



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERIA QUÍMICA E INDUSTRIAS
EXTRACTIVAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD DE UN LECHO DE PARTÍCULAS
CON BIOPELÍCULA EN FLUIDIZACIÓN INVERSA
EN DOS FASES (SÓLIDO-LÍQUIDO)

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias
con especialidad en Ingeniería Química

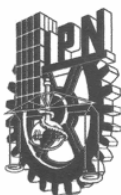
Presenta

ING. KARLA EDITH CAMPOS DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO LIMAS BALLESTEROS

MÉXICO D.F., JUNIO DE 2007





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 12:00 horas del día 22 del mes de Junio del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La ESIQIE para examinar la tesis de grado titulada:

"DETERMINACION DE LA POROSIDAD DE UN LECHO DE PARTICULAS CON BIOPELICULA EN FLUIDIZACION INVERSA EN DOS FASES (SOLIDO-LIQUIDO)"

Presentada por el alumno:

CAMPOS Apellido paterno	DIAZ materno	KARLA EDITH nombre(s)						
Con registro: B			0	4	1	1	8	2


Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

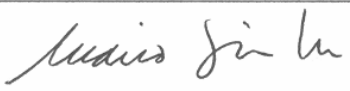
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Director de Tesis
DR. ROBERTO LIMAS BALLESTEROS

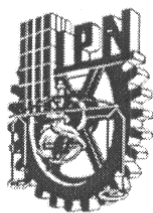

DR. RICARDO MACIAS SALINAS


DR. JUAN RAMON AVENDAÑO GOMEZ


DR. MARIO GONZALO VIZCARRA MENDOZA


DRA. MA. ELENA DE LA LUZ NAVARRO CLEMENTE


EL PRESIDENTE DEL COLEGIO
DR. JOSE JAVIER CASTRO ARELLANO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 26 del mes de Junio del 2007 el (la) que suscribe ING. KARLA EDITH CAMPOS DÍAZ alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA** con número de registro B041182, adscrito a la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del DR. ROBERTO LIMAS BALLESTEROS y ceden los derechos del trabajo intitulado DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD DE UN LECHO DE PARTÍCULAS CON BIOPELÍCULA EN FLUIDIZACIÓN INVERSA EN DOS FASES (SÓLIDO-LÍQUIDO), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos de Investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección rballesteros@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Karla Edith Campos Díaz
Nombre y firma

Agradecimientos

“Abandonar mi misión, sería temer a la muerte, y esto es para el soldado frente al enemigo, lo peor y lo más insensato. Antes morir que ser cobarde”

“Ser cobarde es un mal y lo malo hay que evitarlo, o con la vida termina todo y entonces la paz del sueño se trunca en paz eterna”

“La vida prosigue en otro lugar, y entonces allí continuaré mis preguntas y mis averiguaciones”

Sócrates

La felicidad no es una estación a la que llegar sino una forma de viajar
MARGARET LEE RUNBECK

La búsqueda de la felicidad
es personal y no un modelo
que podamos dar a los demás
PAULO COELHO

Cuando la puerta de la felicidad se cierra,
otra se abre, pero a menudo estamos
tan obsesionados con la que se cerró
que no podemos ver la que se ha abierto
para nosotros
HELEN SÉLLER

Las tres cosas más importantes:
algo que hacer, alguien a quien amar
y algo para esperar
ALLAN CHALMERS

El secreto para la salud del cuerpo
y de la mente es no lamentarse
por el pasado, no preocuparse
por el futuro y no anticipar los problemas
es vivir el momento presente
con sabiduría y pasión
BUDA

La primera condición para estar siempre
felices es tener un propósito, un objetivo
en la vida fuera de nosotros mismos
HUGO BLACK

Al **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL** por darme la oportunidad de crecer como profesional para colaborar con el desarrollo del país.

A la **Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas** por permitirme dar un paso más adelante en mi formación profesional y llevarlo a cabo en la misma institución la cual me vio crecer como profesional y como persona seis años de mi vida.

A mi profesor consejero y director de tesis: **Dr. Roberto Limas Ballesteros**, por aceptar que participara en sus proyectos y compartir conmigo sus conocimientos sin reserva alguna, por ayudarme a finalizar con éxito la tesis, y apoyarme siempre como director de tesis, consejero, maestro y amigo.

Al **Dr. Luis Bernardo Flores Cotera**, por brindarme su tiempo y contar siempre con su fina atención compartiendo conmigo sus conocimientos y permitirme adquirir conocimientos adicionales en el Departamento de Biotecnología del CINVESTAV.

A todos mis **Maestros de la Maestría**, por colaborar en la enseñanza y apoyar mi proyecto de tesis, mostrándome que los conocimientos no se encuentran aislados, y por dejarme en claro que los valores también son importantes para triunfar en la vida.

Ing. Karla Edith Campos Díaz

A mis **Padres**, por haberme dado la vida y la oportunidad de crecer como persona y profesionista, por ser mis amigos, por ayudarme y por apoyarme en todas las decisiones que tomo en la vida.

A mi **Mamá Esperanza Díaz**, por estar siempre pendiente de mi, por entenderme en mis momentos difíciles y darme toda su confianza para sentirme con suficiente ánimo para seguir adelante y por no dejarme caer cuando llegué a sentirme desfallecer.

A mi **Papá Bernardo Campos**, porque aunque no estuvo aquí de manera presente, siempre estuvo al tanto de lo que me pasaba y por escucharme aunque algunas veces yo se que no comprendía muy bien algunas cosas de mi proyecto de tesis.

A mi **Hermana Jessica Campos**, por estar aquí y por escuchar mis consejos para poder llegar a la culminación de su carrera.

A mi Profesor de Polimeros y Asesor de Tesis de Licenciatura: **Ing. Jorge Morán Guzmán**, por haberme dado siempre sus consejos y alentarme a seguir la Maestría, le doy en especial las gracias por siempre preguntar por mi y tenerme presente.

Al **Ing. Alejandro Marqués** de la empresa Espumas de México S. A. de C. V., por apoyarme desde que egrese de la licenciatura hasta estos instantes, por su colaboración en el desarrollo de mi proyecto en el aspecto microbiológico y por brindarme su amistad.

A mi amiga la **Ing. Brisa Arlett Aguilar**, por estar conmigo en los momentos buenos y difíciles de mi vida, por apoyarme y preocuparse cuando veía que algo no estaba bien en mi y por formar parte de mi vida desde la secundaria.

A l **Ing. Luis Alberto Campa**, por ser mi amigo desde la Licenciatura, y seguir siéndolo en la maestría, por ser mi compañero de equipo y de de trabajo, y por haber participado siempre en el desarrollo de mi proyecto de tesis.

A mis compañeras de maestría **Ing. Miriam Gómez** y la **Ing. Marbella Amador** por apoyarme siempre sobre todo en la parte microbiológica de mi proyecto y compartir conmigo sus conocimientos.

A mis compañeros del **CINVESTAV** en especial: **Rita Fuentes, Ing. Azucena Mota, Ing. Jorge Ruiz, Ing. Fabiola Islas, M. en C. Alejandro García, M. en C. Isaac Chaírez** por brindarme su amistad, y sus valiosas aportaciones y comentarios en el desarrollo de mi proyecto.

A **Dios**, por darme la fuerza de seguir adelante, por no desfallecer en ningún momento para poder lograr siempre mis objetivos y por dejarme creer en mi y en mi capacidad para llegar muy alto.

A la **Vida**, por darme momentos tan maravillosos los cuales me llenan de satisfacciones y me ayudaron a llegar a obtener éxito, por motivarme para nunca darme por vencida logrando con esto alcanzar mis metas.

A una persona especial, por estar cerca de mi tantos años y ser un motivo más para seguir, apoyarme y por darme ánimos para que siga superándome, dándome una lección de vida y enseñarme que el que quiere puede seguir adelante lo hace con o sin apoyo de sus seres queridos

Ing. Karla Edith Campos Díaz

A todos mis **Amigos**, por estar conmigo en los momentos malos y buenos de mi vida, por ser mis compañeros de diversión y por motivarme para nunca darme por vencida logrando con esto alcanzar mis metas.

NOMBRE	INSTITUCION
Alejandro García González	CINVESTAV
Azucena Mota Gutiérrez	CINVESTAV
Brisa Arlett Aguilar Méndez	ESIQIE
Elizett Uscanga Hernández	ESIQIE
Enrique Carbajal Carvajal	ESIQIE
Fabiola Islas Lugo	CINVESTAV
Fernando Archundía Doroteo	ESIQIE
Daniel Flores Chávez	ESIQIE
Isaac Chairez Oria	CINVESTAV
Ivanhoe Romero Ramon	ESIQIE
Jorge Ruíz Sanchez	CINVESTAV
Karla Fabiola Ramírez Rosales	ESIQIE
Lluvia Pérez Perusquía	ESCOM.
Marbella Amador Cruz	UPIBI
María de Lourdez Limón López	ESIQIE
Miriam Gómez Álvarez	ESIQIE
Rita Fuentes Aguilar	UPIBI
Sinhue Renteria González	ESIQIE
Sirenia Enriquez Vázquez	ESIQIE
Orlando T. Ochoa López	ESIA
Williams de los Santos Ramos	ESIQIE

Y a todos mis **Profesores**, por haberme ayudado a prepararme mejor y enseñarme conocimientos extras para poder desempeñar mejor mi trabajo dentro de la Maestría.

NOMBRE	INSTITUCION
Dr. Roberto Limas Ballesteros	ESIQIE
Dr. Christian Bouchot-Duran	ESIQIE
Dr. Ricardo Macias Salinas	ESIQIE
Dr. Luis Bernardo Flores Cotera	CINVESTAV
Dr. José Javier Castro Arellano	ESIQIE
Dr. Juan Ramón Avendaño	ESIQIE
Dra. María Elena Navarro	ESIQIE
Lic. Agustín Villareal	ESIQIE

Creo que las casualidades no existen, por eso creo que por algo existes en mi vida... seguramente Dios quería que te conociera, que te tuviera dentro de mi corazón y que fueras parte de mi vida...

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

- **Por permitirme hacer la Maestría y darme el apoyo económico, agradezco a:**

Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas (ESIQIE-IPN)

Laboratorio de Investigación en Ingeniería Química Ambiental

Programa de Becas CONACYT

Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)

Instituto Politécnico Nacional por la Beca Tesis Recibida

- **Por su colaboración en el recubrimiento sintético de la primera parte experimental de la tesis:**

Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN)

**Ing. Marcela Ramírez Campos
Ing. Hugo Alfonso Ceballos Romero**

- **Por su colaboración en la parte microbiológica de la tesis y los cursos recibidos:**

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (CINVESTAV)

**Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Dra. Josefina Barrera Cortés
Ing. Jorge Ruiz Sánchez**

- **Por colaborar con nosotros y permitirnos obtener más evidencia en la parte microbiológica con la ayuda del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) agradezco especialmente a:**

**Laboratorios Centrales (CINVESTAV)
Q.F.B. Sirenia González**

- **Por compartir sus conocimientos de microbiología y la donación del Lactobacillus Acidophilus agradezco a:**

**Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Biotecnología (UAM-IZT)
Dra. Maria Eva Rodriguez Huevo
Ing. Reyna Duran Lugo**

**DANISCO México, S.A. de C.V.
Ana Luisa Jasso**

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
SIMBOLOGIA	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. Generalidades	4
1.1 La Fluidización	4
1.2 La Columna de Fluidización	4
1.3 Las Partículas	4
1.3.1 Caracterización del Tamaño de las Partículas	5
1.3.2 Forma de la Partícula	7
1.4 Hidrodinámica de los Lechos Fluidizados	7
1.5 Biofluidización	8
1.6 Capa Biológica o Biocapa	9
1.6.1 La Investigación en el Modelado de Biocapas	10
CAPITULO 2. Antecedentes	13
2.1 Fluidización Sólido-Líquido	14
2.2 Fluidización Sólido-Líquido en Biotecnología	19
2.3 Fluidización Sólido-Líquido a Flujo Inverso	32
CAPITULO 3. Desarrollo Teórico	36
3.1 Procedimiento para la Extensión de la Ecuación de Limas-Ballesteros (1982) para la predicción de la expansión de un Lecho Fluidizado Sólido-Líquido a Flujo Inverso con Crecimiento de una Capa Biológica.	36
3.2 Desarrollo de la Ecuación para Calcular la Masa Final de una Partícula cuando hay Crecimiento Microbiológico.	39
3.3 Simulación del Crecimiento de la Biocapa con Modelo 2D de Picioreanu	41
3.3.1 Definición del Sistema	41

