **Acople del Eje Transmisor:** ajusta y fija al motor, el eje transmisor de potencia. Existen dos tipos de acople:

- a) **Acople-adaptador de tipo taladro** el puerto de entrada se acopla al eje del motor por fijación directa. El puerto de salida es un dispositivo que se adapta a varios diámetros de broca y sujeta o abraza firmemente el eje transmisor de potencia por presión y abrasión; similar al que utilizan los taladros mecánicos.

- b) **Acople-ajustador de tipo tornillo-rosca** el puerto de entrada se “enrosca” o se fija firmemente al eje del motor. El puerto de salida es un dispositivo que “abraza” el eje transmisor de potencia por un mecanismo de tornillo-rosca.

En ambos casos, el diámetro del puerto de entrada del acople que es la unión de éste con el eje del motor debe ser de diámetro interno igual al diámetro externo del eje del motor y el diámetro del puerto de salida que es dispositivo sujetador del eje transmisor de potencia debe ser el mismo que el diámetro externo del respectivo eje.

- **Puerto de Entrada del Biorreactor:** se denomina puerto a la superficie física sobre el cual se instala un dispositivo de entrada o salida al biorreactor, un anclaje o un aparato mecánico o de medición; el puerto es el medio por el cual, se ajusta o fija, tal dispositivo o artefacto a la pared o superficie del tanque o del biorreactor. Como se observa en la fotografía, el puerto de entrada es la tapa o cara superior del tanque biorreactor y en donde se anclan o sujetan todos los dispositivos y periféricos que se requieren para su operación. Cada dispositivo de anclaje o sujetador también un puerto menor cuyo diámetro externo es la superficie externa total y cuyo diámetro interno es el diámetro externo del dispositivo que sujeta. Algunos puertos tienen dos diámetros internos, cuando el dispositivo que sujetan tiene diámetro externo y diámetro interno; por ejemplo, los sensores o probetas medidores y el sello mecánico del eje del agitador.

Sello Mecánico: su función es triple: evitar la contaminación, mantener hermético el sistema, servir de amortiguador de fricción. El sello mecánico también debe permitir la esterilización in situ del biorreactor, mediante una línea de vapor sobrecalentado. Un sello mecánico, generalmente se diseña en una de dos configuraciones:

Cartucho rígido: que permite el rodamiento del eje de potencia a través de soporte de cuerpo rígido que sella y aísla el paso de cualquier materia al interior del depósito.

Cartucho flexible: que permite el rodamiento del eje de potencia a través de un soporte fijo al exterior pero flexible en el interior y que también sella y aísla el paso de contaminantes al interior del depósito.

En ambos casos el sello mecánico se especifica de acuerdo al diámetro externo del eje transmisor de potencia; el cual es el diámetro interno del puerto del sello mecánico. Dentro de lo posible se recomienda el uso de sellos flexibles ya que amortiguan mejor las vibraciones mecánicas del eje transmisor de potencia; la desventaja es que esa flexibilidad obliga a cambiarlos más frecuente, pues el desgaste es mayor.

Eje Transmisor de Potencia: transmite la potencia del motor al impulsor, a través de las hojas de agitación. Existen ejes en los cuales ya vienen incorporadas hojas o aspas de agitación, se diseñan para operar en uno de dos sistemas de flujo, según sea, la orientación espacial de las hojas o aletas:

Flujo axial: suministran mayor efectividad de mezclado (distribución) y reducen la potencia de mezclado requerida, al distribuir mejor la mezcla; sus hojas u aspas son planas.

Flujo radial: generan mayor potencia de mezclado (turbulencia) y pueden causar daño celular; sus hojas o aspas son del tipo hélice.

Impulsores: son los dispositivos que impulsan el fluido y el movimiento, mediante hojas o aspas unidas al eje transmisor de potencia; pueden ser del tipo mecánico (agitador) o hidráulico (turbina).

Agitadores: es un impulsor formado por hojas o aspas de agitación conectadas al eje transmisor de potencia; pueden tener una distribución de flujo axial o radial.

Los propulsores de flujo radial pueden tener gran variedad de formas y diseños; dentro de éstos, las hélices son las que más se utilizan.

Hélices: existen en tres diseños básicos que dependen de la orientación espacial:

(a) – Plano XY, (b) – Plano ZX, (c) – Plano ZY

Cada orientación (plano) describe una superficie curva que es determinada por dos (2) de tres (3) ángulos de diseño:

(a) Plano XY, determina el ángulo de inclinación (α), este varía $15' \leq \alpha \leq 45'$; (b) Plano ZX, determina el ángulo de torsión (β), este varía $16' \leq \beta \leq 32'$; (c) Plano ZY, determina el ángulo de tensión (γ), este varía $15' \leq \gamma \leq 45'$.

Por su gran potencia y la turbulencia que generan, las hélices no se recomiendan para cultivos de células sensibles; solo deben utilizarse para cultivos bacteriales o micóticos y a bajas velocidades de rotación.

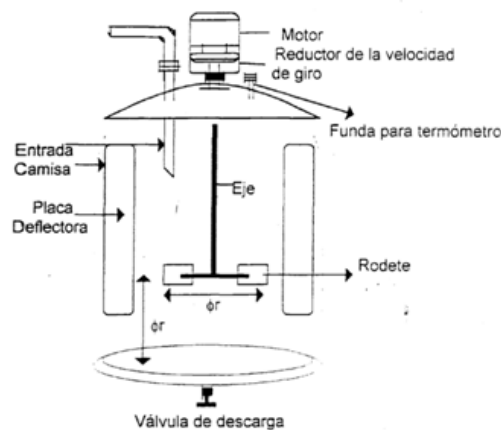


Fig. 1.5.1.3-2 Sistema de Agitación

Control de Velocidad del Motor: los motores de inducción de corriente alterna (a.c) tienen velocidades nominales de rotación de 1800rpm o 3600rpm. Estas velocidades son muy altas para los sistemas biológicos causando la destrucción de las células y microorganismos en cultivo. La velocidad de rotación del motor debe entonces reducirse a un máximo de 600rpm (revoluciones por minuto) para que no cause daño celular. Usualmente se acopla a la salida de eje del rotor una caja de reducción de 1/3 o 1/6 para

bajar la velocidad de rotación a 600rpm. Adicionalmente se coloca un control de velocidad que puede ser analógico o digital al motor para un control más fino y preciso de la velocidad de rotación.

Criterios para caracterizar el trabajo de un agitador

Los agitadores se suelen enjuiciar por su tipo y potencia. El tipo suele dar una idea del rendimiento que cabe esperar del aparato, dadas las condiciones de la agitación y las características de los productos agitados. Para cada tipo, la mayor o menor potencia que comunique al líquido viene a resultar sinónimo de la rapidez con que pueden lograrse los efectos requeridos. La potencia nominal con que designan los constructores a sus aparatos suele estar referida al caso de que el agitador trabajase sumergido en el agua.

Para una agitación concreta, el criterio que se suele seguir desde un punto de vista funcional es el derivado del concepto *intensidad o grado de agitación*, que se define por la potencia suministrada a cada unidad de volumen del líquido.

Modernamente se ha adoptado el siguiente criterio para juzgar la intensidad o grado de agitación:

Tabla 1.5.1.3-1

INTENSIDAD O GRADO DE AGITACION

GRADO DE AGITACIÓN	POTENCIA CV / I
Débil	Hasta $1,3 \cdot 10^{-4}$
Media	$1,3 \cdot 10^{-4} - 2,6 \cdot 10^{-4}$
Intensa	$2,6 \cdot 10^{-4} - 6,6 \cdot 10^{-4}$
Muy Intensa	$6,6 \cdot 10^{-4}$ en adelante

Fuente: Vian, Ocon. Elementos de Ingeniería Química

Dado un volumen de líquido a agitar, se pueden imaginar dos agitadores que introduzcan en él la misma potencia y, sin embargo, tengan distinta eficacia agitadora; uno podría ser muy grande y poco revolucionado, y el otro muy pequeño y animado de muchas revoluciones.”⁴

Diseño de Agitadores

Para diseñar agitadores, es necesario determinar la potencia para accionar el rodete del sistema de agitación; el cálculo de la potencia debería realizarse a partir de datos experimentales, es decir, mediante un procedimiento teórico – experimental.

Para esto existen fórmulas que dan la potencia necesaria para accionar un agitador, dadas las dimensiones de éste, su tipo y las características del sistema que se trata de agitar.

En general, los factores que condicionan las características de un agitador son:

- Sistema agitador (Rodete – Recipiente).
- Sistema Agitado
- Efecto que se pretende obtener con el agitador.
- Tiempo en el que se quiere tener este efecto.
- Potencia puesta en juego para accionar el agitador.

1.5.1.4 Sistemas de Intercambio Térmico

“La transferencia de calor es un proceso el que se intercambia energía en forma de calor entre distintos cuerpos o entre diferentes partes de un mismo cuerpo que están a distinta temperatura. El calor se transfiere por una combinación de dos o más de estos tres procesos: convección, conducción o radiación. Uno de los mecanismos térmicos (proceso) suele predominar sobre los otros dos, también es posible que los tres procesos se den simultáneamente.

La conducción es el proceso dominante en los intercambiadores de calor de casco y tubos y en el tubo serpentín. Aunque el mecanismo exacto de la conducción no se comprende, se

⁴ OCON. V., 1979. Elementos de Ingeniería Química. pp. 721-729

sabe que se debe al movimiento (energía cinética) de los electrones libres que se mueven por la red cristalina del sólido y transportan energía cuando existe una diferencia (gradiente) de temperatura.”⁵

Resistencias Térmicas

Resistencia térmica en la conducción:

En estos casos se debe distinguir entre las diferentes geometrías que se presentan en cada elemento resistivo; las configuraciones geométricas más usuales: pared plana, pared cilíndrica y pared esférica.

- Cilindro
- Circuito eléctrico análogo para cilindro
- Paredes conectadas en serie
- Circuito eléctrico análogo para paredes compuestas conectadas en serie
- Paredes compuestas conectadas en paralelo
- Circuito eléctrico análogo para una pared compuesta conectada en paralelo

Intercambiadores de Calor

“Un intercambiador de calor es un dispositivo diseñado para transferir calor por un mecanismo mixto de convección entre la película de un líquido procesado (medio cultivo) y la pared de un sólido metálico, seguido de la conducción del calor transferido al área transversal del sólido metálico (tubo o placa) y nuevamente la transmisión de calor por convección desde la pared del sólido metálico a otro fluido procesado (agua).”⁵

Existen dos configuraciones para la dirección del flujo fluido:

⁵ PITTS, D., 1979. Transferencia de Calor. pp. 314-325

a) Flujo paralelo: los dos fluidos entran por el mismo extremo y fluyen en el mismo sentido.

b) Contra flujo: los fluidos entran por los extremos opuestos y también fluyen en sentidos opuestos.

En un intercambiador de calor en flujo paralelo la temperatura de salida del fluido frío nunca puede ser superior a la temperatura de salida del fluido caliente. En un intercambiador de calor en contra flujo la temperatura de salida del fluido frío puede ser superior a la temperatura de salida del fluido caliente.

El caso límite ocurre cuando la temperatura de salida del fluido frío es igual a la temperatura de entrada del fluido caliente. La temperatura de salida del fluido frío nunca puede ser superior a la temperatura de entrada del fluido caliente.