CAPITULO 4. Experimentación	43
4.1 Planeación Experimental	43
4.2 Descripción de la Instalación de un Lecho Fluidizado	45
4.3 Desarrollo Experimental de la Expansión de las partículas de un Lecho Fluidizado con Capa Sintética	47
4.3.1 Las partículas	47
4.3.2 Fluidización Sólido-Líquido a Flujo Inverso	48
4.4 Desarrollo Experimental de la Expansión de las Partículas de un Lecho Fluidizado con una Película Sintética	48
4.4.1 Los Microorganismos	48
4.4.2 Preparación del Inóculo	49
4.4.3 Identificación del <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	49
4.4.4 Formación de la Biopelícula	50
4.4.5 Espesor de la Biopelícula	51
4.4.6 Tratamiento de las Muestras para su observación mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).	52
CAPITULO 5. Resultados y Discusión	55
5.1 Adhesión de los Microorganismos al Sustrato y Formación de la Biopelícula	55
5.2 Resultados de la Medición del Espesor de la Biocapa	57
5.3 Resultados del Cálculo Teórico del Diámetro de Partículas y de la Masa Total de las Biopartículas en Función del Tiempo	58
5.4 Comparación del Cálculo del Espesor de la Capa Biológica con el Simulador del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Tecnología de Delf	59
5.5 Valores de las Variables y Números Adimensionales Consideradas en la Expansión del Lecho	60
5.6 Análisis de los Resultados de Porosidad del Lecho Obtenidos por la Expansión de Partículas en un Lecho Fluidizado con Película Sintética y con Capa Biológica	62
5.6.1 Función de Porosidad de Wen y Yu	63
5.6.2 Función de Porosidad de Riba y Couderc	64
5.6.3 Función de Porosidad de Ramamurthy-Subbaraju	65

5.6.4 Función de Porosidad de Richardson y Zaki	66
5.6.5 Función de Porosidad de Setiadi	67
5.6.6 Función de Porosidad de Campos Díaz-Limas Ballesteros	68
5.7 Cálculo de los Porcentajes de Error de las Ecuaciones Consideradas	69
5.7.1 Porcentaje de Error de la Ecuación de Wen y Yu.	69
5.7.2 Porcentaje de Error de la Ecuación de Riba y Couderc.	70
5.7.3 Porcentaje de Error de la Ecuación de Ramamurthy y Subbaraju	71
5.7.4 Porcentaje de Error de la Ecuación de Richardson y Zaki	72
5.7.5 Porcentaje de Error de la Ecuación de Tjandra Setiadi	73
5.7.6 Porcentaje de Error de la Ecuación Campos Diaz – Limas Ballesteros	74
5.8 Cálculo de la Porosidad del Lecho en Función del Tiempo	75
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	78
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
ANEXO A. Curvas de Calibración	84
ANEXO B. Datos de Wilhem y Kwauk	87
ANEXO C. Programa	90
C.1 Programa para Calcular la Masa Final de una Partícula cuando hay Crecimiento Microbiológico	90
ANEXO D. Determinación de Sacarosa Curvas de Calibración	93
D.1 Técnica para la Determinación de azúcares por DNS (sacarosa)	93
ANEXO E. Tinción Gram	97
E.1 Tinción de Gram para Determinar si hay Contaminación en el Medio de Cultivo del Proceso	97

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto sobre la porosidad de un lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso por el crecimiento del tamaño de las partículas por una capa biológica.

En la primera etapa se realizaron experimentos de fluidización a flujo inverso en una columna cilíndrica de vidrio de 4 cm de diámetro con un lecho de partículas esféricas de polipropileno ($d_p = 4 \text{ mm}$), con densidad menor a la del agua ($\rho_p = 808 \text{ Kg/m}^3$) y una distribución de tamaño uniforme, las cuales fueron recubiertas por una película sintética de material vinil-acrílico, utilizando como fluido de trabajo agua a una temperatura de 20°C .

En la segunda parte de este trabajo se realizaron experimentos de fluidización a flujo inverso en dos fases con las partículas de polipropileno, utilizando un inóculo de *Lactobacillus acidophilus* y como fluido de trabajo un medio de cultivo MRS (Man-Rogosa-Sharpe); controlando la temperatura a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y el pH del medio se mantuvo en un intervalo de 5.5 ± 0.5 , con esto se logró un aumento en el diámetro y la densidad de las partículas al cabo de 168 horas, y se determinó de manera experimental la altura del lecho a diferentes velocidades de flujo, comenzando en la velocidad mínima de fluidización hasta valores de 0.73 de porosidad del lecho.

El recubrimiento de capa biológica por *Lactobacillus acidophilus* se confirmó haciendo una tinción de gram de una muestra de partículas, las cuales se observaron en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico de barrido (MEB) comprobando solo la presencia del *Lactobacillus acidophilus* en el recubrimiento. El espesor de la biocapa se midió con un microscopio óptico y este se verificó con las micrografías del MEB.

Para representar los datos experimentales primero se probaron algunas expresiones matemáticas de bibliografía para expansión de lecho fluidizado en flujo tradicional (de abajo hacia arriba), con lo que se demostró que las correlaciones para predecir la porosidad del lecho en fluidización tradicional se pueden utilizar para estimar la porosidad del lecho a flujo inverso.

Se propuso una expresión matemática para representar los valores experimentales de la porosidad del lecho en función del número de Reynolds (Re) y Arquímedes (Ar) usando el mismo enfoque del modelo desarrollado por Limas et al. (1982) y se determinaron los nuevos parámetros de la ecuación utilizando los valores experimentales publicados por Wilhelm y Kwauk (1948), para números de Reynolds menores a 200, los valores obtenidos se

compararon con los de correlaciones publicadas en la literatura. La ecuación propuesta en este trabajo da una desviación estándar de 3.98% para todos los datos experimentales.

Los resultados obtenidos confirmaron que:

- Las correlaciones utilizadas para predecir la porosidad del lecho fluidizado sólido-líquido a flujo tradicional se pueden utilizar para calcular la porosidad de lecho fluidizado a flujo inverso, respetando sus intervalos de aplicación.
- Es posible obtener una capa biológica adherida a un soporte inerte en un lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso.
- La ecuación que se propone proporciona la menor desviación estándar para partículas con biocapa y resulta de fácil aplicación para el escalamiento de equipos por el uso de números adimensionales en las correlaciones.

ABSTRACT

In the present work the effect on porosity bed of a solid-liquid fluidized bed reactor because of the growth of the particles size by biological layer was studied.

In the first stage experiments of inverse flow fluidization were made in a glass cylindrical column with diameter of 4 cm, with polypropylene spherical particles ($d_p = 4$ mm), with density lower than water ($\rho_p = 808$ Kg/m³) and uniformly sized distribution. Particles were coated with a synthetic film of vinyl-acrylic material, using water was used as fluid work at 20°C.

In the second part experiments were done inverse fluidization with the polypropylene particles in anaerobic conditions, *Lactobacillus acidophilus* inoculum, MRS culture medium (Man-Rogosa-Sharpe) was used as fluid work, the temperature was controlled at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ and was maintained in 5.5 ± 0.5 , with this the diameter and density the particles increased in 168 hours, the bed height was determined experimentally at different water flow rates, beginning since the minimum fluidization velocity to values of 0.73 of bed porosity.

The particle covering with a biological layer of *Lactobacillus acidophilus* was confirmed by gram tincion of particles sample. These particles were observed in the optical microscope and in the scanning electron microscope (SEM) verifying thus the only presence of the *Lactobacillus acidophilus* in the biofilm. The biofilm thickness was measured with an optical microscope and this was verified with MEB's micrographies.

To represent experimental data a first attempt was done with some mathematical expressions founded in literature for bed porosity expansion in traditional fluidization flow, upside direction and it was shown that correlations to calculate the porosity bed in traditional fluidization can be either utilized to calculate porosity bed expansion in inverse fluidized beds.

A mathematical expresion was proposed to represent the experimental values of void fraction in function of the Reynolds (Re) and Archimedes (Ar) numbers, using the same approach of the equations developed by Limas et al. (1982) and new parameters were determined for this equation utilizing the experimental values published by Wilhelm y Kwauk (1948), for Reynolds number smaller than 200. Values obtained were compared with those of published correlations published in literature. The proposed equation in this work gives a standard deviation of 3.98% for all the experimental data.

The results obtained confirm that:

- The correlations utilized to porosity bed in solid-liquid fluidization with traditional flow can be used for porosity bed fluidization in inverse flow respecting variable range of application.
- It is possible to obtain a biological layer adhered to an inert support in an inverse solid-liquid fluidized bed reactor.
- The equation proposed provides the smaller standard deviation for particles with biofilm and results of easy application for the scale-up of equipments by the use of dimensionless numbers in the correlations.

LISTA DE FIGURAS

No.	Figura	Pág.
Figura 4.1	Esquema de la primera etapa de la metodología experimental	43
Figura 4.2	Esquema de segunda etapa de la metodología experimental	44
Figura 4.3	Diagrama de operación del equipo de fluidización inversa	46
Figura 4.4	Grageadora	47
Figura 4.5	Medida del espesor de la película sintética	47
Figura 4.6	Escala calibrada en mm (retícula)	48
Figura 4.7	Columna de fluidización inversa	48
Figura 4.8	Tinción Gram de <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM LYO	50
Figura 4.9	Tinción Gram de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ^{1,2}	50
Figura 4.10	Medida del espesor de la biopelícula	51
Figura 4.11	Viscosímetro Vibratorio	52
Figura 5.1	Micrografía Soporte Superficie Blanco	55
Figura 5.2	Micrografía Soporte Superficie con Tratamiento	55
Figura 5.3	Micrografía Soporte Interior Blanco	56
Figura 5.4	Micrografía Soporte Interior Proceso	56
Figura 5.5	Micrografía Soporte Superficie antes de proceso	56
Figura 5.6	Micrografía Soporte Poro después de proceso	56
Figura 5.7	<i>Lactobacillus</i> en el interior del Soporte	57
Figura 5.8	Micrografía Espesor de Biocapa	57
Figura 5.9	Acercamiento Espesor de Biocapa	57
Figura 5.10	Simulación del Crecimiento de la Biocapa	59
Figura 5.11	Gráfica $f(\varepsilon)$ usando la ecuación de Wen y Yu contra ε con Película Sintética y Biocapa	63
Figura 5.12	Gráfica $f(\varepsilon)$ usando la ecuación de Riba y Couderc contra ε con Película Sintética y Biocapa	64

Figura 5.13	Gráfica $f(\varepsilon)$ contra ε usando la ecuación de Ramamurthy-Subbaraju con Película Sintética y Biocapa	65
Figura 5.14	Gráfica $f(\varepsilon)$ contra ε usando la ecuación Richardson y Zaki con Película Sintética y Biocapa	66
Figura 5.15	Gráfica $f(\varepsilon)$ contra ε usando la ecuación Tjandra Setiadi con Película Sintética y Biocapa	67
Figura 5.16	Gráfica $f(\varepsilon)$ contra ε usando la ecuación de Campos Díaz-Limas Ballesteros con Película Sintética y Biocapa	68
Figura 5.17	Gráfica de ε teórica contra ε experimental usando la ecuación de Wen y Yu con Película Sintética y Biocapa	69
Figura 5.18	Gráfica de ε teórica contra ε experimental usando la ecuación de Riba y Couderc con Película Sintética y Biocapa	70
Figura 5.19	Gráfica de ε teórica contra ε experimental usando la ecuación de Ramamurthy y Subbaraju con Película Sintética y Biocapa	71
Figura 5.20	Gráfica de ε teórica contra ε experimental usando la ecuación de Richardson y Zaki con Película Sintética y Biocapa	72
Figura 5.21	Gráfica de ε teórica contra ε experimental usando la ecuación de Tjandra Setiadi con Película Sintética y Biocapa	73
Figura 5.22	Gráfica de ε teórica contra ε experimental usando la ecuación de Campos Díaz - Limas Ballesteros con Película Sintética y Biocapa	74
Figura A.1	Curva de Calibración del Rotámetro	85
Figura A.2	Curva de Calibración de la Escala de Temperatura	86
Figura A.3	Curva de Calibración de Sacarosa por el Método de Millar (DNS) $\lambda=550\text{nm}$	87
Figura C.1	Diagrama de Flujo del Programa para Calcular la Masa Final de una Partícula cuando hay Crecimiento Microbiológico	90
Figura D.1	Diagrama de Flujo para la Determinación de Azúcares por DNS (Sacarosa)	96

LISTA DE TABLAS

No.	Título de la Tabla	Pág.
Tabla 1.1	Longitudes Características de las Partículas	6
Tabla 2.1	Correlaciones Matemáticas para el Cálculo de la Expansión del Lecho	15
Tabla 2.2	Ecuaciones para Determinar el Comportamiento de Biocapas en Reactores de Lecho Fluidizado	20
Tabla 2.3	Modelos Matemáticos para el Cálculo de la Expansión del Lecho a Flujo Inverso	33
Tabla 3.1	Extensión de la Ecuación Limas et al., con Datos Experimentales de Wilhelm y Kwauk	37
Tabla 3.2	Extensión de la Ecuación Limas et al., con Datos Experimentales de Wilhelm y Kwauk, Película Sintética y Biocapa	37
Tabla 3.3	Función de la Porosidad de Ecuaciones Consideradas en este Estudio	38
Tabla 3.4	Parámetros para el modelo de Picioreanu (2006)	42
Tabla 5.1	Valores Experimentales para Partículas sin Recubrimiento	58
Tabla 5.2	Valores Experimentales para Partículas con Recubrimiento Inerte	58
Tabla 5.3	Valores Experimentales para Partículas sin Recubrimiento para el Cálculo de la Expansión del Lecho	60
Tabla 5.4	Valores Experimentales para Partículas con Recubrimiento Inerte para el Cálculo de la Expansión del Lecho	61
Tabla 5.5	Valores Experimentales para Partículas con Biocapa	61
Tabla 5.6	Valores para el cálculo de la porosidad del lecho en función del tiempo	75
Tabla A.1	Datos para la Curva de Calibración del Rotámetro	84
Tabla A.2	Informe de Calibración de la Escala de Temperatura	85
Tabla A.3	Datos para la Curva de Sacarosa por el Método de Millar (DNS) $\lambda = 550 \text{ nm}$	87

Tabla B.1	Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros Cuentas pequeñas de Socony en Agua	88
Tabla B.2	Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros Cuentas grandes de Socony en Agua	89
Tabla B.3	Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros Cuentas de Vidrio No. 7	89
Tabla B.4	Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros Cuentas grandes de Socony	89

SIMBOLOGÍA

C_D	Coeficiente de Arrastre
C_I	Coeficiente de Arrastre Inercial
C_o	Concentración de oxígeno disuelta en el líquido
d_A	Diámetro Sieve
d_m	Diámetro medio
d_p	Diámetro de partícula
d_s	Diámetro de una esfera teniendo la misma área superficial de la partícula
d_{st}	Diámetro Stokes
d_{sv}	Diámetro de una esfera teniendo la misma área superficial externa a relación volumen como la partícula.
d_v	Diámetro de una esfera teniendo el mismo volumen de la partícula
D	Diámetro de la columna
D	Difusividad efectiva
Di	Coeficiente de dispersión axial en fase líquida
g	Aceleración debida a la gravedad
H	Altura del lecho
H_{mf}	Altura del lecho correspondiente a la velocidad mínima de fluidización
k_d	Constante de muerte celular
K	Factor de volumen hidrodinámico
K_s, K_c	Constante de saturación de Monod
k_o	Constante media de saturación de oxígeno del microorganismo
L_e	Altura del lecho expandido
m_{bp}	Peso promedio de la biopartícula
M, W	Masa del lecho
M_{Tbp}	Masa total de sólidos con biopelícula a un tiempo (t)
N_{bpT}	Número total de biopartículas
N_p	Número de Partículas
Q	Gasto volumétrico
q_{max}^s	Velocidad máxima específica de consumo del sustrato
r_{bp}	Radio de la biopartícula
$\mathbb{R}(R)$	Velocidad lineal de crecimiento de una partícula
R_1	Velocidad intrínseca de conversión del sustrato por unidad de volumen
R_i	Radio inicial de la partícula
R_{max}	Radio máximo de la partícula a un tiempo t
S	Área de la sección transversal de la columna de fluidización
$[S]$	Concentración del Sustrato
S_i	Concentración del sustrato en la biomasa inerte
S_o, S_a	Concentración del sustrato inicial
S_p	Área superficial de la partícula
t_i	Tiempo inicial
t_f	Tiempo final
v, u_f	Velocidad del fluido
u	Velocidad superficial del fluido
U_e	Velocidad relativa promedio entre partículas y fluido

u_i	Valor de u para una fracción de porosidad igual a la unidad
u_{mf}	Velocidad mínima de fluidización
U_R	Relación de velocidades (U_ε/U_t)
u_t	Velocidad terminal de la partícula
V_{bp}	Volumen de la biopartícula
V_{Ro}	Volumen inicial de la partícula
V_p	Volumen de una partícula
w	Espesor de la capa límite
X, X_a	Concentración de la biomasa

SIMBOLOGÍA GRIEGA

ε	Porosidad del lecho
ε_{mf}	Porosidad del lecho correspondiente a la velocidad mínima de fluidización
δ	Espesor de la biopelícula
ρ	Densidad seca de la biopelícula
ρ_L	Densidad del líquido
ρ_p	Densidad de la partícula
ρ_s, ρ_{bf}	Densidad de la biopartícula
ρ_{bp}, ρ_b	
Φ_ε	Función de la porosidad
ψ	Factor de forma
μ	Velocidad específica de crecimiento por día
μ_L	Viscosidad del líquido
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento de microorganismos
π	3.1416

GRUPOS ADIMENSIONALES

Ar	Número de Arquímedes $\left[= d_p^3 g \rho_L (\rho_L - \rho_s) / \mu_L^2 \right]$
C	Fracción volumen de sólidos $\left[= (1 - \varepsilon) \right]$
De	Relación de densidades $\left[= \rho / \rho_p \right]$
$f(\varepsilon)$	Función de la porosidad
Ga	Número de Galileo $\left[= d_p^3 g \rho_L^2 / \mu_L^2 \right]$
Ga'	Número de Arquímedes para la ecuación de Tjandra Setiadi (1989)
Ga_s	Número de Galileo basado en el diámetro-superficie $\left[= d_s^3 g \rho_L^2 / \mu_L^2 \right]$
Mv	Relación de Densidades $\left[= \rho_L - \rho_p / \rho_L \right]$
n	Exponente de la Ecuación de Richardson-Zaki
Re	Número de Reynolds $\left[= d_p v \rho_L / \mu_L \right]$
Re_{mf}	Número de Reynolds correspondiente a la velocidad mínima de fluidización $\left[= d_p v_{mf} \rho_L / \mu_L \right]$
Re_s	Número de Reynolds basado en el diámetro-superficie $\left[= d_s v \rho_L / \mu_L \right]$
Re_t	Número de Reynolds de partícula terminal $\left[= d u_t \rho_L / \mu_L \right]$

INTRODUCCIÓN

La fluidización es una operación conocida por su amplio uso desde la década de los 50's. Los lechos fluidizados ofrecen más ventajas que desventajas para la realización de diversas operaciones como son las operaciones con reacción. El mezclado rápido de las partículas sólidas lleva a una condición cercana a la isotérmica y mezclado completo a través de todo el reactor.

Entre las aplicaciones probadas a escala industrial de los lechos fluidizados sólido-gas están los procesos catalíticos y no catalíticos, entre los catalíticos se encuentran la desintegración catalítica y la reformación de los hidrocarburos, la oxidación del naftaleno a anhídrido ftálico y la amoxidación del propileno a acrilonitrilo (Nikolov y Karamanev (1990)). Algunas aplicaciones no catalíticas son el tostado de los minerales de sulfuro, la coquización de los residuos del petróleo, la calcinación de la piedra caliza, del hidróxido de aluminio y los minerales de fosfatos, el secado y otros más. En biotecnología, los bioreactores de lecho fluidizado sólido-líquido en forma ascendente son considerados de los aparatos más eficientes para tratamiento de agua aerobio y anaerobio (Jeris, J. S., et al. 1981; Jewell, W. J., et al. 1981; Garcia, C. D., Buffiere, P. 1998; Buffiere, P., Moletta R. 1999; Saravanane R., Murthy S. V. D., Krishnaiah K. 2001); la producción de penicilina es otra de las aplicaciones frecuentes (Oh, D. K., et al. 1988; Endo, L. T., et al. 1988), y la degradación de fenol (Holladay, D. W., et al. 1978; Tang, W. T., Fan L.-S. 1987; Livingston, A. G., Chase, A. H. 1989).

Algunas de las industrias que frecuentemente utilizan los lechos fluidizados para sus procesos y sobre las cuales han enfocado sus estudios algunos investigadores para mejorar la eficiencia de los mismos son las siguientes:

- ✓ Farmacéutica: Producción de Penicilina (Oh, et al; 1988)
- ✓ Tratamiento de Aguas Residuales: (Jewell et al; 1981, J. Iza et al; 1991, Garcia-Calderon, Buffiere et al; 1998)
- ✓ Alimenticia: Hidrólisis d la Proteína de la Leche por medio de un Lactobacillus (Dion et al; 1988).

Las investigaciones sobre fluidización sólido-líquido han abarcado toda la gama de aspectos que son de utilidad para conocer el fenómeno. Entre ellos está la hidrodinámica del lecho que es fundamental para el funcionamiento adecuado de los equipos. Las aplicaciones que se ven más fuertemente afectadas por la hidrodinámica del lecho, y en particular por la altura del mismo, son aquellas que presentan variaciones importantes en el tamaño de las partículas y por consecuencia en la densidad de las mismas. Estos cambios hacen que la altura del lecho aumente o disminuya en forma importante, y por lo tanto, que el flujo necesario para mantener a las mismas en estado fluidizado cambie también y afecte la operación de los equipos. Entre las operaciones que presentan incremento del tamaño de las partículas está el tratamiento biológico de agua residual. En este caso, se presenta un aumento del tamaño de partícula por el crecimiento de la capa microbiana que se forma sobre las partículas y que es la que se encarga de la oxidación de la materia orgánica. A esta capa microbiana se le llama “biocapa”.

Dado que los bioreactores heterogéneos con microorganismos fijos o inmovilizados se consideran los aparatos más prometedores en biotecnología en la actualidad. Los estudios de investigación relacionados para su mejor operación son de gran importancia y utilidad. De entre la variedad de diseños de biorreactores, hay uno que ha tenido una gran atención por parte de los investigadores por las ventajas que presenta en cuanto a la facilidad de eliminación del material que se desprende de una biocapa. Estos equipos son los lechos fluidizados que operan a flujo inverso (flujo de arriba hacia abajo).

Las expresiones matemáticas para estimar la expansión del lecho fluidizado a flujo inverso sólido-líquido son pocas y en algunos casos hay controversia en cuanto al uso de las ecuaciones planteadas para el caso de la fluidización tradicional. En todos los casos los modelos matemáticos propuestos, no contemplan el crecimiento de la biocapa en la hidrodinámica del mismo.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar una expresión matemática para calcular la porosidad del lecho para un lecho fluidizado a flujo inverso que considere esta variación en las propiedades físicas del sólido debido al crecimiento de la biocapa y por consecuencia la variación en la hidrodinámica del lecho.

La hidrodinámica del lecho se expresará fundamentalmente considerando las fuerzas inerciales, viscosas y de flotación que se ejercen sobre el lecho mediante el uso de números adimensionales como el número de Reynolds y el de Arquímedes.

Con estas ecuaciones se pretende contar con una herramienta de cálculo fácil para predecir, con propósitos de diseño y de operación, la altura de un lecho de partículas de un lecho fluidizado a flujo inverso en aplicaciones en donde se presente el crecimiento de una capa biológica sobre las partículas.

En el primer capítulo, se describen en forma breve algunas generalidades relativas a la fluidización, clasificación, ventajas y desventajas que se presentan en el proceso, y la importancia de la fluidización en la industria.

En el segundo capítulo, se presentan los antecedentes y estado del arte en cuanto relaciones matemáticas para estimar la altura de un lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso con crecimiento de biocapa.

En el tercer capítulo se describe de manera detallada el desarrollo teórico de las ecuaciones que han sido propuestas, así como las nuevas ecuaciones que se proponen en el presente trabajo.

En el cuarto capítulo se describe la experimentación, la cual se llevo a cabo en dos partes, en la primera parte se determinó en forma experimental el efecto del crecimiento del tamaño de las partículas de un lecho fluidizado sólido líquido a flujo inverso en la expansión del lecho para una película sintética adherida a las partículas. En la segunda parte se hizo con una película biológica adherida a partículas del mismo material.

El quinto capítulo se presentan los resultados que se obtuvieron y se discuten los alcances y limitaciones de las ecuaciones propuestas.

Finalmente se presentan las conclusiones y se hacen una serie de recomendaciones para trabajos posteriores.

CAPITULO I.

Generalidades

1.1 La Fluidización

La fluidización es la operación que consiste en poner en contacto un sólido, en forma de partículas, con un fluido que circula en forma continua a través de un dispositivo que generalmente es de forma tubular. En una operación tradicional, el fluido se hace circular de abajo hacia arriba en un cilindro conocido como columna de fluidización, y las partículas de sólido (lecho) se colocan en el interior. Si la velocidad de flujo del fluido es baja, las partículas permanecen agrupadas como si se tratara de un lecho fijo. Si el flujo del fluido se incrementa hasta lograr que las partículas se muevan de forma continua, en este momento las partículas adquieren las características de fluidez y se dice que el lecho está fluidizado.

1.2 La Columna de Fluidización

Los equipos que mayormente se usan en fluidización son de forma cilíndrica que pueden tener o no algunos aditamentos internos para modificar la dirección del fluido o la circulación de las partículas, dependiendo del tipo de aplicación. Todas las columnas de fluidización cuentan con un dispositivo llamado distribuidor que sirve de soporte de las partículas cuando el flujo del fluido se detiene por paro o arranque de la operación. Los diseños de los distribuidores dependen del tipo de aplicación y se pueden usar placas perforadas, placas de materiales porosos o mallas de material rígido.