- **Compactos:** son intercambiadores de calor multitubulares y están diseñados para alcanzar una gran área superficial de transferencia de calor por unidad de volumen. La razón entre el área superficial de transferencia de calor y su volumen se denomina densidad de área

a) Flujo cruzado mezclado: uno de los fluidos fluye libremente en dirección ortogonal al otro sin restricciones.

b) Flujo cruzado no mezclado: se disponen las placas para guiar el flujo de uno de los fluidos en dirección ortogonal al otro sin que se mezclen.

1.5.2 PRESIÓN INTERNA

“PRESIÓN OPERACIÓN.- La presión que se requiere en el proceso del que forma parte el recipiente, a la cual trabaja normalmente éste.

PRESIÓN DE DISEÑO.- La presión que se emplea para diseñar el recipiente. Se recomienda diseñar un recipiente con sus componentes para una presión mayor que la de

operación. Este requisito se satisface utilizando una presión de diseño de 30 lb/pulg² o 10% más que la presión de trabajo, la que sea mayor. También debe tomarse en consideración la presión del fluido y de cualquier otra sustancia contenida en el recipiente.”⁶

1.6 CONTROL AUTOMATICO DE PROCESOS

En la mayoría de las plantas de proceso existen cientos de variables que se deben mantener en un valor determinado y, con este procedimiento de corrección, se requeriría una cantidad tremenda de operarios.

Por ello, sería preferible realizar el control de manera automática, es decir, contar con instrumentos que controlen las variables sin necesidad de que intervenga el operador. Esto es lo que significa el control automático de procesos.

1.6.1 TÉRMINOS IMPORTANTES DEL CONTROL AUTOMÁTICO DE PROCESOS

Variable Controlada: es la variable que se debe mantener o controlar dentro de algún valor deseado.

Punto de Control: es el valor que se desea que tenga la variable controlada.

Variable Manipulada: es la variable que se utiliza para mantener a la variable controlada en el punto de control (punto de fijación o de régimen).

Perturbación o trastorno: cuando la variable de control se desvía del punto de control.

Considerando estos elementos, el objetivo primordial del Sistema de Control Automático es utilizar la variable manipulada para mantener la variable controlada en el punto de control, a pesar de las perturbaciones.

⁶ MEGYESY, E. 2002. Manual de Recipientes a Presión: Diseño y Cálculo. pp. 248

1.6.2 COMPONENTES BÁSICOS DE UN SISTEMA DE CONTROL

Sensor: que también se conoce como elemento primario.

Transmisor: se lo conoce como elemento secundario.

Controlador: es el cerebro del sistema de control.

Elemento final de control: frecuentemente se trata de una válvula de control (aunque no siempre). Otros elementos finales de control comúnmente utilizados son las bombas de velocidad variable, los transportadores y los motores eléctricos.

La importancia de estos componentes está en que realizan las tres operaciones básicas que deben estar presentes en todo sistema de control, estas son:

- **Medición (M):** la medición de la variable que se controla se hace generalmente mediante la combinación de sensor y transmisor.
- **Decisión (D):** con base en la medición, el controlador decide qué hacer para mantener la variable en el valor que se desea.
- **Acción (A):** como resultado de la decisión del controlador, se debe efectuar una acción en el sistema. Generalmente, ésta es realizada por el elemento final de control.

1.6.3 CONTROLADORES LÓGICOS PROGRAMABLES (PLC)

“Los Operadores Lógicos Programables (PLC) son aparatos electrónicos, operados digitalmente, que usan una memoria programable para el almacenamiento interno de instrucciones, las cuales implementan funciones específicas, tales como lógicas, secuenciales, temporización, conteo y aritméticas para controlar, a través de módulos de entrada/salidas digitales y analógicas, varios tipos de máquinas o procesos.

En su creación, los requerimientos sobre los cuales se han desarrollado los PLCs son:

- El dispositivo de control deberá ser fácil y rápidamente programable por el usuario con un mínimo de interrupción.
- Todos los componentes del sistema deben ser capaces de operar en plantas industriales sin un especial equipo de soporte, de hardware o de ambiente.
- El sistema debe ser de fácil mantenimiento y reparación. Deberá diseñarse con indicadores de status y modularidad para facilitar las reparaciones y la búsqueda de errores.”⁷

1.6.4 RAZONES PRINCIPALES PARA EL CONTROL DE PROCESOS

Es conveniente enumerar algunas de las razones por las cuales es importante el Control Automático de Procesos, así tenemos:

- Evitar lesiones al personal de la planta o daño al equipo. La seguridad debe estar en la mente de todos; esta es la consideración más importante.
- Mantener la calidad del producto en un nivel continuo y con un costo mínimo.
- Mantener la tasa de producción de la planta a un costo mínimo.

Por tanto, se puede decir que las razones de automatización de las plantas de proceso son proporcionar un entorno seguro y, a la vez, mantener la calidad deseada del producto y alta eficiencia de la planta con reducción de la demanda de trabajo humano.

⁷ SMITH, C., 1995. Control Automático de Procesos. pp. 523

PARTE EXPERIMENTAL

LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

Este proyecto de tesis de las bacterias biodegradadoras de petróleo se llevó a cabo en el Centro de Servicios Técnicos de Transferencia Tecnológica Ambiental “CESTTA”, que se encuentra adjunta a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

MÉTODOS Y TÉCNICAS

La investigación de las condiciones a las cuales se desarrollan las bacterias biodegradadoras de petróleo y la determinación de las variables necesarias para el diseño y construcción del biorreactor aerobio se realizó en función de los siguientes métodos y técnicas.

MÉTODOS

Para realizar el diseño y construcción de un biorreactor aerobio, nos basamos en los métodos deductivo, inductivo y experimental que fueron de gran utilidad para el análisis de datos y toma de decisiones.

Inductivo

Conociendo la importancia de biorremediar suelos contaminados con hidrocarburo, nace la idea de diseñar y construir el biorreactor para cultivar bacterias biodegradadoras de petróleo para lo cual se sustrajo una pequeña cantidad de suelo contaminado del campo Sacha Pozo 161, de este suelo se aislaron un tipo de bacterias que sirvieron como punto de partida para determinar las condiciones en las cuales su reproducción es la más eficiente, también se consideró el clima propio del lugar de donde se sustrajo el suelo.

Mediante determinaciones de laboratorio se obtuvieron los parámetros específicos requeridos como: temperatura, pH, cantidad de nutrientes, que necesitan las bacterias

degradadoras de petróleo para su mejor desarrollo, se consideró las cantidades requeridas de estas bacterias para tratar estos suelos. Estos datos nos sirvieron para realizar el dimensionamiento del equipo.

Se verificó que la temperatura óptima a la cual se obtiene el porcentaje mayor de crecimiento bacteriano es de 36C.

Deductivo

A base de diferentes estudios realizados tanto a nivel nacional como internacional se ha visto necesaria la utilización de biorreactores para cultivar bacterias a nivel industrial, de estos estudios obtuvimos algunos datos los mismos que nos ayudaron en nuestro proyecto.

Nos basamos en fundamentos teóricos de estudio como Operaciones Unitarias, Transferencia de Calor y Transferencia de Masa, para realizar el diseño del biorreactor.

Experimental

En el laboratorio se realizaron varios métodos para determinar las condiciones estables de crecimiento bacteriano:

Método de aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo del Suelo en estudio.

Método de masificación a nivel de laboratorio.

Métodos físicos-químicos para determinar la cantidad de TPH.

TÉCNICAS

Integra una estructura por medio del cual se organizó el diseño del equipo, a través de los pasos realizados en el laboratorio para determinar las condiciones de cultivo, el mismo que ayudó en la recopilación de información para diseñar el biorreactor.

Pruebas de Laboratorio

Nos enfocamos en las pruebas de laboratorio realizadas en el CESTTA, con las cuales determinaron las condiciones de cultivo de los microorganismos biodegradadores de petróleo que fueron favorables para el dimensionamiento, diseño y construcción del biorreactor, se realizaron otras pruebas al momento que se realizó la masificación en el equipo, para comprobar la efectividad del mismo.

Se realizó un adecuado estudio y caracterización de los microorganismos presentes, aislando bacterias degradadoras de hidrocarburos de suelos contaminados, se han cultivado en el laboratorio y se han verificado las mejores condiciones de crecimiento del consorcio bacteriano y conociendo las condiciones del suelo en el cual se van a inyectar para que realicen la biodegradación del mismo.

✓ **Elaboración de un inóculo bacteriano para ser utilizado en procesos de Biorremediación**

Para procesos de biorremediación una técnica muy útil debido a su efectividad es la Bioaumentación que consiste en la inoculación controlada de cultivos bacterianos de acción dirigida, especialmente formulados y de ocurrencia natural, para asistir a los hallados naturalmente en el suelo, adaptadas en un medio con un contaminante igual o similar al que contiene el suelo donde se las quiere introducir, en este caso hidrocarburos, acompañadas de otros componentes biotecnológicos. Por lo general los contaminantes son la única fuente de alimento de las bacterias inoculadas.

La Bioaumentación posibilita controlar la naturaleza de la Biomasa. Garantiza que el tipo de microorganismos más idóneo esté presente en el suelo en cantidad suficiente para degradar en forma efectiva y eficiente los residuos contaminantes y reducirlos a sus componentes básicos (CO_2 y H_2O), se la puede realizar tanto en situ como ex situ.

Para desarrollar el inóculo bacteriano que será aplicado al suelo, se debe seguir los siguientes pasos:

- a) **Procesamiento de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburo.**- consiste en tomar muestras de suelo del lugar que se quiere remediar y procesarlas en el laboratorio en medios sólidos mediante la técnica de diluciones sucesivas.



Fig. 2.2.2-1 Toma de muestras de suelo contaminado con hidrocarburo para la elaboración de un consorcio bacteriano



Fig. 2.2.2-2 Procesamientos de muestras de suelo en el laboratorio

- b) **Aislamiento y purificación de cepas bacterianas.**- una vez que las colonias bacterianas han crecido sobre el medio sólido, deben ser aisladas y purificadas previo la aplicación de varias pruebas de interés específico.

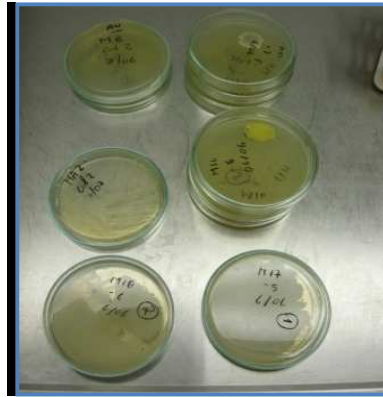


Fig. 2.2.2-3 Cepas bacterianas previo el aislamiento

- c) **Determinación de las características macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas.**- sirve para determinar características como: color, forma, tamaño, forma de los bordes, forma celular, esporulación, etc., además que al realizar este procedimiento se garantiza que las cepas estén totalmente puras y no existan contaminaciones.



Fig. 2.2.2-4 Preparación de placas para visualización de características microscópicas



Fig. 2.2.2-5 Visualización características microscópica de las cepas bacterianas aisladas

- d) **Almacenamiento de las cepas bacterianas.**- es necesario almacenar las cepas que han sido aisladas, para garantizar su morfología durante el período de evaluación de las características para ser seleccionadas en procesos de biorremediación.



Fig. 2.2.2-6 Vial que contiene cepa bacteriana aislada



Fig. 2.2.2-7 Bancos Bacterianos de Aislamiento

- e) **Pruebas bacterianas.**- estas son específicas para seleccionar cepas bacterianas que posean características de utilidad en procesos de biorremediación y son las que se detallan a continuación:

- **Actividad emulsificante.-** sirve para evaluar la capacidad que tienen las bacterias de producir emulsificantes de petróleo en agua.



Fig. 2.2.2-8 Cepas bacterianas durante la prueba de actividad emulsificante

- **Actividad degradativa.-** La prueba de actividad degradativa consiste en proveer a las cepas bacterianas puras nutrientes mediante un medio mineral con una concentración mínima de petróleo, para que tomen de este el carbono necesario para realizar sus procesos enzimáticos y generar energía en forma de ATP, degradando el hidrocarburo a CO₂ y agua, logrando degradar este contaminante.



Fig. 2.2.2-9 Cepas bacterianas durante la prueba de actividad degradativa

- **Antagonismo bacteriano.-** La prueba de antagonismo bacteriano consiste en el enfrentamiento de diferentes cepas de bacterias con el fin de verificar cuál de ellas es antagónica al resto de cepas. El antagonismo se produce por la producción de sustancias (metabolitos) con características antibióticas las cuales inhiben el crecimiento de las cepas bacterianas que se siembran conjuntamente en la caja petri.

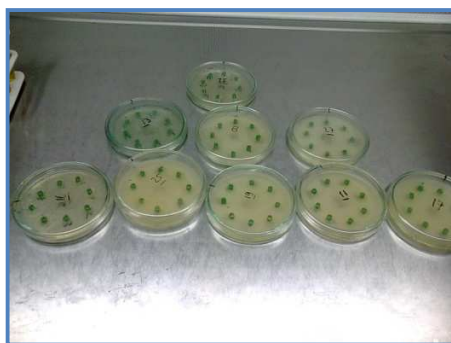


Fig. 2.2.2-10 Prueba de antagonismo bacteriano

- f) **Pruebas de identificación bacteriana.**- Las pruebas de identificación bacteriana son un conjunto de pruebas bioquímicas que nos proveen de la información necesaria para saber con qué género y especie de bacterias estamos trabajando. Al tratarse de un consorcio de bacterias que tienen aplicación en biorremediación es importante conocer, en base a la identificación los géneros de las cepas bacterianas que conforman el consorcio con el fin de eliminar alguna que pueda presentar riesgo para la salud de humanos (operarios), animales del entorno y plantas.



Fig. 2.2.2-11 Pruebas de identificación bacteriana

- g) **Conformación del consorcio bacteriano.**- una vez que se han identificado las cepas que poseen características útiles para biorremediación se seleccionan las que son inocuas y no representan un peligro para las personas, plantas y animales.

- h) **Elaboración del prehinóculo bacteriano.**- las cepas bacterianas seleccionadas que se almacenan en congelación, deben ser reactivadas en BHI, posterior a esto se realiza la fermentación en un matraz que contiene un medio mineral enriquecido que posee hidrocarburo como única fuente de carbono, la fermentación se la realiza durante 12 horas a 36°C con adición de oxígeno constante.

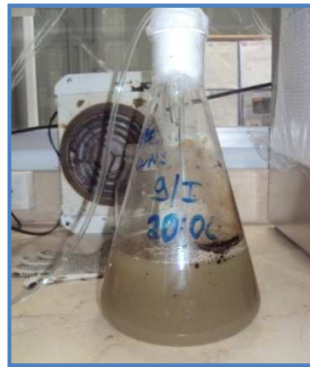


Fig. 2.2.2-12 Prehinóculo bacteriano

- i) **Masificación.**- se realizaba en un botellón con características básicas de un reactor, utilizando un medio mineral enriquecido en el que se realizó la fermentación de las cepas bacterianas activadas en el prehinóculo, y manteniendo las mismas condiciones de cultivo, en el cual, la producción presentaba un volumen de 30L. Con el biorreactor batch aerobio podemos obtener un mayor volumen de 80L y las bacterias se desarrollan de una mejor manera.



Fig. 2.2.2-13 Pruebas de masificación

j) Determinación de la Temperatura

Tabla 2.2.2-1

DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA

FUNDAMENTO	MÉTODO	TÉCNICA
La temperatura influye en la velocidad de degradación marcadamente. La Temperatura tiene una gran influencia en la biodegradación por su efecto sobre la naturaleza física y química del petróleo. Las bacterias prefieren las temperaturas moderadas, si es muy alta el calor las destruye, el frío las inhiba.	Termómetro Digital	APHA 2550 B

k) Determinación del pH del medio de cultivo

Tabla 5.2.2-2

DETERMINACIÓN DEL pH

FUNDAMENTO	MÉTODO	TÉCNICA
La mayoría de bacterias se desarrollan óptimamente en pH cercanos a la neutralidad, por lo cual es de esperarse que pH extremos en el medio afectaran de manera negativa a las comunidades microbianas inhibiendo su capacidad para degradar hidrocarburos.	Método electrométrico 4 - 10 unidades de pH	Standard Methods Ed 21, 2005 EPA 9045 C

l) Determinación de la densidad del cultivo

Tabla 2.2.2-3

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DEL CULTIVO

FUNDAMENTO	MÉTODO
La densidad determina la cantidad de masa contenida en un determinado volumen.	Densímetro

m) Determinación de la viscosidad del cultivo

Tabla 2.2.2-4

DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD DEL CULTIVO

FUNDAMENTO	MÉTODO
Viscosidad, propiedad de un fluido que tiende a oponerse a su flujo cuando se le aplica una fuerza. Los fluidos de alta viscosidad presentan una cierta resistencia a fluir; los fluidos de baja viscosidad fluyen con facilidad.	Stockes $\mu = \frac{2g(\rho_{sol} - \rho_{liq})r^2}{9v}$

DATOS EXPERIMENTALES

3.6.2 VARIABLES DE PROCESO

Para la realización del diseño y construcción del biorreactor batch aerobio, nos guiamos en las condiciones optimas de cultivo, que fueron determinadas a base de un estudio de aislamiento, elaboración del pre-inóculo, inóculo bacteriano y pre-masificación, llevadas a cabo experimentalmente en el Laboratorio CESTTA, llegando a establecer las siguientes variables.

Tabla 2.3.1-1
VARIABLES DEL PROCESO

VARIABLE	INDICADOR	INDICES
Temperatura óptima de crecimiento	C	36
Tiempo óptimo de cultivo	h	12
pH óptimo de cultivo	pH	7±1
Velocidad de agitación	rpm	150
Densidad	kg/m ³	1,001 x 10 ⁻³
Viscosidad	kg/m s	4,96 × 10 ⁻²

Fuente: Rivera Fernanda, Suárez Dennis

3.6.3 DATOS ADICIONALES

Tabla 2.3.2-1
DATOS ADICIONALES

CARACTERÍSTICA	UNIDAD	VALOR
-----------------------	---------------	--------------

Conductividad Térmica del Acero Inoxidable AISI 304	J/m ² sK	50,2
Capacidad Calorífica del Agua	Kcal	0,99
Número de Potencia	--	0,4

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN

CÁLCULOS PARA EL DISEÑO DEL REACTOR

CÁLCULO DEL VOLUMEN DE LA CÁMARA DE CULTIVO

Deseando una producción de 80 L de cultivo con un factor de corrección de 0.25 en relación al volumen de la caída cónica en la base del biorreactor de 27□.

$$V = fs \times Vr$$

Ec. 3.1.1-1

$$V = 0,25 \times 80$$

$$V = 20L$$

El volumen total es de:

$$Vt = Vr + V$$

Ec. 3.1.1-2

$$Vt = 80 + 20$$

$$V_t = 100L$$

CÁLCULO DE LA ALTURA DE LA CÁMARA DE CULTIVO

Tomando un diámetro interno del recipiente de 0.45m, utilizándola fórmula del volumen de un cilindro circular recto tenemos:

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot h$$

Ec. 3.1.2-1

$$h = \frac{4V}{\pi d^2}$$

$$h = \frac{4 \cdot 0,1}{\pi(0,45)^2}$$

$$h = 0,63m$$

CÁLCULO DEL VOLUMEN DE LA CAMISA

Para el cálculo de este volumen tomamos la fórmula de un cilindro hueco, considerando por recomendación técnica un espacio anular de 7.5cm a cada lado de la cámara de cultivo, y considerando una altura de 65cm.

$$D = 0.45 + 2(0,075)$$

$$D = 0,60m$$

$$V_c = \frac{\pi}{4} \cdot h \cdot (D^2 - d^2)$$

Ec. 3.1.3-1

$$V_c = \frac{\pi}{4} \cdot 0,65 \cdot (0,60^2 - 0,45^2)$$

$$V_c = 0,080\text{m}^3 \quad V_c = 80\text{L}$$

CÁLCULO DEL VOLUMEN REAL DE LA CAMISA

Se determina por la diferencia de volúmenes.

$$V_{rc} = V_t - V_c$$

Ec. 3.1.4-1

$$V_{rc} = (100 - 80)$$

$$V_{rc} = 20\text{L}$$

CÁLCULO PARA EL SISTEMA DE AGITACIÓN

Para establecer las condiciones de diseño del agitador es necesario determinar la potencia para accionar el rodete, este cálculo deberá realizarse a partir de los datos experimentales de la Tabla 2.3.1-1

Por consiguiente:

$$N = 150\text{rpm}$$

$$D = 0,45\text{m}$$

$$h = 0,65\text{m}$$

Diámetro del rodete

Se toma la mitad del diámetro del tanque.

$$D_r = \frac{1}{2} \times 0,45$$

Ec. 3.1.5-1

$$D_r = 0,225m$$

Altura entre el fondo del fermentador y el rodete

Se considera 1/3 del diámetro del equipo

$$h_{f-r} = \frac{1}{3} \times 0,45$$

Ec. 3.1.5-2

$$h_{f-r} = 0,15m$$

Longitud del eje L

Es la altura del fermentador (h) menos la distancia entre el fondo del fermentador y el rodete (h_{f-r}).

$$L = h - h_{f-r}$$

Ec. 3.1.5-3

$$L = (0,63 - 0,15)$$

$$L = 0,48m$$

Largo de la paleta L_p

Se considera $\frac{1}{4}$ de la longitud del brazo

$$D_r = 0,225m$$

Ec. 3.1.5-4

$$L_p = \frac{1}{4} \times D_r$$

$$L_p = \frac{1}{4}(0,225)$$

$$L_p = 0,056m$$

Alto de la paleta h_p

Se mide 1/5 de la longitud del brazo.

$$h_p = \frac{1}{5} \times Dr$$

Ec. 3.1.5-5

$$h_p = \frac{1}{5}(0,225)$$

$$h_p = 0,045m$$

Numero de paletas

Se consideran necesarias 4 paletas, debido a que el volumen empleado es de 81,35L.

3.6.4 CALCULO DE LA POTENCIA DEL AGITADOR

Las variables que influyen en la potencia consumida por el agitador son:

- ✓ Dimensiones principales del tanque y del rodete: Diámetro del tanque (d), diámetro del rodete (D_r), altura del líquido (h), distancia del fondo del tanque hasta el rodete (h_{f-r}), y dimensiones de las paletas.
- ✓ Viscosidad (μ) y densidad (ρ) del fluido.
- ✓ Velocidad de giro del agitador (N).

Estas variables se calculan a través de números adimensionales, relacionando por medio de gráficos, estas son: el número de Reynolds y el Número de Potencia y dependerán de geometría del agitador y de si el diseño cuenta o no de placas deflectoras.