1.3 Las Partículas

Las partículas sólidas que componen el lecho juegan un papel primordial en el desempeño de la fluidización, así se tiene que puede haber lechos compuestos de partículas de tamaño homogéneo o con una distribución de tamaños; pueden tener formas regulares (generalmente esféricas) o formas irregulares; pueden sufrir cambios en sus características físicas, como aumento o disminución del tamaño y densidad causado por el proceso mismo en el que participan. Así, las partículas son uno de las variables principales en fluidización y su caracterización influye de manera importante en la representación matemática del fenómeno.

Los materiales de que se componen las partículas son muy variados en general, y en reactores biológicos, en particular, van desde la arena y la antracita como soportes, hasta productos ligeros como las resinas de intercambio iónico, natural o artificial (caolín, zeolita), carbón activado granular, piedra pómez y poliuretano reticulado, que también han sido utilizados como soportes de microorganismos en aplicaciones tales como nitrificación, desnitrificación, tratamiento de aguas de desecho aerobio, y producción de alcohol, cerveza y vinagre.

1.3.1 Caracterización del Tamaño de Partículas

El tamaño de las partículas se representa apropiadamente por una o más dimensiones lineares que caracterizan a una partícula individual. Para el caso de partículas esféricas, su tamaño se caracteriza únicamente por el diámetro de una esfera. Las partículas no esféricas de formas regulares se pueden caracterizar por dos o tres dimensiones. Los cubos pueden ser definidos por su dimensión única, mientras que los cuboides requieren de las tres dimensiones, longitud, profundidad y altura. Las partículas regulares tales como cilindros, esferoides y conos requieren de dos dimensiones.

Las partículas de formas irregulares, que son las de mayor interés práctico, no se pueden caracterizar tan fácilmente, por lo que sus tamaños son usualmente representados por una longitud característica que se correlaciona generalmente usando alguna propiedad de las partículas y se compara con la misma propiedad, pero de una esfera. De esta forma se toman como propiedad de referencia, el volumen, la superficie o alguna otra. La elección de una longitud característica para la caracterización de una partícula irregular depende, en muchos casos, de la aplicación. Aunque se han propuesto muchas formas para definir una longitud característica para partículas irregulares, las más comunes se presentan en la tabla 1.1.

Tabla. 1.1 Longitudes Características de las Partículas

Longitud característica	Definición	Expresión Matemática
Diámetro-Volumen (d_v)	Diámetro de una esfera teniendo el mismo volumen de la partícula.	$d_v = \left(\frac{6V_p}{\pi} \right)^{1/3}$
Diámetro Superficie (d_s)	Diámetro de una esfera teniendo la misma área superficial de la partícula.	$d_s = \left(\frac{S_p}{\pi} \right)^{1/2}$
Diámetro Superficie Volumen ó Sauter (d_{sv})	Diámetro de una esfera teniendo la misma área superficial externa a relación volumen como la partícula.	$d_{sv} = \left(\frac{6V_p}{S_p} \right) = \frac{d_v^3}{d_s^2}$
Tamaño de tamiz (d_A)	Es definido como el ancho del cuadrado de la apertura mínima en el tamiz a través del cual pasa la partícula.	
Diámetro Stokes (d_{st})	Diámetro de caída libre de las partículas en la región de la ley de Stokes.	$d_{st} = \sqrt{\frac{18\mu U_t}{(\rho_p - \rho_f)g}}$

1.3.2 Forma de la Partícula

De la misma forma que el tamaño de las partículas de forma irregular se representa por una longitud característica, que generalmente se define con relación a la esfera, la forma de las partículas no esféricas se caracteriza por un parámetro que relacione alguna de sus propiedades físicas y se le compare con las de una esfera. Al parámetro que da cuenta de la forma de las partículas, se le llama factor de forma, y en algunos casos se le llama factor de esfericidad. Los factores de forma más empleados por lo práctico que resulta su determinación son:

1. Factor de esfericidad basado en el Volumen de la partícula
2. Factor de esfericidad basado en el Área superficial de la partícula y la mayor área o perímetro proyectada de la partícula

Para el caso de partículas esféricas los factores de forma son iguales a la unidad y se usa únicamente una longitud característica.

1.4 Hidrodinámica de los Lechos Fluidizados

Las variables que generalmente se usan para caracterizar el comportamiento hidrodinámico del lecho son: la velocidad mínima de fluidización, la porosidad del lecho (expansión) y la velocidad terminal de las partículas. Las demás variables que intervienen y que afectan la hidrodinámica del lecho como son el tamaño, densidad y forma de las partículas, la densidad y la viscosidad del fluido, etc., se agrupan generalmente en números adimensionales como el número de Reynolds, Arquímedes y/o algunos más.

La velocidad mínima de fluidización es aquel valor de la velocidad del fluido que hace que las partículas del lecho se muevan entre ellas permaneciendo dentro de la columna a una altura relativamente constante con respecto a las paredes de la misma. El espacio que no ocupan las partículas que se encuentran en movimiento a cierta velocidad del fluido se le llama porosidad del lecho y aumenta o disminuye, en la medida que la velocidad del fluido aumente o disminuya. Cuando la velocidad del fluido se aumenta hasta un valor superior a lo que se conoce en dinámica de fluidos como velocidad terminal, las partículas comienzan a ser

separadas del lecho y el lecho pierde su cohesión. Conociendo estas tres variables, velocidad mínima de fluidización, porosidad del lecho y velocidad terminal es posible diseñar la altura del equipo de fluidización, y de ahí la importancia de poderlas determinar de la manera mas confiable.

1.5 Biofluidización

Las aplicaciones que se ven más fuertemente afectadas por la hidrodinámica del lecho y en particular por la altura le lecho son aquellas en las que se tienen variaciones importantes en el tamaño de las partículas y por consecuencia en la densidad de las mismas. El aumento o disminución de tamaño de las partículas hace que la altura del lecho aumente o disminuya en forma importante haciendo que los fenómenos de transferencia de masa y/o de calor se vean afectados y la operación de los equipos también. Entre las operaciones que presentan incremento del tamaño de las partículas está el tratamiento biológico de agua residual. En este caso, se presenta un aumento del tamaño de partícula por el crecimiento de la capa microbiana, llamada biocapa, que se forma sobre las partículas y que es la que se encarga de la oxidación de la materia orgánica.

Las aplicaciones de los lechos fluidizados sólido-líquido no se limita al tratamiento de aguas residuales, también se ha usado para cultivo de microorganismos, Kikkoman Co (Kunii D., Levenspiel O. 1991).

Los equipos que se usan para este tipo de aplicaciones se conocen como Reactores Biológicos de Lecho Fluidizado, o como FBBR por sus siglas en Inglés de Fluid Bed Biological Reactor. Las ventajas de los Reactores Biológicos en Lecho Fluidizado han sido discutidas ampliamente en la literatura (Distler, 1995; Kroumov et al, 1999; Cohen, 2001; Souza, 2002); entre las principales están el tiempo de retención hidráulico más bajo y el tamaño más pequeño de los equipos. Dentro de las mejoras hechas al funcionamiento de los FBBR está el cambio de las partículas densas que fueron usadas tradicionalmente en un FBBR como soporte para la biopelícula. El crecimiento de la biocapa y disminución de la densidad de la partícula generó problemas de arrastre de las partículas soporte y Lertpocasombut y col., (1988) sugirieron el uso de partículas soporte con una densidad menor al agua para evitar el arrastre de las partículas del reactor. Más tarde, Bergamasco, 1996; Tavares, 1992; sugirieron

el uso de partículas de material polimérico, lo cual permitió mejorar la adhesión de la biocapa y el crecimiento sobre las superficie de las partículas

1.6 Capa Biológica o Biocapa

La biocapa se define como “una capa de células procariotes y eucariotes ancladas a la superficie de un sustrato y embebidas en una matriz orgánica de origen biológico”.

En la excelente revisión acerca de la adhesión microbiológica en sistemas con desplazamiento por flujo, Henk y col., (2006) describen los trabajos de investigación de otros autores que demuestran que la adhesión microbiológica a las superficies es el paso inicial para el desarrollo de una biocapa. La formación de la biocapa sucede sobre todas las superficies expuestas a un ambiente acuoso. Generalmente, la adhesión microbiana es precedida por la formación de una capa condicionante de componentes macromoleculares después de la cual los procesos de transporte de masa aseguran la adhesión inicial de los microorganismos. La adhesión inicial es reversible durante un periodo corto de tiempo, después del cual los organismos adheridos comienzan a anclarse ellos mismos de manera irreversible a través o mediante la producción de sustancias poliméricas extracelulares. El fenómeno de cohesión puede iniciar y finalmente los microorganismos comienzan a crecer creando una biocapa madura como resultado. La velocidad de adhesión está determinada por el número de microorganismos que se transportan hacia una superficie de sustrato a través de procesos de transferencia de masa tales como convección, difusión o sedimentación. En ambientes relativamente estancados el transporte de masa convectivo, por ejemplo el transporte a través de un flujo líquido de organismos suspendidos, juega un papel menor y la sedimentación y la difusión son el principal medio de transporte de masa. Por el contrario, en medios en donde existe flujo de fluidos, el transporte de masa convectivo de los microorganismos suspendidos es el mecanismo de control que predomina y que determina la velocidad de adhesión microbiana. Generalmente, un incremento en el flujo de fluido, hacia o paralelo a una superficie de sustrato ofrece una mejor adhesión de los microorganismos debido a un mayor transporte de masa y a pesar de que la fuerza cortante aumenta y estimula el desprendimiento. Cuando el flujo de fluido excede un valor límite crítico, los esfuerzos cortantes de pared se vuelven lo suficientemente grandes como para prevenir la adhesión, e incluso estimular el desprendimiento.

En el crecimiento microbiano dentro de la biocapa se presenta una compleja interacción de competencia o cooperación entre los microorganismos, que se vuelve más complejo si en el sistema participan múltiples especies y dada su importancia, los estudios relacionados con todos los fenómenos que ocurren en la formación de la biocapa siguen siendo objeto de múltiples y variados estudios.

1.6.1 La Investigación en el Modelado de Biocapas.

Cristian Picioreanu (2006), se dedicó al estudio de los modelos para representar el crecimiento de biocapas en dos y tres dimensiones y en su trabajo comenta que a partir de la década de los setentas, varios modelos matemáticos fueron desarrollados para relacionar la densidad de flujo del sustrato en la biocapa a los mecanismos fundamentales de utilización del sustrato y transporte de masa. La meta principal de estos modelos mecanísticos de primera generación fue la de describir el flujo másico en la biocapa y los perfiles de concentración dentro de la biocapa de un sustrato de velocidad de limitante.

En los años ochenta, los modelos matemáticos comenzaron a incluir diferentes tipos de microorganismos y distribución no-uniforme de los tipos de biomasa dentro de la biocapa. Esta segunda generación de modelos todavía mantenían una geometría en una sola dimensión simplificada, pero más tarde fueron adicionados los patrones espaciales de algunos sustratos y diferentes tipos de biomasa. Una motivación principal para esos modelos fue evaluar la densidad de flujo total de sustratos y productos metabólicos a través de superficies de biocapa.

A partir de los años noventa y hasta la fecha se han desarrollado nuevos modelos matemáticos que proporcionan representaciones mecanísticas de los factores que controlan la formación de morfologías de biocapas complejas de dos y tres dimensiones.

La mayoría de las biocapas son sistemas complejos, un modelo de biocapa que intenta capturar toda la complejidad podría necesitar incluir (i) Ecuación de balance de masa para todos los procesos que ocurren por todos los componentes en todos los compartimentos, (ii) Ecuaciones de balance de momento y continuidad para los fluidos en todos los compartimentos, y (iii) Condiciones definidas para todas las variables en todos los límites del sistema. Implementar tales modelos resultaría impracticable, quizá imposible. Por lo tanto, aun

los modelos de biocapa complejos que existen en la actualidad contienen muchas suposiciones de simplificación.

Nuevos modelos experimentales para el crecimiento de biocapas en el laboratorio se han desarrollado. Ejemplos de ellos son los flujos de células que pueden ser colocadas directamente en el microscopio y usados para observar el desarrollo de la biocapa en el tiempo. Sin embargo, el uso del flujo de células está muy restringido a las etapas iniciales del desarrollo de la biocapa (experimentos generalmente de duración menor a dos semanas y que usualmente duran menos de unos pocos días) y para biocapas delgadas (microscopio de barrido láser convencional que no permite tomar imágenes de biocapas más gruesas de 100 μm).

Un modelo ampliamente usado que describe la síntesis de biomasa microbiana es la ecuación de Monod para un sustrato limitante:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento (T^{-1}), μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento de microorganismos (T^{-1}), S es la concentración de sustrato limitante de la velocidad ($\text{M}_s \text{L}^{-3}$), y K_s es la concentración ($\text{M}_s \text{L}^{-3}$) que da la mitad de la velocidad máxima. La ecuación de Monod es atractiva porque captura los efectos observados de concentración del sustrato en la velocidad de síntesis de biomasa.