Calculo del número de Reynolds

Experimentalmente y mediante la ayuda de un hidrómetro se determino la densidad del caldo de cultivo: $\delta = 1,001 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$; del mismo modo y mediante la técnica de la bola se encontró la viscosidad; siendo de: $\mu = 4,96 \times 10^{-2} \text{ Kg/m} \cdot \text{s}$. Por lo tanto:

$$N_{Re} = \frac{D_r^2 N \delta}{\mu}$$

Ec. 3.1.6-1

Donde:

N_{Re} = Numero de Reynolds.

D_r = Diámetro del rodete (m)

N = velocidad de rotación (rev/s)

δ = densidad del fluido (kg/m^3)

μ = viscosidad (kg/m s)

$$N_{Re} = \frac{(0,225)^2 (2,5) (1,001 \times 10^3)}{4,96 \times 10^{-2}}$$

$$N_{Re} = 2554,21$$

Dado que para un $N_{Re} > 10$ y $N_{Re} > 10000$ el fluido se considera laminar o turbulento.

Calculo del número de Potencia

Con este antecedente se puede recurrir a tablas (una de ellas descrita en el Anexo I) que relacionan el Número de Reynolds con el Numero de potencia en función de la forma de la paleta del agitador a usar.

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot Dr^5}$$

Ec. 3.1.6-2

Con el N_{Re} utilizamos la grafica de correlaciones de potencia y tenemos el valor de $N_p = 0,4$.

Por lo tanto obtenemos una potencia de 0,48HP

Calculo del coeficiente total de transferencia de calor

Las correlaciones para el coeficiente de transferencia de calor para soluciones agitadas en el interior de un recipiente y las paredes de la chaqueta tienen la siguiente forma:

$$\frac{UD}{k} = a \cdot (N_{Re})^b \cdot (N_{Pr})^{\frac{1}{3}} \cdot \left(\frac{\mu}{\mu_w}\right)^m$$

Ec. 3.1.6-3

El número de Prandt es:

$$N_{Pr} = \frac{C_p \cdot \mu}{k}$$

Ec. 3.1.6-4

La conductividad térmica del acero inoxidable es $k=50.2 \text{ J/m s K}$

La capacidad calorífica es:

$$N_{Pr} = \frac{C_p * \mu}{k}$$
$$N_{Pr} = \frac{4145,13 * 4,96 \times 10^{-2}}{50,2}$$
$$N_{Pr} = 4,09$$

Las constantes a, b y m son determinadas de acuerdo al tipo de paleta siendo esta de tipo ancha y al tratarse de un agitador sin deflectores tenemos:

$$a = 0,54 \quad b = 2/3 \quad m = 0,14$$

Reemplazando en la fórmula:

$$\frac{a * \mu^b}{k^m}$$

Ec. 3.1.6-5

3.6.5 CÁLCULO PARA DETERMINAR EL CALOR NECESARIO PARA CALENTAR EL SUSTRATO

$$c_{ps} = 0,99 \frac{\text{Kcal}}{\text{Kg}^\circ\text{C}}$$

$$T_a = 16 \text{ C}$$

$$T_s = 36 \text{ C}$$

$$m_s = 81,35 \text{ Kg}$$

$$q_s = m_s \cdot c_{ps} \cdot (T_s - T_a)$$

Ec. 3.1.7-1

$$q_s = 81,35 \times 0,99 \times (36 - 16)$$

$$q_s = 1,6 \times 10^3 \text{ Kcal}$$

BALANCE DE MASA Y ENERGÍA

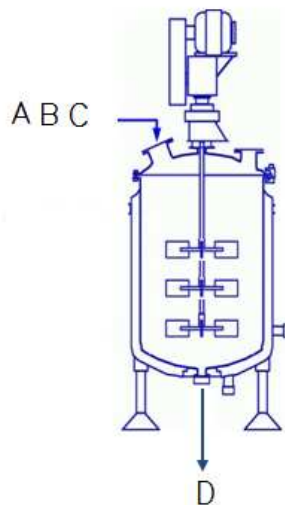


Fig. 2.2-1 Esquema Reactor Principal

3.6.6 BALANCE DE MASA

Conociendo los valores máxicos y concentraciones de cada uno de los nutrientes necesarios para la producción en 80L de agua, y considerando las densidades de agua y petróleo liviano tenemos:

$$\rho_{\text{Agua}} = 1 \frac{\text{Kg}}{\text{L}}$$

$$\rho_{\text{CnHn}} = 0,75 \frac{\text{Kg}}{\text{L}}$$

$$m_{\text{Agua}} = 1 \frac{\text{Kg}}{\text{L}} \times 80\text{L}$$

$$m_{\text{Agua}} = 80\text{Kg}$$

$$m_{\text{CnHn}} = 0,75 \frac{\text{Kg}}{\text{L}} \times 0,04\text{L}$$

$$m_{\text{CnHn}} = 0,03\text{Kg}$$

Tabla 3.2.1-1

DATOS PARA BALANCE DE MASA

SIMBOLOGÍA	COMPUESTOS	DOSIFICACIÓN	CANTIDAD EN MASIFICACIÓN EN 80L DE CULTIVO (Kg)
A	H ₂ O	80L	80
B	CnHn	40ml	0,03
	NH ₄ NO ₃	1g/L	0,08
	K ₃ PO ₄		
	MgSO ₄		
	NaCl		
	KCl		
	Pectona	3g/L	0,24
Glucosa			
C	Inóculo	1L	1

Fuente: Rivera Fernanda, Suárez Dennis

Agua + Nutrientes + Inóculo = Descarga

$$A + B + C = D + R_{\text{Cultivo}}$$

$$80 + 0,35 + 1 = D + 0.15$$

$$81,35 - 0,15 = D$$

$$81,2\text{Kg} = D$$

Teniendo una descarga de cultivo de 81,2Kg luego de 12 horas de masificación en el biorreactor.

BALANCE DE ENERGÍA

$$E_{\text{Entrada}} = E_{\text{Salida}}$$

$$(Q_{\text{ganado}})_{\text{Cultivo}} = (Q_{\text{perdido}})_{\text{Agua Caliente}}$$

$$(mCp\Delta T)_{\text{Cultivo}} = (mCp\Delta T)_{\text{Agua Caliente}}$$

$$81,2 \times 3,12 \times (38 - 33) = m \times 4,18 \times (36 - 16)$$

$$m = \frac{1266,72}{83,6}$$

$$m_{\text{Agua Caliente}} = 15,15\text{Kg}$$

El volumen real de agua para mantener el nivel térmico del biorreactor, a una temperatura media de 36C es de:

(Capacidad nominal = 20L)

$$m_{\text{Agua Caliente}} = 15,15\text{Kg}$$

$$\rho_{\text{Agua}} = 0,99686 \frac{\text{Kg}}{\text{L}}$$

$$V = \frac{m}{\rho}$$

$$V = \frac{15,15}{0,99686}$$

$$\mathbf{V = 15,19L}$$

DIMENSIONAMIENTO

En base a los datos facilitados por el CESTTA, y realizando los cálculos de ingeniería necesarios para el diseño, tenemos un dimensionamiento de:

- ✓ El reactor se lo construirá con el siguiente material:

El tanque interno se lo fabricará en plancha de acero inoxidable de 4mm con tapas abombadas tanto la superior como la inferior, cuyas medidas serán 780mm de alto (cámara de cultivo + tapa + base) x 450mm de diámetro; la tapa superior irá desmontable con seis pernos de ajuste rebatibles y con empaquetaduras de sellado mediante un oring de caucho de ¼” de diámetro.

La misma tapa está provista de un eje inoxidable de 1” para agitador múltiple con cuatro hileras de aspas desmontables, cada una en la parte superior de entrada del eje tiene un sello mecánico y rodamientos de fijación. Además hay una entrada de oxígeno.

El recipiente interno tiene sobrepuesto otro tanque externo cuyas medidas son 600mm de diámetro x 650 mm de altura en la plancha de 4mm de espesor en acero inoxidable #304 adherido mediante soldadura. Todo este sistema tiene entradas y salidas de agua en tubería inoxidable de ½”, y drenajes respectivos, además un nivel de agua para el tanque externo, y se sujeta todo el conjunto sobre cuatro ángulos base de 2 ½” * ¼”.

Todo este sistema tiene un revestimiento térmico (lana de vidrio), forrado en acero inoxidable mate de 1mm de espesor.

Tabla 6.3-1

DIMENSIONAMIENTO DEL REACTOR

DESCRIPCIÓN	VARIABLE	INDICADOR
CÁMARA DE CULTIVO		
Volumen	100	L
Altura	0.63	m
Diámetro	0,45	m

Material	Acero inoxidable #304 de 4mm de espesor	
CAMISA DE ENFRIAMIENTO		
Volumen	20	L
Altura	0.65	m
Diámetro	0.60	m
Material	Acero inoxidable #304 de 4mm de espesor	
SISTEMA DE AGITACIÓN		
Diámetro rodete	0.225	m
Altura entre fermentador y rodete	0.15	m
Longitud rodete	0.48	m
Largo paleta	0.056	m
Altura paleta	0.045	m
Número paletas	4	-
Potencia Requerida	0.48	HP

Fuente: Rivera Fernanda y Suárez Dennis

AUTOMATISMO Y TIPOS DE MATERIALES

3.6.7 AUTOMATISMO

La automatización del equipo se basa en la ejecución de procesos controlados mecánica y electrónicamente, liberando al ser humano de operaciones rutinarias, disminuyendo así errores y a su vez aumentando la producción y los estándares de calidad requeridos.

El propósito del control del equipo es el de mantener dentro de un valor preestablecido una determinada variable en un proceso. Los sistemas de control tienen la habilidad de arrancar, regular y parar un proceso en respuesta a la medición de variables monitoreadas dentro de él, con el objeto de obtener la salida deseada. El sistema de control ideal en el proceso responde instantáneamente a los cambios en los requerimientos de entrada.

Cuenta con la utilización de un operador de Controles Programables (PLC), incluyendo relés, circuitos lógicos y sistemas de computadores, el cual controla las temperaturas,

agitación y flujos en función del proceso, se maneja de manera manual y automática tanto para la esterilización como para el proceso de producción.

Un PLC es un sistema electrónico digital diseñado para trabajar en ambientes industriales, que usa memorias programables para el almacenamiento de instrucciones, con las que implanta funciones específicas, (lógicas, secuenciales, temporizadas, de conteo y aritméticas) para controlar diversos tipos de procesos, a través de módulos de entrada/salida análogos o digitales

Las ventajas de estos PLC son:

- Reemplazan grandes bastidores de relés.
- Requieren mucho menos espacio que otros dispositivos.
- Tienen mayor confiabilidad en el desempeño en largos periodos de tiempo.
- Presenta flexibilidad para cambiar secuencias de control sin cambiar cables.

3.6.8 TIPOS DE MATERIALES

3.4.2.1 MATERIALES PARA EL EQUIPO

Tabla 3.4.2.1-1

MATERIALES UTILIZADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DEL REACTOR

DENOMINACIÓN	CARACTERÍSTICAS	CANTIDAD
Retazo de eje en acero inoxidable	1" x 0,70m de largo	1
Plancha de acero inoxidable	5mm de espesor	1
Plancha de acero inoxidable para forro	(mate) de 1mm espesor	1
Platina	2" ancho x ½" espesor	3m
Tubo para roscar en acero inoxidable	½"	1
Retazo de eje en acero inoxidable	5/8 x 1m	1m
Retazo de eje en acero inoxidable (para tuercas)	1" ½ x 30mm largo	6
Retazo de eje en acero inoxidable (pasadores)	1" ½ x 14mm largo	6
Niveles de agua con tubo refractario	0,30cm largo	1

Codos	½”	7
Neplo en acero inoxidable	2” x 0.15cm largo	1
Hierro ángulo (soporte de reactor)	2 ½” x ¼ espesor	1
Retazos de plancha de hierro	150mm x 150mm x ½” espesor	8
Sello mecánico para eje	1”	1
Soldadura inoxidable	1/8 de espesor	4Kg
Universales en acero inoxidable	½”	2
Manómetro	80 psi	1
Válvulas de paso en acero inoxidable	½”	1
Uniones en acero inoxidable para resistencias eléctricas	1” ¼	2
Electro válvulas	½”	2
Aislante térmico	Lana de vidrio	2m ²
Retazos de eje en acero inoxidable para sello mecánico	2” x 50mm largo	2
Válvulas de descarga	1” 1/2	1
Motoreductor	0,5 HP	1
Bomba	0,5 HP	1

Fuente: Fernanda Rivera y Dennis Suárez

3.4.2.2 MATERIALES PARA LA AUTOMATIZACIÓN

Tabla 3.4.2.2-1

MATERIALES UTILIZADOS EN LA AUTOMATIZACIÓN DEL REACTOR

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN	CANT
PLC-MANEJO MINI REACTOR		
TWDLMDA20DRT	Base unit DC, 12 IN DC, 8 O	1
TWDALM3LT	Expansión, analog 2 IN RTD	1
TWDAMM3HT	Expansión, analog 2 IN, 1 O	1
TERMINAL DE OPERADOR-HMI		
XBTGTI335	Terminal 3”8’Plus’ serie, touch-sensitive graphic color	1
TABLERO DE CONTROL & ACCESORIOS		
GAB-010	Armario metálico 60x50x30 cm	1
8739140000	CP SNT 48W 24V 2A	1
GV2ME03	Disyunt magneto term 0,25-0,40A	2
LCID09	Cont 9A 3P 1NA – 1NC	2
8952120000	PSSR 230VAC/1HP AC 20A	2
24336	C60N C 2P 10A	2
24335	C60N C 2P 6A	2
24397	C60N 1P 1D 3A Curva C	3
24396	C60N 1P 1D 2A Curva C	2
AK2GA35	Canaleta de Fijación	1
AK2CA3	Tapa para Lira y Canal	1

XB4BVG3	Piloto Lum. Led 120V Verde	2
XB4BJ53	Selector 3POS.	2
XB4BD33	Selector 3POS. NA+NA MAN.CORTA	1
XB4BT42	Puls. Seta Parada Emerg.	1
INSTALLATION	Instalation and Label – Auxiliary Wiring	1
TRANSMISOR DE PRESIÓN		
XMLF160D2015	Captador de Presión Electrónico DC	1
XZCP1141L5	Conector Hembra M12 5M	1

Fuente: Rivera Fernanda y Suárez Dennis

3.5 REQUERIMIENTO PRESUPUESTARIO

El análisis de costos abarca los costos de materiales, costos de mano de obra, costos de transporte, así como costos fijos y de operación.

3.5.1 Recursos Humanos

Tabla 3.5.1-1

RECURSOS HUMANOS

Recursos	Precio Total
Mano de obra para Construcción del reactor	850
Mano de obra para de automatización	534,15
Mano de obra para construcción del caldero	496
TOTAL	1880,15

Fuente: Rivera Fernanda y Suárez Dennis

3.5.2 Recursos Materiales

Tabla 3.5.2-1

RECURSOS MATERIALES

Recursos	Costo (dólares)
Materiales y Suministros de Oficina	272.50
Materiales para la construcción del reactor	2550
Materiales para la automatización	2300,91
Materiales para la construcción de caldero	2000.08
TOTAL	7123,49

Fuente: Rivera Fernanda y Suárez Dennis

3.6.1 Recursos Totales

Tabla 3.5.3-1

RECURSOS TOTALES

ÍTEM	MONTO \$
Recursos Humanos	1880,15
Recursos Materiales	7123,49
Subtotal	9003,64
Imprevistos (15%)	1350,55
TOTAL	10354,19

Fuente: Rivera Fernanda y Suárez Dennis

3.6 RESULTADOS

3.6.1 PRUEBAS DE VALIDACIÓN DEL EQUIPO

Para comprobar la efectividad del equipo construido con el dimensionamiento de los cálculos de ingeniería obtenidos, realizamos:

3.6.1.1 Pruebas de esterilización del reactor, contando con el vapor de un calderín

Se realizaron cuatro pruebas antes de la utilización del equipo, en las mismas que determinamos el tiempo que demora para que alcance la temperatura y presión de esterilización.

$$T_{Esterilización} = 121^{\circ}\text{C}$$

$$P_{Esterilización} = 18\text{psi}$$

Se llevaron a cabo en:

✓ **Cámara de cultivo utilizado como autoclave**

Se introdujo materiales de laboratorio cubiertos con cinta de esterilización, los datos que fueron registrados son los siguientes:

Tabla 3.6.1.1-1

TIEMPO Y TEMPERATURA HASTA ALCANZAR ESTERILIZACIÓN

TIEMPO (Minutos)	TEMPERATURA (C)
0	16
30	20
60	43
90	57
120	70
150	86
180	97
210	105
240	119
270	121
300	122

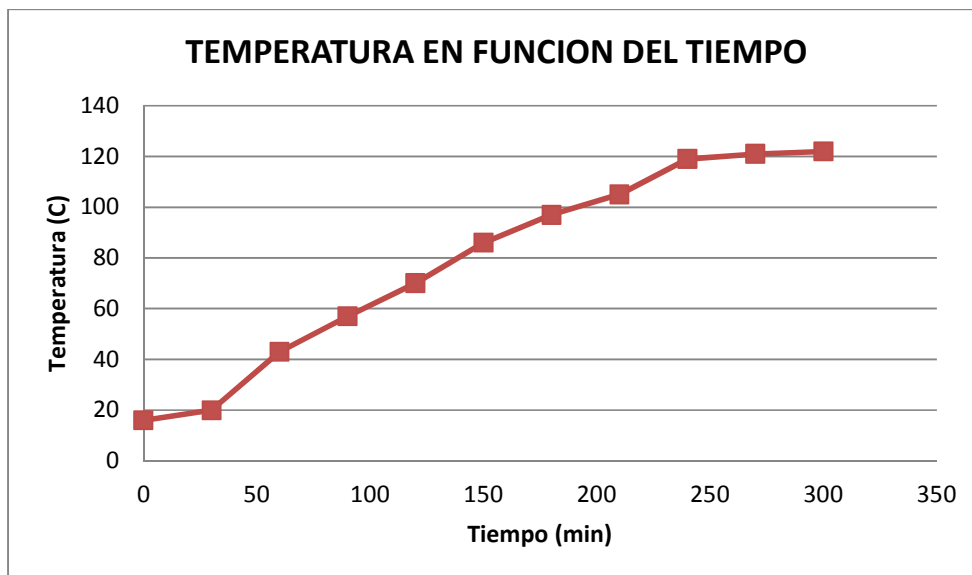


Fig. 3.6.1.1-1 TEMPERATURA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN

✓ **Cámara de cultivo con agua**

Se realizaron 4 pruebas introduciendo 80L de agua, los datos registrados fueron.

Tabla 3.6.1.1-2

TIEMPO Y TEMPERATURA HASTA ALCANZAR ESTERILIZACIÓN

TIEMPO (Minutos)	TEMPERATURA (C)
0	16
30	23
60	50
90	64
120	83
150	97
180	111
210	118
240	120
270	121
300	121

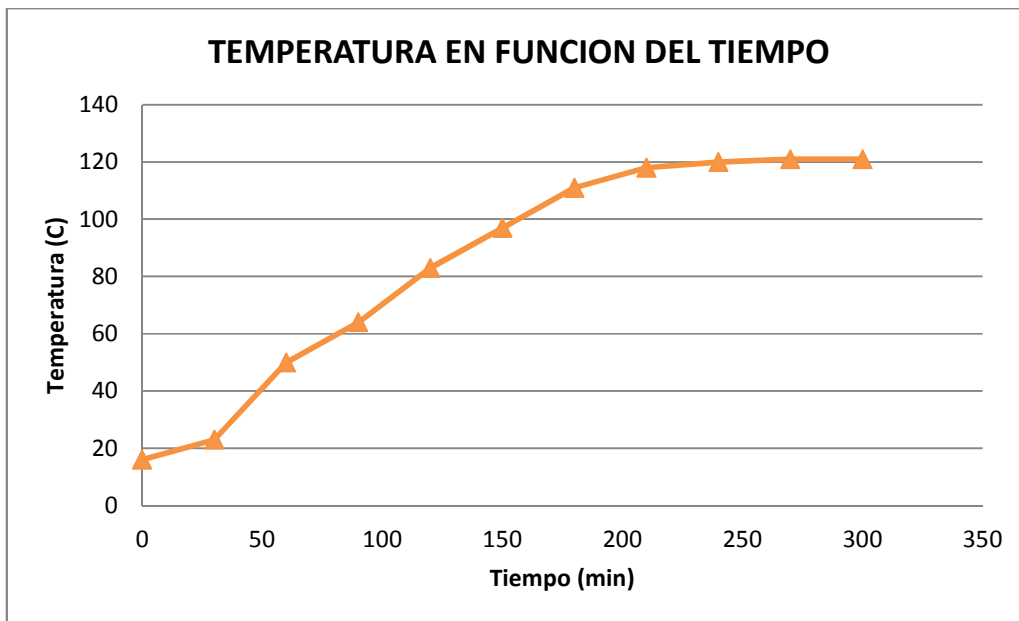


Fig. 3.6.1.1-2 TEMPERATURA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN

3.6.1.2 Pruebas de masificación de las bacterias biodegradadoras de petróleo

Para llevar a cabo la masificación se realizan los siguientes pasos:

- a) Se coloca en la cámara de cultivo el volumen de agua con los nutrientes necesarios (sustrato).
- b) Se procede a esterilizar el sustrato
- c) Una vez esterilizado, se baja la $T_{Esterilización} = 121^{\circ}\text{C}$ a la $T_{Cultivo} = 36^{\circ}\text{C}$
- d) Cuando llega a la $T_{Cultivo}$ se procede a inyectar el inóculo y se mantiene esta T durante 12 horas.

Se tomó muestras del cultivo con intervalos de 1 hora, durante 24 horas de producción, en cada muestra tomada se procedió a realizar las respectivas siembras para determinar el crecimiento de la población bacteriana mediante el conteo de las mismas, con esto llegamos a determinar la siguiente curva de crecimiento.