En algunos modelos de biocapa se usan algunas aplicaciones alternativas de la ecuación de Monod como son las cinéticas de cero y primer orden los cuales son casos especiales de la ecuación de Monod.

Usando una expresión más simple puede simplificarse el tratamiento matemático tal que las ecuaciones del balance de masa pueden ser resueltas analíticamente. Sin embargo, la simplicidad de las expresiones de velocidad son válidas únicamente para concentraciones de sustrato altas o bajas de K_s , y la concentración del sustrato debe ser manejada en el intervalo apropiado a través de la biocapa.

En muchos modelos, el ataque microbiano no se incluye de forma explícita. En algunos casos, esta resulta ser una buena simplificación porque el desprendimiento de los mismos es el

proceso que predomina. Cuando este no es el caso, la simulación del proceso de desprendimiento debe representar la transferencia total de la masa de partículas desde la biocapa hasta la masa del líquido, implícitamente incluyendo el proceso de ataque y desprendimiento. El fenómeno de desprendimiento puede ser considerado más complejo, entonces son representados por pérdidas de primer orden.

Generalmente, un incremento en el flujo de fluido, hacia o paralelo a una superficie de sustrato ofrece una mayor adhesión de los microorganismos debido al transporte de masa mayor a pesar de la presencia de una fuerza cortante mayor que estimula el desprendimiento. Cuando el flujo de fluido excede un valor límite crítico, los esfuerzos cortantes de pared se vuelven lo suficientemente grandes como para prevenir la adhesión, e incluso estimular el desprendimiento.

En el crecimiento microbiano dentro de la biocapa se presenta una compleja interacción de competencia o cooperación entre los microorganismos, que se vuelve más complejo si en el sistema participan múltiples especies y dada su importancia, los estudios relacionados con todos los fenómenos que ocurren en la formación de la biocapa siguen siendo objeto de múltiples y variados estudios.

CAPITULO II.

Antecedentes

Muchas ecuaciones han sido propuestas para describir la expansión del lecho fluidizado sólido-líquido; Fan et al. (1982), y Renzo Di Felice (1995), hicieron una revisión acerca de los enfoques teóricos y empíricos los cuales hacen la descripción de la dinámica de fluidos en lechos fluidizados líquidos; sin embargo aún hay controversia entre los diferentes autores sobre diversos aspectos de la fluidización, que incluyen la calidad de la fluidización, los enfoques empíricos y semiempíricos que han sido utilizados para determinar parámetros hidrodinámicos como la velocidad mínima de fluidización, porosidad del lecho y velocidad terminal de la partícula. Estas diferencias de opinión incluyen la consideración de que la expansión sólido-líquido sea considerada como homogénea o no, que el efecto del distribuidor en la calidad de la fluidización no ha sido estudiado de manera sistemática, que la influencia del diámetro de la columna sobre la fluidización se deba considerar para estudios a nivel laboratorio y los pocos estudios que consideran la influencia de la forma de las partículas en la hidrodinámica de la fluidización cuando muchos de los valores experimentales se han obtenido usando partículas no esféricas o casi esféricas.

Por lo anterior, en el presente análisis de antecedentes se presentará solamente la selección que se hizo, de las publicaciones de artículos relacionados con el objetivo de este trabajo, y se mencionarán solamente los datos más relevantes de los mismos. Se presenta una primera parte con las ecuaciones para estimar la porosidad de un lecho fluidizado sólido-líquido que opera a flujo tradicional (de abajo hacia arriba), y que se usan para lechos fluidizados que operan a flujo inverso. A continuación se presentan los trabajos en biotecnología y finalmente los trabajos relacionados con fluidización inversa.

2.1 Fluidización Sólido-Líquido

En los párrafos siguientes se presentan los comentarios sobre los artículos publicados que tienen mayor relevancia sobre el presente trabajo, y en la tabla 2.1 se presentan solamente las ecuaciones para el cálculo de la porosidad del lecho, que resultaron relevantes de la revisión bibliográfica, bajo los criterios de mayor número de veces que han sido usadas por otros autores, los intervalos amplios de aplicación así como su facilidad de cálculo.

Los diferentes modelos que correlacionan la expansión del lecho con la velocidad superficial del fluido pueden ser clasificados en tres grupos principales Fan et al. (1982). El primer grupo esta basado en una correlación que tienen dependencia entre U/U_i y ε .

El modelo de Richarson y Zaki (1954), es el más popular de este grupo. El segundo grupo de modelos se encuentra en función del arrastre para sistemas usados para partículas múltiples. Este se da usualmente en función del Re y Ar . Los modelos de Ramamurthy y Subbaraju (1973) y Riba y Couderc (1977) son típicos para este grupo. El tercer grupo esta basado en la dependencia entre ε y la variable principal de la fluidización del lecho como la correlación de Wen y Yu (1966).

En 1982 se comprobó que la ecuación de Limas et al., hace una buena predicción de la porosidad del lecho de partículas no esféricas haciendo uso del factor de forma, y de partículas esféricas dando el valor de uno a dicho factor.

Tjandra Setiadi (1995), utilizó números adimensionales como los números de Reynold (Re) y Arquímedes (Ar) para predecir la porosidad del lecho en un bioreactor anaerobio para flujo tradicional.

Tabla 2.1 Correlaciones Matemáticas para el Cálculo de la Expansión del Lecho

Autor	d(mm)	ρ_p (Kg/m ³)	ρ_L (Kg/m ³)	μ_L (Kg/m s)	Ecuación	Intervalos
Richardson y Zaki (1954)	0.1-6.35	1,060-11,250	810-2,890	10^{-3}	$\frac{u}{u_i} = \varepsilon^n \quad \text{con} \quad \log u_i = \log u_t - \frac{d}{D}$ $n = \left(4.35 + 17.5 \frac{d}{D} \right) \text{Re}^{0.03}$ $n = \left(4.45 + 18 \frac{d}{D} \right) \text{Re}^{0.01}$ $n = 4.45 \text{Re}^{-0.1}$ $n_o = 4.35 \text{Re}^{-0.03}$ $n_o = 4.45 \text{Re}^{-0.1}$	<p>0.2 < Re < 1</p> <p>1 < Re < 200</p> <p>200 < Re < 500</p> <p>0.2 < Re < 1</p> <p>1 < Re < 500</p>
Wen y Yu (1966)	0.2-0.35	2,370-7,840	1,000	10^{-3}	$\varepsilon^{4.7} \frac{d^3 g (\rho_p - \rho_L) \rho_L}{\mu^2} = 18 \text{Re} + 2.7 \text{Re}^{1.687}$	
Ramamurthy y Subbaraju (1973)	0.78-5.32	2,910-1,1190	1,000-1,200	0.733×10^{-3} 28.4×10^{-3}	$[f(\varepsilon)]^n = \frac{GaMv}{18 \text{Re}}$ $[f(\varepsilon)^{1.4}]^n = \frac{GaMv}{13.9 \text{Re}^{1.4}}$ $f(\varepsilon) = \left[1 - 1.21(1 - \varepsilon)^{\frac{2}{3}} \right]^{-1}$	<p>GaMv < 18</p> <p>18 < GaMv < 10⁵</p> <p>con n = 1.56</p>

Autor	d(mm)	ρ_p (Kg/m ³)	ρ_{FL} (Kg/m ³)	μ (Kg/m s)	Ecuación	Intervalos
Riba y Couderc (1977)	0.10-10.36	1,340-2,710	1,000	10^{-3}	<p>Primera Forma</p> $\varepsilon = 1.58 Re^{0.33} Ga^{-0.21} Mv^{-0.22}$ $\varepsilon = 1.20 Re^{0.17} Ga^{-0.11} Mv^{-0.12}$ <p>Segunda Forma</p> $\frac{GaMv}{18 Re + 2.7 Re^{1.687}} = 1.9 \varepsilon^{-3.77}$ $\frac{GaMv}{18 Re + 2.7 Re^{1.687}} = 1.3 \varepsilon^{-6.17}$ <p>Tercera Forma</p> $\frac{GaMv}{18 Re} = \begin{cases} 1.21 f(\varepsilon)^{1.28} \\ 0.77 f(\varepsilon)^{2.7} \end{cases}$ $\frac{GaMv}{13.9 Re^{1.4}} = \left[\begin{matrix} 1.21 f(\varepsilon)^{1.28} \\ 0.77 f(\varepsilon)^{2.7} \end{matrix} \right]^{1.4}$ $\frac{3 GaMv}{Re^2} = \left[\begin{matrix} 1.21 f(\varepsilon)^{1.28} \\ 0.77 f(\varepsilon)^{2.7} \end{matrix} \right]^2$	$\varepsilon \leq 0.85$ $\varepsilon > 0.85$ $\varepsilon \leq 0.85$ $\varepsilon > 0.85$ $\varepsilon \leq 0.85$ $\varepsilon > 0.85$ GaMv < 18 $\varepsilon \leq 0.85$ $\varepsilon > 0.85$ 18 < GaMv < 10⁵ $\varepsilon \leq 0.85$ $\varepsilon > 0.85$ GaMv > 10⁵
Limas et al. (1982)	1.28-10.36	1,340-10,790			$1.61 \psi^{1.35} \varepsilon^{-4.94} = \frac{Ga_s Mv}{0.75(24 Re_s + C_l Re_s^2)}$	$200 \leq Re_s \leq 6000$ $6 \times 10^4 \leq Ga_s \leq 5.6 \times 10^7$ $0.47 \leq \varepsilon \leq 0.97$ $0.64 \leq \Psi \leq 1.0$
Tjandra Setiadi (1989)					$\varepsilon = 1.72 Re^{0.203} Ga^{-0.179}$	

Ramamurthy y Subbaraju (1973), obtuvieron datos de expansión del lecho para reactores de lecho fluidizado anular sólido-líquido, usando varios tamaños de esferas de vidrio, bolas de acero, y balas de plomo, las cuales fueron fluidizadas por agua y mezclas de agua-glicerina para cubrir un amplio intervalo de variables. Estableciendo la ecuación de balance de fuerzas que actúan sobre una partícula, suponiendo estado estacionario, y el movimiento unidimensional en la dirección vertical de la partícula, hicieron una generalización de las ecuaciones para la predicción de la expansión del lecho para un sistema multipartículas de lecho fluidizado homogéneo. Ellos además, supusieron a las partículas agrupadas en un nodo imaginario con un arreglo cúbico simple, y modifican la velocidad superficial por un factor que considera la porosidad entre las partículas. Con esta suposición obtienen las ecuaciones que se presentan en la tabla 2.1 Ramamurthy y Subbaraju demostraron que las características de la expansión en espacios anulares no son diferentes de las que se presentan en tubos grandes con una relación de $D_{eq}/d_p > 8$. La comparación de las ecuaciones que proponen con relación a las de otros autores presenta la menor desviación estándar.

Wen y Yu (1966), propusieron una correlación para el cálculo de la expansión del lecho de partículas esféricas fluidizadas, basados en el equilibrio dinámico de partículas individuales y en las fuerzas que actúan sobre una partícula la cual se encuentra en un lecho de partículas fluidizadas, así mismo, desarrollaron una ecuación general, la cual represente la fuerza de arrastre útil en la predicción de la expansión del lecho.

Ellos encontraron que su correlación produce una desviación de los datos de porosidad experimental de $\pm 10\%$, y una mayor desviación cuando utilizaron números de Reynolds mayores de 1,000, por lo que no es aplicable a números de Reynolds mayores a este número, así mismo, la correlación puede ser utilizada para calcular la velocidad mínima de fluidización, basada en consideraciones de caída de presión.

Wen y Fan (1974), basados en datos experimentales de varios autores, propusieron correlaciones empíricas de expansión en lechos fluidizados sólido-líquido en función del número de Reynolds y el número de Galileo. El cálculo de los valores de porosidad del lecho con sus ecuaciones

requiere de intentos a base de prueba y error, por lo que para evitarlo propusieron el uso de gráficas de número de Reynolds contra Número de Galileo, usando como parámetro la porosidad del lecho. Las gráficas que proponen son aplicables desde el inicio de la fluidización hasta la fase diluida del lecho fluidizado con gran porosidad y el número de Galileo que abarcan va de 18 a 3×10^8 .

Para Garside y Al-Dibouni (1977) la posible influencia del diámetro de la columna en la expansión del lecho en pruebas de laboratorio debe considerarse, por lo tanto, para tomar en cuenta los efectos de pared consideraron la velocidad terminal de una partícula, en lugar de la velocidad terminal de una partícula, pero en un fluido infinito, de esta forma la descripción de la expansión del lecho la expresaron en términos de la porosidad y el Numero de Reynolds terminal, como lo expresa la ecuación.

$$U_R = (U_g/U_t) = f(\epsilon, Re_t)$$

Las ecuaciones que proponen aplican para datos de fluidización y sedimentación dada la dificultad de sus ecuaciones y con la intención de hacer más práctico el uso de las mismas ellos mismos proponen simplificaciones a sus correlaciones aunque con una menor calidad de los resultados.