Tabla 3.6.1.2-1

TIEMPO Y POBLACIÓN BACTERIANA EN EL PROCESO

TIEMPO (horas)	POBLACIÓN BACTERIANA (UFC/100ml)
1	1×10^1
2	1×10^3
3	1×10^4
4	1×10^4
5	1×10^5
6	1×10^5
7	1×10^6
8	1×10^7
9	1×10^7
10	1×10^8
11	1×10^9
12	1×10^9
13	1×10^9
14	1×10^8
15	1×10^7
16	1×10^7
17	1×10^6
18	1×10^5
19	1×10^5
20	1×10^4
21	1×10^4
22	1×10^3
23	1×10^3
24	1×10^1

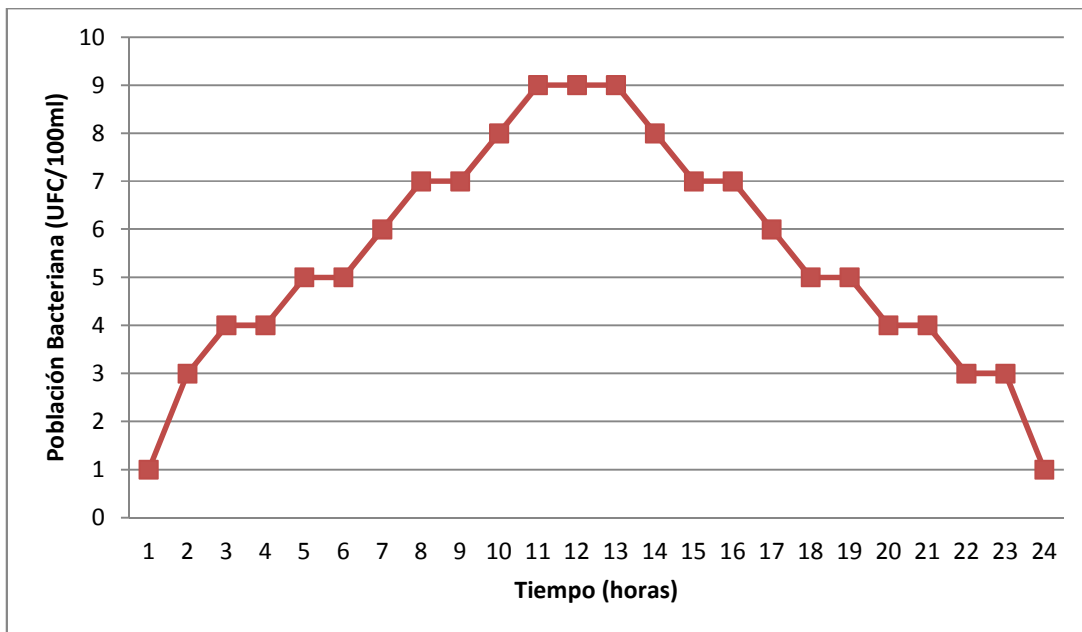


Fig. 3.6.1.2-1 POBLACIÓN BACTERIANA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO-CURVA DE CRECIMIENTO

4.6.1.2 Pruebas en el Campo

Se realizó sembrando estas bacterias en el suelo que se está tratando.

4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Esterilización del reactor, contando con el vapor de un calderín

- ✓ Cámara de cultivo utilizada como autoclave

Se alcanzó la temperatura requerida en un tiempo de 3 a 4 horas, pasado este tiempo alcanza la cámara de cultivo una temperatura de 121C.

Al alcanzar la T y P de esterilización se dejó actuar por 15 min y se procedió a sacar los materiales que se encontraban dentro de la cámara de cultivo, la cinta que recubría a los materiales presentó un color negro significando que los materiales se encontraban esterilizados.

- ✓ Cámara de cultivo con agua

Alcanzamos la temperatura de esterilización en un tiempo de 4 a 5 horas, y se comprobó que el agua se encontraba esterilizada porque se tomó muestras de agua y se realizó siembras en medio sólido, para determinar si existe población bacteriana, se contó el número de colonias obteniendo un crecimiento de <1 UFC/ml, significa que no existe contaminación alguna y que el equipo cumple su función de esterilización correctamente.

Masificación de las bacterias biodegradadoras de petróleo

Durante un tiempo de 11 a 13 horas se observó que se presentó la mayor población bacteriana, obteniendo así un tiempo óptimo de 12 horas para una mejor masificación bacteriana.

Se verificó que no existe contaminación, ya que se realizó siembras en medio sólido, y se confirmó que únicamente existían en las placas los microorganismos inoculados, no hubo presencia de otros microorganismos ni bacterias.

Campo

Al sembrar este cultivo se pudo observar que las bacterias si están cumpliendo con su función, se comprobó realizando el análisis de TPH de este suelo, el suelo sin cultivo presentó un TPH de 6532,28; mientras que el suelo con cultivo un TPH de 1222,7.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Luego de haber realizado el presente trabajo se han obtenido las conclusiones siguientes:

- ✓ Las condiciones óptimas para cultivar las bacterias biodegradadoras de petróleo son $T=36C$, y $pH=7$.
- ✓ En base al dimensionado realizado se obtuvo, una cámara de cultivo de 63cm de altura, con un diámetro de 45cm, una camisa de enfriamiento de 65cm de altura con un diámetro 60cm, y una velocidad de agitación de 150 rpm.
- ✓ El material seleccionado es acero inoxidable AISI 304 de 4mm de espesor, es óptimo para trabajar con todo tipo de bacterias y microorganismos, este material es resistente a la corrosión y presenta características adecuadas para el moldeo.
- ✓ En las pruebas de validación se obtuvo un tiempo de 4-5 horas, en el que alcanza la esterilización, comprobando que está esterilizado el medio de cultivo porque al realizar siembras no presentó contaminación, y en la masificación presentó un crecimiento óptimo a las 12 horas de producción.
- ✓ El equipo se encuentra produciendo en perfectas condiciones, en el mismo que se ha producido hasta el momento 960 L de cultivo, se estima que el precio en el mercado de 1Kg de cultivo cuesta \$6.00.

5.2 RECOMENDACIONES

Luego de haber realizado las pruebas de validación del biorreactor se recomienda lo siguiente:

- ✓ Para el óptimo y eficiente desempeño del equipo se debe verificar la guía de operación y de mantenimiento preventivo y seguir correctamente todos los pasos indicados.

- ✓ Se recomienda efectuar un control periódico de las conexiones que involucran al sistema eléctrico para evitar fallas y cortocircuitos.

BIBLIOGRAFÍA

- ATKINSON. B., Reactores Bioquímicos, 2. ed. Reverté, 1983. pp. 36-59
- BULLOCK J y KRISTIANSEN B., Biotecnología Básica, 3. ed. Acribia 1991. pp. 12-25
- CENGEL, Y. *Transferencia de Calor*. Mexico, DF, McGraw-Hill, 2003. pp. 256
- CRUEGER, W y CRUEGER, A., Biotecnología: Manual de microbiología Industrial, Acribia, 1993. pp: 110-139
- FOUST. S., Principios de Operaciones Unitaria, Continental, México 1990. pp. 234-238
- GEANKOPLIS, J. Proceso de Transporte y Operaciones Unitarias, México: Continental, 1982. pp. 146-173
- MCCABE, W. Operaciones Unitarias en Ingeniería Química. 6.ed. México: Mc Graw-Hill, 1980. pp. 243-251
- McCORMAC. J., Diseño de Estructuras Metálicas Método ASD, Alfaomega, México, 1999. pp. 143-152
- MEGYESY, E. Manual de Recipientes a Presión: Diseño y Cálculo, Editor Limusa, 2002. pp. 248-250
- MORING, V. Termodinámica. 2. ed. México: McGraw-Hill, 1973. pp.186-197
- OCON, V. Elementos de Ingeniería Química. México: Aguilar, 1979. pp.721-729
- PERRY, H. Manual del Ingeniero Químico. 4. ed. México: Mc Graw-Hill, 2001. pp. 5.1-5.97
- PITA, E. Acondicionamiento del Aire: Principios y Sistemas. Argentina: Ceca, 1994. pp. 97-104
- PITTS, D. *Transferencia de Calor*. Bogotá: McGraw-Hill, 1979. pp.365,369

- SORIANO. E., Fermentadores Enzimáticos y Microbianos: Problemas Resueltos, SPUP, México, 2001. pp. 98-105
- WARD, O.P., Biotecnología de la fermentación. Principios, procesos y productos, Acribia, 1991. pp:70-84

INTERNET

- BIORREACTOR

http://biorreactores/P_SIP2007090_MONROY.htm

2009-07-23

- BIORREMEDIACIÓN

[http://www.estrategiasdebiorremediacion-hidrocarburos - Monogra.htm](http://www.estrategiasdebiorremediacion-hidrocarburos-Monogra.htm)

<http://www.usc.es/uscmn/investigacion/documento/Prestige-Biorremediaci%F3n.pdf>

2009-07-18

- DISEÑO DE BIORREACTORES

<http://diseñodebiorreactor/wikipedia.mht>

2009-07-23

- MICROORGANISMOS BIODEGRADADORES DE PETRÓLEO

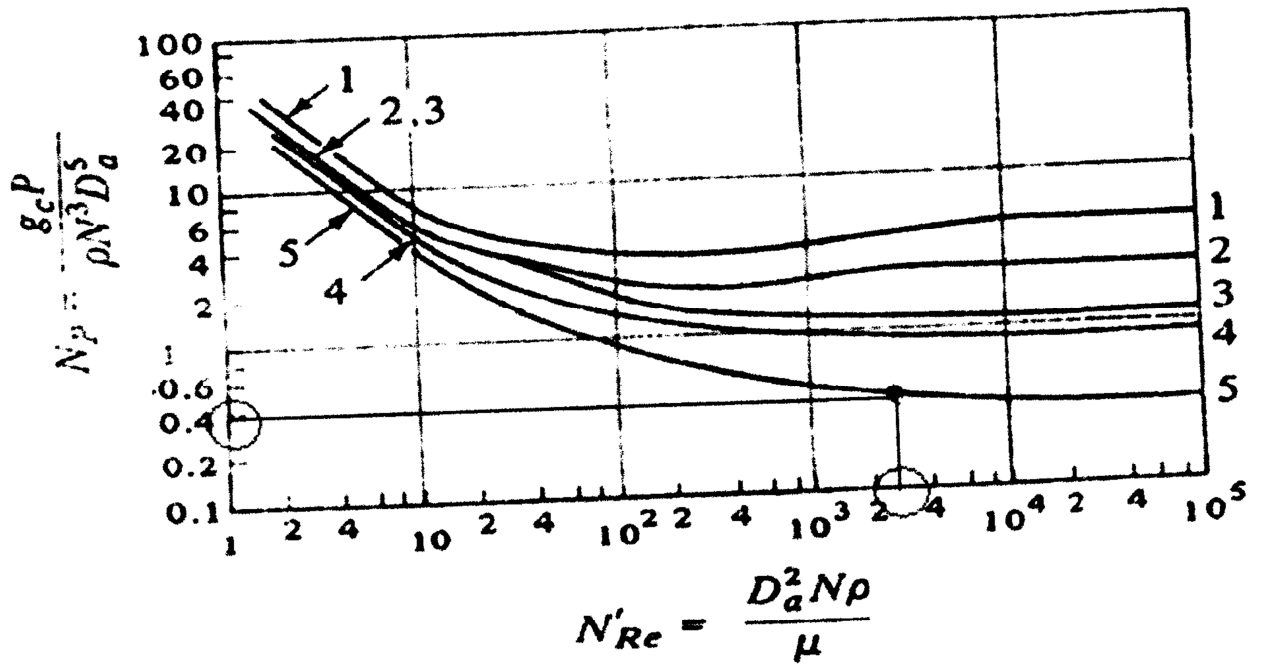
<http://www.solociencia.com/biologia/microorganismosbiodegradadoresdepetroleo-industria.htm>