Fouda y Capes (1977), hicieron una modificación a la ecuación de Richardson y Zaki (1954) para partículas finas y partículas de cuerpos irregulares introduciendo un factor de volumen hidrodinámico

$$U/U_t = (1 - KC)^n$$

En donde ($C = 1 - \epsilon$), provee mayor consistencia en la correlación de los datos, y el parámetro K da idea del volumen hidrodinámico efectivo de las partículas durante la fluidización. En la aplicación de este concepto a partículas no esféricas este parámetro proporciona un valor igual a la unidad para partículas esféricas.

Este factor no tiene ninguna relación con el diámetro de partícula ni con el diámetro de columna pero la forma de las partículas y la rugosidad de la superficie tienen efectos importantes, los cuales no tomaron en cuenta.

Limas, Riba y Courderc (1982), estudiaron las propiedades de expansión de lechos constituidos por partículas no esféricas, fluidizadas por líquidos. Ellos propusieron nuevos datos experimentales obtenidos con cilindros de altura igual a su diámetro, cubos o prismas de base hexagonal. El tratamiento de los resultados obtenidos comparados con los de otros autores conduce a una serie de ecuaciones que se muestran en la tabla 2.1, tanto para esferas como para sólidos no esféricos. Ellos se enfocaron principalmente al análisis de partículas no esféricas, e incluyen un factor de forma en las relaciones propuestas. Usando los datos publicados por otros autores para el caso de esferas aumentaron el intervalo de aplicación de sus ecuaciones cuando el factor de esfericidad es igual a la unidad. Esta ecuación proporciona una desviación estándar menor que la ecuación propuesta por Richardson y Zaki (1954).

2.2 Fluidización Sólido-Líquido en Biotecnología

Un resumen de los estudios de lecho fluidizado en reactores biológicos se muestra en la tabla 2.2. Todos los estudios en la fluidización y las características de partículas biocubiertas se han hecho utilizando las correlaciones establecidas para partículas esféricas. Esto puede ser fácilmente comprendido, porque la esfera tiene una forma muy simple y consecuentemente es fácil de caracterizar.

Tabla. 2.2. Ecuaciones para Determinar el Comportamiento de Biocapas en Reactores de Lecho Fluidizado

Autores	Ecuación	Descripción
Nikolov y Karamanev (1990)	$\delta = \frac{\left[\frac{m_{bp}}{(4\pi r_p^2)} - \frac{r_p \rho_p}{3} \right]}{\rho_{bf}}$	Ecuación para medir de manera indirecta el espesor de la biocapa por peso seco.
Kuba y Kusuda (1990)	$\frac{dX_a}{dt} = \frac{\mu_{max} S_a}{K_{sa} + S_a} X_a$	Ecuación cinética desarrollada asumiendo que el crecimiento de una bacteria en reactor batch sigue el crecimiento de Monod.
García y Buffière (1998)	$\varepsilon = 1 - \frac{H_{mf}(1 - \varepsilon_{mf})}{H}$ $\rho_s = \frac{W}{H_{mf} A(1 - \varepsilon_{mf})}$	Ecuación para calcular la porosidad del lecho. Ecuación para determinar la densidad específica real a una altura mínima de fluidización.
Ngian y Martin (1980)	$\varepsilon = 1 - \left[\frac{w}{(\rho_p HA)} \right] \left(\frac{d_b}{d_m} \right)^3$	Ecuación para determinar la expansión de la altura del lecho en un bioreactor anaerobio.
Tjandra Setiadi (1989)	$\varepsilon = 1.72 \text{Re}^{0.203} \text{Ga}^{-0.179}$	Ecuación para predecir la expansión del lecho (ε) relacionando los números de Reynold (Re) y Galileo (Ga).
Bignami et al. (1991)	$\frac{D}{R} \frac{d}{dR} \left(R \frac{dS}{dR} \right) = k\rho \frac{S}{K_s + S}$	Ecuación para determinar la densidad de la biocapa utilizando la ecuación de Michaelis y Menten.

Shieh (1980), propuso un modelo cinético para un bioreactor de lecho fluidizado de biopelícula, el cual fue derivado de los principios de fluidización sólido-líquido y catálisis heterogénea.

Consideró un reactor FBBR operado bajo condiciones de estado estacionario en el cual el medio esférico con un tamaño uniforme es cubierto con una capa uniforme de biopelícula y el agua de tratamiento pasa a través del reactor en forma ascendente en un modo flujo tapón, también supone que la reacción sigue una cinética de orden cero la cual se ve limitada por la difusión del sustrato dentro de la biopelícula y la resistencia a la transferencia de masa interna. También se hizo una validación del modelo comparándolo con datos de operación de un reactor biológico de denitrificación.

El modelo cinético es capaz de describir el comportamiento cinético de un reactor de lecho fluidizado de biopelícula, ya que el espesor de la biopelícula y el tamaño del soporte son los dos parámetros más importantes.

Mulcahy, Shieh y Lamotta (1981), desarrollaron unos modelos matemáticos simples para un reactor de lecho fluidizado de biopelícula, ya que estos modelos facilitan la operación y diseño de este tipo de reactores. Los modelos matemáticos desarrollados cuentan con los siguientes elementos:

1. Un modelo de biopelícula el cual da la velocidad de conversión del sustrato para biopartículas individuales.
2. Un modelo de fluidización del lecho el cual da el espesor de la biopelícula y número de biopartículas por unidad de volumen en un lecho fluidizado.
3. Un modelo global del lecho el cual une el modelo de biopelícula y el de fluidización para calcular el rendimiento de la concentración del sustrato como función de la posición de los ejes dentro del reactor (FBBR).

Los modelos para reactores FBBR son simplificados para reacciones cinéticas de cero y primer orden. Las expresiones del factor de efectividad, y modulo de Thiele son desarrollados para cuantificar la resistencia de transferencia de masa en el interior de la biocapa. Ellos encontraron que la buena selección del soporte es importante ya que con este se puede controlar el espesor de la biopelícula y la concentración de la biomasa. Cuando se usan soportes grandes o densos y se mantiene constante la velocidad de fluidización, la altura del lecho fluidizado y el volumen del medio soportado, da como resultado el incremento del espesor de la biopelícula en equilibrio; de forma contraria, si se mantienen constantes el espesor y la velocidad de fluidización, es necesario que el volumen del medio soportado sea incrementado o la altura del lecho fluidizado disminuya en condiciones de equilibrio.

Mulcahy, Shieh y Lamotta, concluyeron que para reacciones de orden cero en un reactor FBBR la transferencia de masa en el interior de la biopelícula es limitada, y la transferencia de masa en el exterior y efecto de dispersión de los ejes no son significativamente altos.

También proponen que se puede predecir la concentración de la biomasa y el espesor de la biopelícula dada la velocidad de fluidización superficial, la altura del lecho expandido, el volumen y tipo de medio soportado.

Mulcahy y Shieh (1987) investigaron las características de fluidización de un proceso de denitrificación en un reactor de biopelícula de lecho fluidizado (FBBR). La evidencia experimental indica que la correlación de Richardson-Zaki (ver tabla 2.1), la cual fue desarrollada para partículas sólidas rígidas, provee una excelente descripción de los mecanismos de fluidización de una denitrificación en FBBR. Sin embargo, las correlaciones para el cálculo de los coeficientes de arrastre incrementan el índice de expansión el cual debe ser modificado de acuerdo a las características de FBBR conforme el grado de expansión se incrementa con respecto al tamaño de las biopartículas (por ejemplo el incremento del espesor de la biocapa).

La fluidización y la correlación del reactor de biomasa desarrollado en esta investigación son capaces de proveer una predicción directa y exacta de concentración de biomasa y expansión del lecho en FBBRs diseñado para aplicaciones de tratamiento de agua. Un parámetro el cual es indirectamente controlable por el diseño de ingeniería es el equilibrio del espesor de la biocapa. Para un tipo de medio dado, el equilibrio del espesor de la biocapa depende de la velocidad superficial de expansión de la altura del lecho, volumen del medio. El espesor de la biocapa es el parámetro más importante el cual afecta la fluidización y la concentración de la biomasa del reactor de denitrificación FBBR.

Nikolov y Karamanev (1990), diseñaron un nuevo bioreactor de biocapa de lecho fluidizado en forma inversa, este trabajo tuvo como objetivo principal definir las características de un reactor “ideal” para observar el comportamiento de la biocapa, principalmente la cinética y difusión, el cual solo se propuso como un aparato de laboratorio. En este bioreactor un lecho de partículas

con una densidad menor que las de el líquido es fluidizado, el líquido que desciende expande el lecho, la biocapa empieza a crecer en la superficie de las partículas por lo cual su densidad aumenta.

Debido a esto, el lecho fluidizado en forma inversa se expande, y el nivel más bajo del lecho empieza a descender lentamente y a un cierto espesor de biocapa el lecho se vuelve fijo, lo cual causa problemas en la hidrodinámica y por lo tanto en el funcionamiento del equipo. Por todos estos problemas Nikolov y Karamanev, introdujeron un tubo en la parte central del reactor de lecho fluidizado por el cual cuando las partículas cayeran en lugar de permanecer en un estado fijo, estas entraran a este tubo por medio de una corriente de aire para desprender la biocapa y que este siguiera funcionando de manera eficiente, y se evitan los problemas de hidrodinámica. Por lo cual este bioreactor se volvió un sistema de tres fases, ya que fue la única forma que encontraron para controlar el crecimiento de la biocapa. Ellos midieron el espesor de la biocapa de manera indirecta, pesando el lecho antes de llevar a cabo la operación y ya después de un tiempo secaron el lecho de partículas el cual ya tenía biocapa, la cual se determino por diferencia de pesos para poder llevar acabo la determinación por medio de la ecuación que se muestra en la tabla 2.2. Este diseño de bioreactor permitió que las biocapas pudieran ser estudiadas con una mayor facilidad, debido a que hay un mayor crecimiento del espesor de la biocapa por la presencia de oxígeno que es introducido por el tubo.

Kuba y Kusuda (1990), estimaron el crecimiento de las constantes cinéticas como la constante de saturación, la velocidad máxima de crecimiento y la concentración “activa” de la biomasa adherida en un lecho fluidizado de manera anaerobia, es decir, en dos fases (sólido-líquido). El lecho fluidizado fue operado como un reactor metanogénico con un soporte de zeolita sintética, al reactor se le suministró agua residual sintética con una bacteria metanogénica, organismo parecido al Methanotrix, el cual se adhiere a la parte media del soporte, especialmente para superficies porosas y una mezcla de nutrientes compuestos por sales.

La ecuación cinética para un sistema de cultivo en forma intermitente suponiendo que el crecimiento de la bacteria fue descrito por el modelo de crecimiento de Monod, y el crecimiento de la partícula fue determinado por una fotografía la cual se tomó en un microscopio electrónico

y esta muestra que la superficie de la zeolita que no se emplea es la parte áspera, ya que son los cuerpos irregulares los que se mueven de una manera más suave en los lechos fluidizados y ofrecen una mayor protección en algunos sitios para los microorganismos que los medios de forma esférica.

Bignami et al (1991); hicieron una revisión de las bases racionales para el diseño de reactores y reportaron una de las pruebas experimentales realizadas para tener una mejor interpretación en las áreas del modelado de biocapas y mecánica de fluidización, ellos realizaron un modelo de biocapa utilizando la ecuación de Michaelis y Menten (ver tabla 2.2), el cual fue desarrollado y validado utilizando datos experimentales los cuales fueron obtenidos en pruebas batch de un proceso de nitrificación, este trabajo confirmó la mecánica de fluidización para la aproximación de la correlación de Wen y Yu para la porosidad del lecho con la velocidad del líquido superficial.

Bigmani et al; hicieron las siguientes consideraciones, ya que aproximaron su modelo a los modelos que comúnmente se usan en procesos de catálisis heterogénea para poder obtener el modelo total del proceso diseñado:

- a) Un modelo de biocapa el cual describe la velocidad de conversión del sustrato para biopartículas individuales considerando difusión de extra-biocapa y conversión para biocapa individual con simulación de la conversión bioquímica por microorganismos atacando el soporte de partículas fluidizadas de manera individual.

- b) Un modelo dinámico-fluido el cual comprende el análisis de la mecánica de fluidización y el modelo del flujo-reactor, esta forma describe el grado de expansión del lecho bajo las condiciones de operación dadas (velocidad de flujo, espesor de la biocapa, tamaño medio y densidad), usando al sistema sólido-líquido principalmente y las características mayores como el transporte de la fase líquida del sustrato a través de un reactor de biocapa de lecho fluidizado. El análisis de la dinámica del fluido también permite obtener la importancia de la cinética y del transporte del sustrato para la masa líquida de la interfase líquido-biocapa (transferencia de masa externa). La ecuación obtenida del

modelo de biocapa y el modelo de la dinámica del fluido define el modelo total para el diseño del proceso.

La salida de información requerida para la aplicación del modelo incluye:

- c) Los parámetros cinéticos relacionados a la conversión bioquímica y transferencia de masa interna:
- d) Los parámetros de operación (velocidad de flujo y concentración de sustrato en el efluente y dentro del proceso).
- e) Los parámetros físicos (contenido de humedad y densidad)
- f) Los parámetros físicos del líquido (viscosidad y densidad)

Los parámetros a ser seleccionados son el tamaño del medio y densidad, y el espesor de la biocapa; la última variable puede ser mantenida en el valor deseado a través del control de la altura del lecho expandido, vía lavado de biomasa.

Este trabajo en particular establece y verifica los siguientes aspectos relacionados con el modelo desarrollado:

- El modelo de la biocapa: La formulación de este modelo para biopartículas esféricas ha sido llevado a cabo por cinéticas de cero y primer orden; un modelo capaz de resolver el caso general de la ecuación de Michaelis y Menten.
- Mecánica de Fluidización: El análisis dinámica del fluido ha sido despreciable además el hecho de que este puede ser algunas veces como el que decide el éxito o fracaso de los procesos. En particular, dos diferentes alcances pueden ser usados para predecir el comportamiento de la dinámica del fluido de un lecho fluidizado biológico, basado respectivamente en:
 - El balance de fuerzas para una partícula aislada suspendida en un fluido, tomando en cuenta la interacción de la biopartícula a través de la inclusión de un factor de corrección dependiente de la porosidad del lecho.

- La relación empírica de Richardson-Zaki, ampliamente usada para la correlación de la porosidad del lecho con la velocidad del líquido superficial.

Las suposiciones de su modelo consideraban:

- 1) Condiciones de estado estacionario.
- 2) Medio soportado esférico.
- 3) Espesor uniforme de la biocapa homogéneo.
- 4) El valor de biocinética y parámetros de difusividad son constantes dentro de la biocapa.
- 5) El sustrato considerado en el modelo debe ser el flujo limitante y biocineticamente limitante.
- 6) Reacción de tipo Michaelis y Menten.

Bingami et al., concluyen que el modelo de biocapa desarrollado se encuentra basado en una solución de tipo computacional y es capaz de predecir con bastante exactitud la relación entre la concentración del sustrato y la profundidad dentro de la biocapa en el caso general de la ecuación de Michaelis y Menten sin requerir ninguna suposición respecto al orden de reacción limitante, así también, la correlación de Wen y Yu, así como la ecuación de Richardson y Zaki, parece ser un método más confiable para describir el comportamiento de los reactores de lecho fluidizado.

Ozturk, Turan e Idris (1994), presentaron resultados acerca de las características de reactores de lecho fluidizado biológico (BFBR) en escalamiento y biomasa acumulada, así mismo, establecieron y probaron algunos criterios básicos de diseño para el escalamiento de reactores de lecho fluidizado anaerobio ascendente y descendente.

Concluyen que aunque es posible alcanzar una similitud geométrica para los dos reactores de distintos tamaños es extremadamente difícil mantener las similitudes dinámicas. La diferencia en el diámetro del reactor produce velocidades superficiales distintas. En términos de similitud dinámica, únicamente los números de Peclet (Pe) y Reynold (Re) son usados como parámetros de escalamiento para este tipo de reactores, ya que la similitud en el número de Peclet provee el

mejor escalamiento en términos de utilización de sustrato y velocidad de producción de metano, y la similitud en el número de Reynold es la mejor en términos de eficiencia de proceso.

También utilizaron la expresión general de Turan (1993), para predecir la porosidad de un lecho biológico fluidizado, y usaron esta expresión para poder predecir el espesor de la capa biológica, coeficiente de expansión, diámetro medio y densidad por medio de la porosidad de lecho fluidizado local y global. En este estudio también se puede ver la información esencial para una aplicación usando la fluidización y desarrollando las correlaciones de biomasa, especificación del medio y agua residual y velocidad superficial para poder estimar la biomasa acumulada.

Imai, Kusuda y Furumai (1994) desarrollaron un modelo en capas con desgaste para el proceso de crecimiento de una capa biológica en un reactor de lecho fluidizado metanogenico, para estimar la distribución de biomasa activa y la biomasa inactiva en la capa biológica de un reactor de lecho fluidizado anaerobio por medio de la cinética de crecimiento y decaimiento del microorganismo.

El modelo expresa las características y la capacidad de distribución del microorganismo en el interior de la biopelícula.

Imai, Kusuda y Furumai (1994), observaron que este modelo representa satisfactoriamente la distribución de actividades específicas de biomasa activa e inactiva en la biopelícula, y que la aproximación de la constante de velocidad de biomasa inactiva de 0.01 días^{-1} es razonable, así como que la distribución de la biomasa en una biopelícula bajo condiciones de desprendimiento pueden ser estimadas con este modelo.

Tjandra Setiadi (1995), realizó una investigación acerca de la expansión de un bioreactor de lecho fluidizado anaerobio. Los experimentos fueron llevados a cabo en una columna de 4.4 cm de diámetro con arena como medio de soporte de biocapa con un diámetro de 0.152 mm. La temperatura fue mantenida a 30°C y se utilizó agua sintética de desecho. Se utilizaron algunos datos de expansión del lecho obtenidos en forma experimental y datos de literatura para evaluar la aplicación de la correlación en bioreactores, la cual predice la expansión del lecho

relacionando la porosidad (ϵ) y los números de Reynolds (Re) y Galileo (Ga) obtenida por Tjandra Setiadi en 1989, la cual se muestra en la tabla 2.2.

Esta ecuación fue encontrada para predecir la expansión de un lecho fluidizado de un bioreactor anaerobio con una mejor exactitud que las correlaciones propuestas por Richardson y Zaki (1954), Wen y Yu (1966), Hermanowicz y Ganczarczyk (1983) y Mulcahy y Shieh (1987).

Diez, García y Fernández (1995), utilizaron un reactor de lecho fluidizado anaerobio con un soporte de partículas de sepiolita el cual fue utilizado para estudiar la influencia del crecimiento de la biopelícula y la producción del biogas en el comportamiento hidrodinámico de un lecho fluidizado sólido-líquido.

Ellos encontraron que el desarrollo de la biopelícula tiene un efecto importante en la hidrodinámica, y el crecimiento de la misma varía a través del reactor incrementando la variación natural del tamaño de las partículas en el lecho. Pudieron observar que la hidrodinámica no es afectada por la producción de biogas, por lo cual esta puede ser ignorada y el reactor puede ser tratado como un reactor de dos fases.

La expansión de un lecho fluidizado en dos fases sufre un pequeño decrecimiento debido a la producción del biogas, y el crecimiento de la biopelícula fue acompañado de un incremento en la segregación del lecho debido al aumento de la densidad del soporte debido a la biopelícula.

García y Buffière (1998), presentaron sus resultados para un reactor anaerobio que opera a flujo descendente tratando agua residual de un destilado de vino durante 1.5 años, en este trabajo utilizaron como material para el lecho perlita picada, la cual es una roca volcánica expandida de densidad 213 Kg/m^3 , en este caso se determinó el carbono orgánico total, los sólidos suspendidos volátiles, la producción de gas y la acumulación de la biomasa, la cual fue monitoreada como la cantidad de sólidos volátiles adheridos por gramo de soporte.

En este caso se hacen correcciones en la altura del lecho por la expansión del mismo debido a la biomasa acumulada durante los periodos de operación (acumulación de la biomasa con

incremento en la densidad de la perlita). Sin embargo, la variación en la densidad de las partículas no es el único parámetro que afecta la expansión del lecho, la producción del gas debe ser también considerada, todas estas determinaciones se hicieron de forma experimental, y la ecuación matemática utilizada para calcular la porosidad del lecho, la cual no es desarrollada por ellos, ya que tomaron la ecuación que se muestra en la tabla 2.2, la cual relaciona la porosidad y la altura del lecho a la velocidad mínima de fluidización, la cual ya es conocida.

En ese mismo año García y Buffière (1998), presentaron un estudio para el sistema descrito anteriormente en el cual se presenta una pequeña diferencia en la densidad de la perlita (280 Kg/m^3), en este caso el objetivo principal fue determinar la viabilidad del uso del reactor para la digestión anaerobia con un material que permita una buena superficie para que se adhiera la biomasa. La biomasa fue monitoreada tomando muestras de partículas biocubiertas y determinando los sólidos adheridos por diferencia de peso.

La diferencia de este trabajo es que con la observación microscópica realizada de las partículas de perlita se muestra una superficie irregular, con ángulos, hendiduras y grietas, por lo cual en sus cálculos tienen que ser afectados por el factor de esfericidad, y al igual que en el trabajo anterior se propone estudiar si la producción de gas tiene efecto en la expansión del lecho. Pero la contribución más importante es que ellos pudieron ver que la ventaja principal de utilizar la configuración de la fluidización de flujo descendente es que no se necesita remover los sólidos acumulados en el fondo del reactor, debido a la misma configuración del flujo no existe obstrucción, y hay un bajo requerimiento de energía, a causa de que se requieren velocidades de fluidización bajas.

Marín et. al., (1999); diseñaron y construyeron un reactor de lecho fluidizado anaerobio usando arena de playa como soporte sólido para la biomasa. Debido a que este tipo de sistemas son complejos, desarrollaron una serie de pruebas en microreactores, tales como la determinación de la expansión del lecho y la distribución de la alimentación.

Las consideraciones que hicieron para poder diseñar el reactor de lecho fluidizado fueron: el grado de expansión o hidrodinámica de fluidización, el material de soporte y sus características físicas, la temperatura de trabajo del sistema, y el control de pH.

Las características que utilizaron para el diseño fueron las siguientes: tamaño de partícula y material soportado, porosidad del lecho, velocidad de fluidización, calculo de la altura y diámetro del reactor y diseño del distribuidor de alimentación.

Marín et. al., concluyen que los reactores de lecho fluidizado anaerobio muestran mayores ventajas con respecto a otros sistemas anaerobios de biomasa fija en un soporte sólido los cuales una vez que son estabilizados son difíciles de ser lavados en el mismo reactor, además que se obtuvieron porcentajes de expansión considerablemente buenos y adecuados con la adición de biomasa en el soporte.

Buffière y Moletta (1999), hicieron un estudio en un reactor anaerobio de lecho fluidizado a flujo inverso. El reactor fue llenado con material sólido “extendoesferas”, material compuesto por sílica con una densidad de 690 Kg/m^3 , y se utilizó para tratar un agua residual de destilado de vino, el cuerpo de las partículas fue perfectamente esférico, y la superficie del material presento pequeñas grietas. En este caso el promedio del tamaño de la biocapa de las partículas fue estimado para las medidas del diámetro de las partículas. Las medidas fueron tomadas con un microscopio óptico graduado. La biomasa que cubría las partículas se presentó de manera uniforme, un amplio número de partículas fueron cubiertas de forma regular por una biocapa delgada de espesor constante. Por lo cual en este caso se llegó a la conclusión de que esto puede ser debido a la forma perfectamente esférica y a los efectos de fricción por turbulencia.

Saravanane, Murthy y Krishnaiah (2001), estudiaron la degradación anaerobia de un efluente farmacéutico en sistemas batch para el arranque del reactor usando como soporte carbón activado granular de $700 \mu\text{m}$ y sobrenadante de un inóculo simple y uno múltiple en condiciones anaerobias. Su investigación también describe el uso de un reactor enriquecido de lecho

fluidizado para el tratamiento de un efluente farmacéutico con COD para obtener un aumento de la biomasa en presencia de ácidos grasos volátiles.

Ellos demostraron que el tiempo de arranque de un reactor de lecho fluidizado empleado para un tratamiento de un efluente farmacéutico fue decreciendo con el uso del inóculo múltiple. La remoción de COD en estado estacionario fue utilizado para incrementar la biomasa con un reactor enriquecido de lecho fluidizado. El COD removido se incremento con la presencia del ácido graso volátil como co-sustrato en comparación con los resultados obtenido sin co-sustrato.

Turan y Ozturk (2001), investigaron las características de expansión del lecho y predicción del desarrollo de la biocapa y biomasa la cual se mantiene en la parte superior en un reactor de lecho fluidizado anaerobio, observando que las características de expansión y de la mezcla de partículas de un lecho fluidizado que contiene diferentes biopartículas es una función complicada de muchas variables, incluyendo hidrodinámica, características de soporte y estructura de la biocapa. La media geométrica del diámetro fue considerado como el diámetro característico de las biopartículas variando el tamaño y la densidad.

Los reactores biológicos de lecho fluidizado presentan dos tipos de expansión de lecho, el primero es debido a un incremento de la velocidad superficial y el segundo se debe al crecimiento microbiano en el lecho.

Turan y Ozturk diseñaron una nueva relación para calcular la porosidad del lecho fluidizado biológico, encontrando que el espesor de la biocapa y la porosidad del lecho se incrementa rápidamente en la parte superior del lecho y las biopartículas comienzan a ser más ligeras que las partículas limpias con una densidad efectiva la cual va decreciendo.