http://www.bioplanet.net/magazine/bio_sepoct_2000/bio_2000_sepoct_industria.htm

2009-07-18

ANEXOS

ANEXO I
TRANSFERENCIA DE MOMENTO





ANEXO II
PROPIEDADES DEL VAPOR DE AGUA RECALENTADA

Propiedad absoluta. En $\text{pulg}^2/\text{cm}^2$ (temperatura de sat.)	Temperatura (°C)												
	200 93	300 149	400 204	500 260	600 316	700 371	800 427	900 482	1000 538	1100 593	1200 649	1400 760	1600 871
$1 = 0.07 \text{ A}$ (38.75) ρ	24.5	28.2	32.0	35.7	39.4	43.1	46.8	50.6	54.3	58.0	61.7	65.2	76.6
ρ	639.2	664.4	689.8	715.8	742.1	768.8	796.1	823.8	852.0	880.7	909.9	969.9	1032.0
ρ	2.0512	2.1153	2.1720	2.2233	2.2702	2.3137	2.3542	2.3923	2.4283	2.4625	2.4952	2.5566	2.6137
$5 = 0.35 \text{ A}$ (72.96) ρ	4.88	5.63	6.38	7.13	7.88	8.62	9.37	10.11	10.85	11.60	12.34	13.03	15.32
ρ	638.3	663.9	689.6	715.6	741.9	768.7	796.0	823.7	852.0	880.7	909.9	969.9	1032.0
ρ	1.8718	1.9370	1.9942	2.0456	2.0927	2.1361	2.1767	2.2148	2.2509	2.2851	2.3178	2.3792	2.4363
$10 = 0.70 \text{ A}$ (89.57) ρ	2.42	2.81	3.19	3.56	3.93	4.31	4.68	5.05	5.43	5.80	6.17	6.91	7.66
ρ	637.0	663.3	689.3	715.3	741.8	768.6	795.9	823.6	851.8	880.6	909.8	969.8	1031.9
ρ	1.7927	1.8595	1.9172	1.9689	2.0160	2.0596	2.1002	2.1383	2.1744	2.2086	2.2413	2.3028	2.3598
$14.696 = 1.033 \text{ A}$ (101.01) ρ	1.91	2.16	2.42	2.68	2.93	3.18	3.44	3.69	3.94	4.20	4.70	5.21
ρ	662.7	688.9	715.1	741.6	768.5	795.8	823.6	851.8	880.5	909.8	969.8	1031.9
ρ	1.8160	1.8743	1.9261	1.9734	2.0170	2.0576	2.0958	2.1319	2.1662	2.1989	2.2603	2.3174
$20 = 1.41 \text{ A}$ (108.87) ρ	1.40	1.59	1.78	1.96	2.15	2.34	2.52	2.71	2.90	3.08	3.46	3.83
ρ	662.0	688.5	714.8	741.4	768.3	795.7	823.4	851.7	880.5	909.7	969.7	1031.9
ρ	1.7808	1.8396	1.8918	1.9392	1.9829	2.0235	2.0618	2.0978	2.1321	2.1648	2.2263	2.2834
$40 = 2.81 \text{ A}$ (130.70) ρ	0.689	0.788	0.884	0.979	1.074	1.168	1.26	1.35	1.45	1.54	1.73	1.91
ρ	659.4	687.0	713.8	740.7	767.8	795.2	823.1	851.4	880.2	909.5	969.6	1031.7
ρ	1.6994	1.7608	1.8140	1.8619	1.9058	1.9467	1.9850	2.0212	2.0555	2.0883	2.1498	2.2069
$60 = 4.22 \text{ A}$ (144.85) ρ	0.453	0.522	0.587	0.651	0.714	0.777	0.840	0.902	0.965	1.027	1.152	1.276
ρ	656.5	685.4	712.8	739.9	767.2	794.8	822.7	851.1	880.0	909.3	969.4	1031.6
ρ	1.6492	1.7135	1.7678	1.8162	1.8605	1.9013	1.9400	1.9762	2.0106	2.0434	2.1049	2.1621
$80 = 5.62 \text{ A}$ (155.58) ρ	0.388	0.438	0.487	0.534	0.582	0.629	0.676	0.723	0.770	0.863	0.957
ρ	689.8	711.8	732.2	755.7	794.3	822.3	850.8	879.7	909.1	969.2	1031.5
ρ	1.6791	1.7346	1.7836	1.8281	1.8694	1.9079	1.9442	1.9787	2.0115	2.0721	2.1303
$100 = 7.03 \text{ A}$ (164.53) ρ	0.308	0.349	0.388	0.427	0.465	0.503	0.540	0.578	0.616	0.690	0.765
ρ	682.1	710.7	738.4	766.1	793.9	822.0	850.5	879.5	908.8	969.1	1031.3
ρ	1.6518	1.7083	1.7581	1.8029	1.8443	1.8829	1.9193	1.9538	1.9867	2.0484	2.1056
$120 = 8.44 \text{ A}$ (171.82) ρ	0.255	0.289	0.322	0.355	0.387	0.418	0.450	0.481	0.513	0.575	0.638
ρ	680.3	709.6	737.7	765.5	793.4	821.6	850.2	879.2	908.6	969.0	1031.2
ρ	1.6387	1.6869	1.7370	1.7822	1.8237	1.8625	1.8990	1.9335	1.9664	2.0281	2.0854

ANEXO III

ANÁLISIS DE LABORATORIO DE SUELO QUE SERÁ TRATADO CON BACTERIAS CULTIVADAS EN EL BIORREACTOR

 LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Telefax: (03)2968-910 Ext. 169	 ENSAYOS No OAE LE 2C 06-008
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

INFORME DE ENSAYO No. ST: 0074
10 - 0010 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: PROYECTO DE BIORREMEDIACIÓN SACHA 161
Atn. Ing. Carlos Chávez
Dirección: Panamericana Sur Km 1 ½ . Riobamba, Chimborazo

FECHA: 18 de Enero de 2010
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2010 /01 / 18 - 12:45
FECHA DE MUESTREO: 2010 /01 / 17 - 13:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2010 /01/ 18 - 2010 /01/ 18
TIPO DE MUESTRA: Suelo
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-S 0246-10
CÓDIGO DE LA EMPRESA: MS-PT2-L1
PUNTO DE MUESTREO: 294575(x) 4969950(y)
ANÁLISIS SOLICITADO: Análisis de Suelos
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Ing. Carlos Chávez
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.: 24.0 °C. T min: 20.0°C


RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	PEE-CESTTA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	MÉTODO /NORMA
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/26 TNRC 1005	mg/kg	6532,28	-	± 2%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 MÉTODO 8100	mg/kg	<0,6	-	± 6%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/33 EPA 3050B, APHA 3030B, 3111 B	mg/kg	1,53	-	± 30%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/31 EPA 3050B, APHA 3030B, 3111 B	mg/kg	<30	-	± 50%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/29 EPA 3050B, APHA 3030B, 3111 B	mg/kg	<20	-	± 23%


OBSERVACIONES:

- Muestra transportada en refrigeración

RESPONSABLES DEL INFORME:




 Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO




 Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

ANEXO IV

ANÁLISIS DE LABORATORIO DE SUELO TRATADO CON BACTERIAS CULTIVADAS EN EL BIORREACTOR

 LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Telefax: (03)2968-910 Ext. 169	 ENSAYOS No OAE LE 2C 06-008
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

INFORME DE ENSAYO No. 1249
ST: 10 – 0152 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: PROYECTO DE BIORREMEDIACIÓN SACHA 161
Atn. Ing. Carlos Chávez
Dirección: Panamericana Sur Km 1 ½. Riobamba, Chimborazo

FECHA: 24 de Agosto de 2010
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2010 /08 / 17 – 10:42
FECHA DE MUESTREO: 2010 /08 / 13 – 11:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2010 /08/ 17 – 2010 / 08 / 24
TIPO DE MUESTRA: Suelo
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-S 2912-10
CÓDIGO DE LA EMPRESA: PT2 L1
PUNTO DE MUESTREO: 294575X; 9968900 Y
ANÁLISIS SOLICITADO: Tabla 6 RAOHE
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Ing. Carlos Chávez
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:24.0 °C. T min.: 20.0°C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	PEE-CESTTA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	MÉTODO /NORMA
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/kg	1180,12	2500	± 16%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 MÉTODO 8100	mg/kg	<0,3	<2	± 30%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/33 EPA 3050B, APHA 3030B, 3111 B	mg/kg	<0,8	<2	± 30%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/31 EPA 3050B, APHA 3030B, 3111 B	mg/kg	<30	<50	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/29 EPA 3050B, APHA 3030B, 3111 B	mg/kg	<20	<100	± 38%

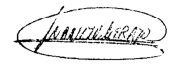
OBSERVACIONES:

- Muestra transportada en refrigeración
- Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en toda las fases de la industria hidrocarburiífera, incluidas las estaciones de servicios. Uso agrícola. Tabla 6 RAOHE.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

**LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH**


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

ANEXO V
MANUAL DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR AUTOMÁTICO PARA EL
CULTIVO DE BACTERIAS BIODEGRADORAS DE PETRÓLEO

PROCESO DE ESTERILAZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

1. Cargar agua en la camisa del biorreactor.
2. Activar la bomba en el tablero de control para hacer recircular el agua de la camisa hacia el caldero hasta cubrir totalmente las 2 resistencias (hasta la señal de la mirilla).

CONTROL → CONTROL MOTORES → BOMBA START

3. Encender las 2 resistencias mediante el tablero de control.

CONTROL → CONTROL SV Y RS → RESISTENCIA 1 STAR
RESISTENCIA 2 STAR

4. Controlar la temperatura del caldero periodicamente en el tablero de control hasta alcanzar una temperatura de 95 °C, alcanzando esta temperatura abrir la valvula de vapor para dar paso al vapor hacia la camisa del biorreactor.

CONTROL → CONTROL SV Y RS → VALVULA DE VAPOR STAR

5. Controlar periódicamente en intervalos de 30min el nivel del agua en la mirilla del caldero, verificando que las resistencias estén cubiertas de agua, de faltar agua recircular mediante la bomba desde la camisa del biorreactor el condensado al caldero.
6. Durante 5 horas se alcanza la temperatura y presión requerida para la esterilización (121C , 18 Psi).
7. Apagar todo dispositivo encendido en el tablero de control.

BOMBA OFF
RESISTENCIA 1 OFF
RESISTENCIA 2 OFF
VALVULA DE VAPOR OFF

ANEXO V
MANUAL DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR AUTOMÁTICO PARA EL
CULTIVO DE BACTERIAS BIODEGRADORAS DE PETRÓLEO

8. Evacuar por la descarga de la camisa del biorreactor el agua y vapor que se produce por el proceso de esterilización .
9. Introducir agua fría hasta llenar completamente la camisa del bioreactor y recircular el agua accionando la bomba y la válvula de agua hasta que desienda la temperatura a la requerida (38-33) °C.

CONTROL → CONTROL MOTORES → BOMBA START

CONTROL → CONTROL SV Y RS → VALVULA DE AGUA START

Nota:

- ✓ Durante el proceso de esterilización en intervalos de 45min accionar el sistema de agitación por 25min para homogenizar la temperatura del medio de cultivo.

CONTROL → CONTROL MOTORES → AGITACIÓN START

PROCESO DE CULTIVO

1. Al obtener la temperatura de cultivo (38-33)C, adicionar el inóculo bacteriano por la alimentación de la cámara de cultivo.
2. Introducir un tapón de algodón con alcohol en la entrada de la alimentación para que no exista contaminación al momento que se libere CO₂, durante la producción.
3. Conectar la manguera de ingreso de aire y encender el compresor, regulando la cantidad de aire requerida.
4. Activar el control automático, estableciendo la temperatura y el tiempo de producción.

CONTROL → CONTROL AUTOMÁTICO → CALENTAMIENTO

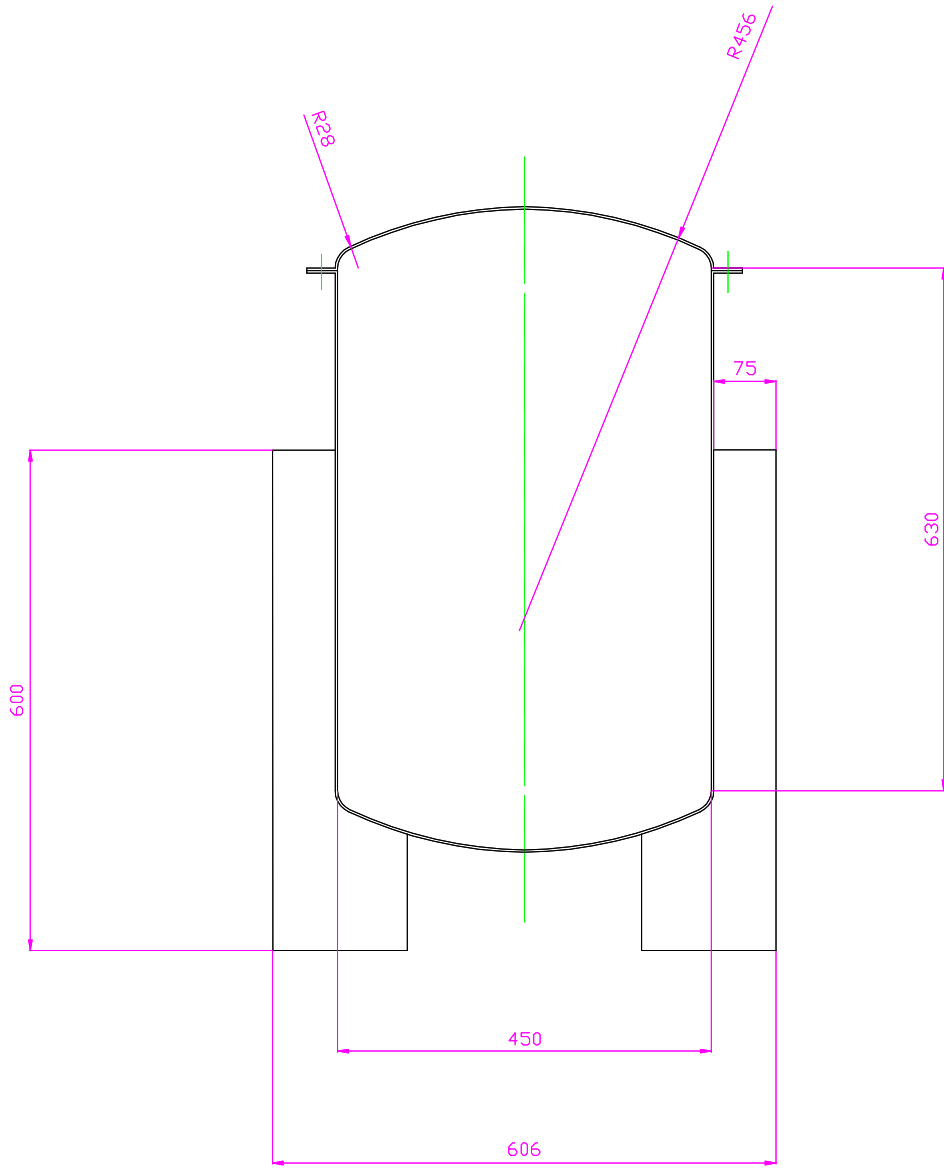
5. Al cumplir con el tiempo de producción apagar el control automático.
6. Descargar la producción.

ANEXO VI
MANTENIMIENTO PREVENTIVO PARA EL BIORREACTOR BATCH
AEROBIO.

Este mantenimiento surge de la necesidad de rebajar el correctivo y todo lo que representa, pretende reducir la reparación mediante una rutina de inspecciones periódicas y la renovación de los elementos dañados, para esto mencionaremos las inspecciones a seguir.

- Antes de la utilización del equipo verificar el manual de operación, ya que este nos ayudara a comprender y evitar daños en las instalaciones del equipo.
- Después de cada proceso de esterilización verificar mediante la válvula de escape que no exista vapor dentro de la camisa, ya que este puede causar problemas de cavitación en la bomba.
- Luego de cada descarga del cultivo lavar inmediatamente la cámara, ya que esto nos ayudara a evitar problemas de corrosión.
- Se debe utilizar agua desmineralizada para el caldero ya que así garantizaremos una excelente calidad del vapor minimizando los efectos de incrustaciones en las paredes del equipo esto se lograría implementando un sistema de filtros en la entrada del depósito de agua.
- Desmontar por lo menos cada 4 meses las resistencias del caldero para retirar posibles incrustaciones producidas por los sólidos presentes en el agua ya que estos impiden la transferencia de calor.
- Hacer recircular una solución diluida de ácido nítrico para la limpieza de incrustaciones en la tubería y válvulas
- Mantener limpio y seco tanto el motoreductor como la bomba ya que pueden circuitarse en contacto con la humedad.
- Tener en stock por lo menos 2 pares de resistencias eléctricas ya que estas son propensas a quemarse por descuido del nivel de agua en el proceso de esterilización.
- Tener siempre seguro el tablero de control, una vez que haya terminado el proceso.

ANEXO VII
DIMENSIONAMIENTO DEL EQUIPO

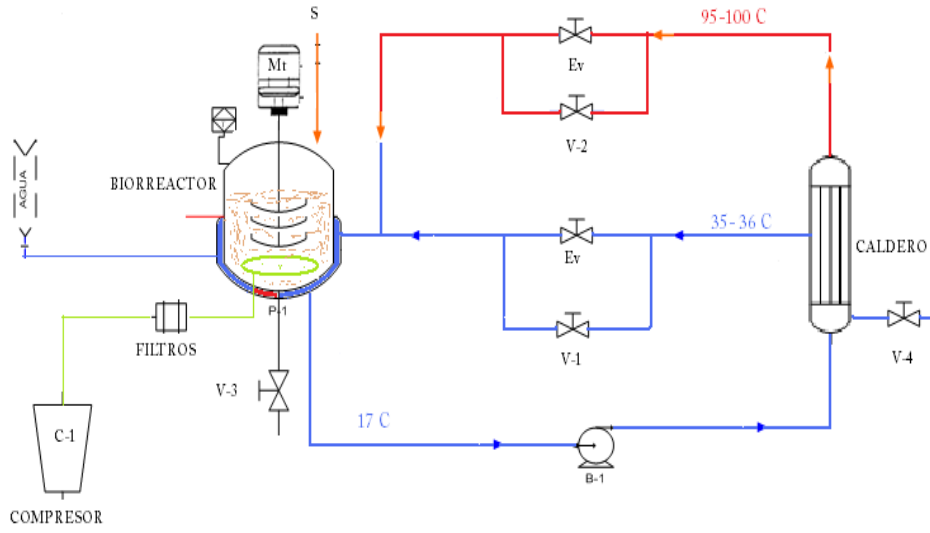


ANEXO VIII
BIOREACTOR CONSTRUÍDO Y ENSAMBLADO

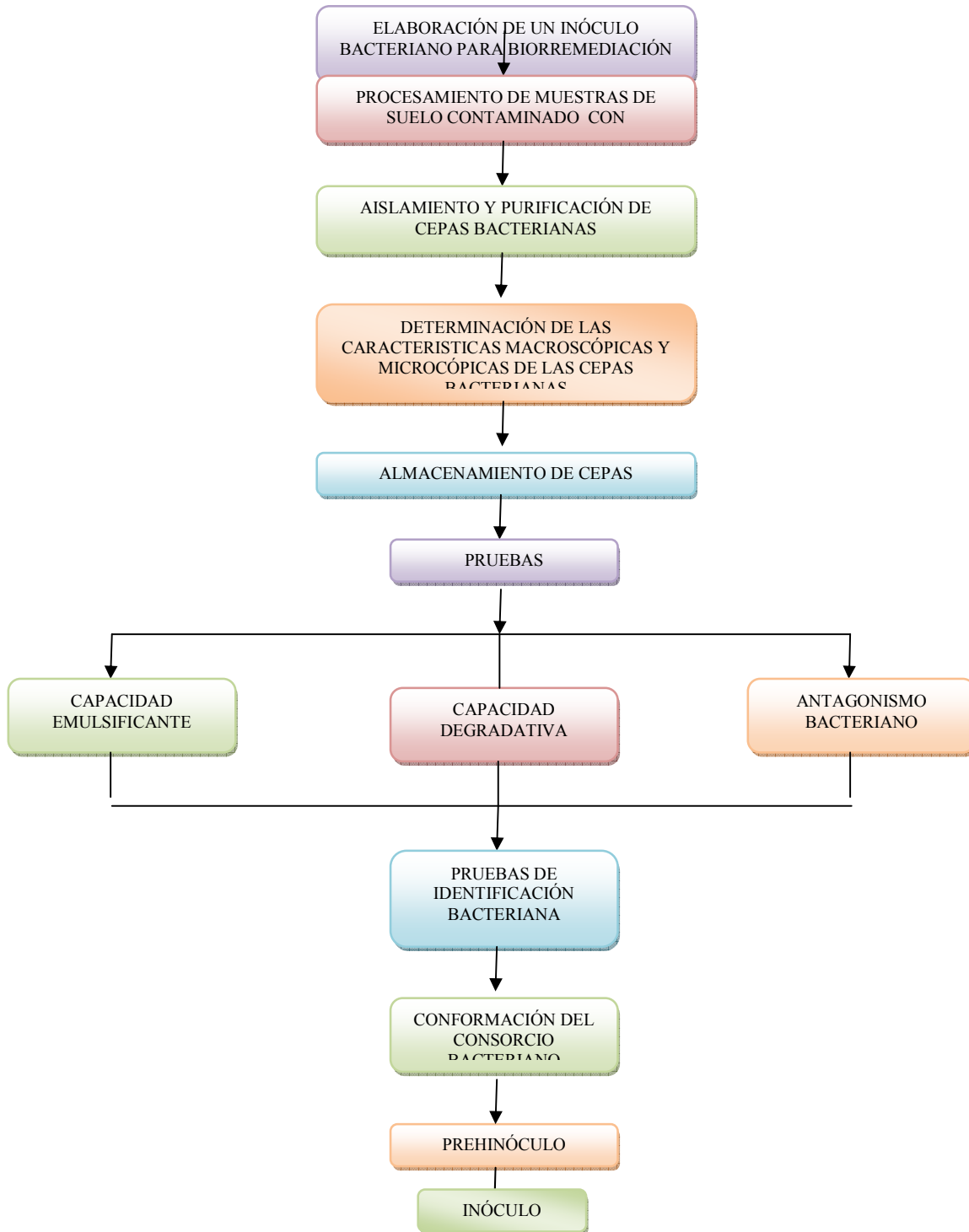


ANEXO IX DIAGRAMA DEL PROCESO

Ev Electrovalvulas V-1 V-2 V-3 V-4 Valvulas B-1 Bomba C-1 Compresor Mt Motoreductor S Alimentacion



ANEXO X
DIAGRAMA DE FLUJO DE LA ELABORACIÓN DEL INÓCULO QUE
INGRESAR AL BIORREACTOR



ANEXO XI DIAGRAMA DEL CONTROL AUTOMÁTICO