2.3. Fluidización Sólido-Líquido a Flujo Inverso

Fan y Muroyama (1982), hicieron un estudio acerca del comportamiento hidrodinámico de los lechos que operan a flujo inverso en dos tipos de sistemas. Ellos estudiaron los sistemas líquido-sólido, y los sistemas gas-liquido-sólido, ellos trabajaron con esferas sólidas de polietileno y polipropileno de seis distintos diámetros y densidades, y midieron la porosidad por una medida directa de la altura del lecho fluidizado, y basándose en una correlación entre los modelos tipo uno y dos los cuales se muestran en la tabla 2.1, se desarrolló una explicación para la expansión del lecho sólido-liquido fluidizado en forma inversa, estas correlaciones cumplen un amplio intervalo de condiciones de operación.

La correlación que desarrollaron Fan y Muroyama (1982) está expresada en términos de números adimensionales como la porosidad del lecho, número de Arquímedes y la relación del diámetro de la partícula con respecto al diámetro de la columna. Este modelo solo funciona para ciertos intervalos de aplicación, y llegaron a la conclusión de que los datos experimentales que obtuvieron para la expansión del lecho fluidizado de manera inversa en sistemas sólido-líquido, no puede ser representadas de manera satisfactoria por los valores de las correlaciones para un lecho de flujo ascendente, y en este caso no se llega a determinar la expansión del lecho para un sistema real en el cual se lleve acabo un aumento de espesor de en las partículas fluidizadas.

La tabla 2.3 muestra las correlaciones que han sido utilizadas para poder hacer la predicción de la expansión de la fluidización inversa.

Tabla. 2.3. Modelos Matemáticos para el Cálculo de la Expansión del Lecho a Flujo Inverso.

Autores	Ecuación	Correlación	Intervalos de Aplicación
Fan y Muroyama (1982)	$\frac{U}{U_t} = \varepsilon^n$	$n = 15 \text{Re}_t^{-0.35} e^{3.9 \frac{d}{D}}$ $n = 8.6 \text{Re}_t^{-0.2} e^{-0.75 \frac{d}{D}}$	$350 < \text{Re}_t < 1,250$ $\text{Re}_t > 1,250$
Fan y Muroyama (1982)	$f = \frac{Ar}{13.9 \text{Re}^{1.4}}$	$f = \frac{3Ar}{\text{Re}^2}$ $f = 3.21 \varepsilon^{-4.05} Ar^{-0.07} e^{3.5 \frac{d}{D}}$ Fluidización Inversa $f = 3.21 \varepsilon^{-4.05} Ar^{+0.07} e^{3.5 \frac{d}{D}}$	$2 < \text{Re} < 500$ $\text{Re} > 500$ $\varepsilon = 0.40 - 0.88$ $Ar 1.1 \times 10^5 - 7.65 \times 10^6$ $d/D = 0.062 - 0.250$
Renganathan y Krishnaiah (2004)	$Di = 1.48 \times 10^{-4} Ar^{0.66} \left(\frac{\text{Re}}{\text{Re}_{mf}} \right)^{1.73}$	-----	$17.6 < Ar < 1.29 \times 10^7$ $0.036 < \text{Re} < 1267$

Dong Hyun Lee (2001), desarrolló un estudio experimental de la hidrodinámica de lechos en dos fases sólido-líquido, para sistemas de flujo descendente y ascendente. Para los lechos de flujo ascendente, utilizó partículas con densidad mayor a la del agua tales como: poliestireno ($1,021 \text{ kg/m}^3$), polímero ($1,280 \text{ kg/m}^3$) y esferas de vidrio ($2,230 \text{ kg/m}^3$), y para lechos de flujo descendente, utilizó partículas de polietileno ($910, 930, 946 \text{ kg/m}^3$) con densidad menor a la densidad del agua, los experimentos fueron hechos con distintos líquidos como el agua, solución acuosa de glicerol y aceite de silicón.

Lee llegó a la conclusión de que para ambos sistemas de flujo ascendente y descendente, el gradiente de presión adimensional se incrementa inicialmente con el incremento de la velocidad del líquido, pero decrece gradualmente con el aumento de la velocidad del líquido más allá de U_{mf} debido a la expansión del lecho. Lee, decidió aplicar las correlaciones experimentales y la

ecuación de Richardson y Zaki para demostrar que tanto los sistemas en flujo descendente como los de flujo ascendente pueden ser aplicables a la misma ecuación (ver tabla 2.1), donde la velocidad superficial del líquido en fluidización mínima debe ser la misma para ambos sistemas de fluidización ascendente y descendente.

María Claudia Vivas y Nelly Jorge Martínez (2002) realizaron un estudio teórico de las relaciones matemáticas que presenta la hidrodinámica de un lecho fluidizado invertido obteniendo como conclusiones que la forma de las partículas afecta la velocidad mínima de fluidización, la porosidad del lecho.

Renganathan y Krishnaiah (2007) realizaron experimentos en condiciones de estado no estacionario en un lecho fluidizado a flujo inverso realizando mediciones en el cambio de la velocidad de fluidización por medio de electrodos los cuales se encuentran inmersos en el lecho fluidizado y pudiendo así determinar la variación en la altura del lecho y la porosidad del mismo con el tiempo, los cuales fueron calculados con ayuda del modelo propuesto por Foscolo y Gilibaro (1987), otra ventaja es que, este modelo no tiene ningún parámetro ajustable.

Los resultados experimentales concuerdan con los resultados simulados por la ecuación de Foscolo y Gilibaro, también pudieron darse cuenta que el efecto de histéresis ocurre durante el cambio de paso en la velocidad y que este se puede expresar de manera cualitativa.

La revisión de antecedentes demuestra que las ecuaciones desarrolladas para el cálculo de la porosidad de un lecho fluidizado sólido líquido operado a flujo tradicional, son válidas, cuando se aplican para lechos fluidizados que operan a flujo inverso; a pesar de que algunos autores consideran que las ecuaciones de flujo inverso deben tratarse con ecuaciones diferentes a las de flujo tradicional.

De la gran cantidad de ecuaciones y correlaciones propuestas, es un hecho que la mayor parte de los trabajos de investigación se comparan contra los valores obtenidos por las ecuaciones propuestas por autores como Richardson y Zaki, Subbaraju, Riba y Couderc, Wen y Yu y algunos

otros. Estas ecuaciones se han aplicado en forma directa o con algunas modificaciones tanto para partículas inertes como para partículas con biopelícula en aplicaciones biotecnológicas.

Son pocas las publicaciones que consideran el cálculo de la porosidad con variación del espesor de la biocapa con el tiempo

La revisión de la literatura también resalta el hecho de que todos los autores, han supuesto que las partículas son de forma esférica, con la excepción de muy pocos, y que varios autores consideran que esta suposición debería revisarse.

CAPITULO III.

Desarrollo Teórico

3.1. Procedimiento para la Extensión de la Ecuación de Limas et al. (1982) para la predicción de la expansión de un Lecho Fluidizado Sólido-Líquido a Flujo Inverso con Crecimiento de una Capa Biológica.

La ecuación de Limas et al., es una ecuación para el cálculo de la porosidad de partículas no esféricas y esféricas, y debido a que esta ecuación solamente se aplica para números de Reynolds que entran en el intervalo de 200 a 6000, se decidió hacer una extensión de este modelo, ya que en este trabajo se realizaron experimentos con números de Reynolds menores a este intervalo.

Se hizo una recopilación de experimentos realizados por Wilhelm y Kwauk (1948), los cuales trabajan con números de Reynolds menores a 200, los datos se muestran en el anexo B.

Con estos datos se procede a calcular el diámetro de superficie (d_s) con la ecuación 3.1.

$$d_s = \left(\frac{S_p}{\pi} \right)^{1/2} \quad (3.1)$$

El número de Galileo de superficie (Ga_s) con la ecuación 3.2.

$$Ga_s = \frac{d_s^3 g \rho_L^2}{\mu_L^2} \quad (3.2)$$

La relación de densidades (M_v) con la ecuación 3.3.

$$M_v = \frac{(\rho_s - \rho_L)}{\rho_L} \quad (3.3)$$

Se calcula el número de Reynolds de superficie (Re_s) con la ecuación 3.4.

$$Re_s = \frac{d_s v \rho_L}{\mu_L} \quad (3.4)$$

Y el coeficiente de arrastre inercial se calcula con la ecuación 3.5.

$$C_I = 2.25 \left(\frac{5.5}{Re_s} \right)^{0.34} \quad (3.5) \quad 5.5 \leq Re_s \leq 200$$

Con estos valores se obtiene la ecuación 3.6, la cual se puede aplicar en los intervalos que se

muestran a continuación:

Tabla 3.1. Extensión de la Ecuación Limas et al., con Datos Experimentales de Wilhelm y Kwauk

Ecuación Campos Díaz-Limas-Ballesteros	Intervalos
$1.8\varepsilon^{-3.74} = \frac{Ga_s Mv}{0.75(24 Re_s + C_l Re_s^2)} \quad (3.6)$	$5.5 \leq Re_s \leq 200$ $0.375 \leq \varepsilon \leq 0.928$ Esferas

Aplicando el mismo procedimiento se puede obtener una nueva extensión de la ecuación con una mejor aproximación para crecimiento biológico para minimizar la desviación de los datos, utilizando el conjunto de datos experimentales de Wilhelm y Kwauk (1948) y los obtenidos en este trabajo en la fluidización de película sintética y biocapa.

Tabla 3.2. Extensión de la Ecuación Limas et al., con Datos Experimentales de Wilhelm y Kwauk, Película Sintética y Biocapa

Ecuación Campos Díaz-Limas-Ballesteros	Intervalos
$1.753\varepsilon^{-3.807} = \frac{Ga_s Mv}{0.75(24 Re_s + C_l Re_s^2)} \quad (3.7)$	$5.5 \leq Re_s \leq 200$ $0.375 \leq \varepsilon \leq 0.928$ Esferas

De esta forma, lo que se hará con estas ecuaciones será que con los datos obtenidos experimentalmente para las capas inertes y biológicas ver si son bien representados mediante gráficas de porosidad experimental contra los valores calculados de la función de porosidad con los datos físicos del fluido y de las partículas. Las funciones de porosidad se presentan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Función de la Porosidad de Ecuaciones Consideradas en este Estudio.

Autor	Función de la Porosidad f (ε)
Richardson y Zaki (1954)	$f(\varepsilon)_{R-Z} = \frac{u_i}{u}$
Wen y Yu (1966)	$f(\varepsilon)_{W-Y} = \frac{Ar}{18Re + 2.7 Re^{1.687}}$
Riba y Couderc (1977)	$f(\varepsilon)_{R-C} = \frac{Ar}{1.9(18Re + 2.7 Re^{1.687})}$
Ramamurthy y Subbaraju (1973)	$f(\varepsilon)_{R-S} = \left(\frac{Ar}{13.9(Re^{1.4})} \right)^{\frac{1}{2.21}}$
Tjandra Setiadi (1989)	$f(\varepsilon)_{TS} = \frac{1.72 Re^{0.203}}{(Ga')^{0.179}}$
Campos y Limas (2007)	$f(\varepsilon)_{CD-LB} = 1.753 \left(\frac{0.75(24 Re_s + C_I Re_s^2)}{Ar} \right)^{\frac{1}{3.807}}$

3.2. Desarrollo de la Ecuación para Calcular la Masa Final de una Partícula cuando hay Crecimiento Microbiológico.

De la definición de densidad se obtiene la siguiente ecuación para el cálculo de la masa total de partículas con capa biológica (biopartículas).

$$M_{Tbp} = \rho_{bp} V_{bp} N_{bpT} \quad (3.8)$$

La definición de volumen de una esfera es:

$$V_{bp} = \frac{4}{3} \pi r_{bp}^3 \quad (3.9)$$

Sustituyendo la ecuación (3.9) en la ecuación (3.8) se obtiene:

$$M_{Tbp} = \rho_{bp} \left(\frac{4}{3} \pi r_{bp}^3 \right) N_{bpT} \quad (3.10)$$

La ecuación de Monod es:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3.11)$$

De la ecuación para el cálculo de distribución de tamaños que involucra el crecimiento lineal de una partícula por depósito o condensación de material, propuesta por Kunii y Levenspiel (1991).

$$\frac{dR}{dt} = R(R) = \mu \quad (3.12)$$

Desarrollando la ecuación (3.12) con Ri constante:

$$\int_{R_i=cte}^{R_{máx}} dR = \mu \int_{t_i}^{t_f} dt \quad (3.13)$$

Por lo tanto la ecuación (3.13) queda de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{(R_{m\acute{a}x} - R_i)}{(t_f - t_i)} \quad (3.14)$$

Sustituyendo la ecuación (3.14) en la ecuación (3.11):

$$\frac{(R_{m\acute{a}x} - R_i)}{(t_f - t_i)} = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3.15)$$

Despejando el radio final:

$$(R_{m\acute{a}x} - R_i) = \mu_{\max} (t_f - t_i) \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3.16)$$

$$(R_{m\acute{a}x} - R_i) = \mu_{\max} (t_f - t_i) \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3.16)$$

$$(R_{m\acute{a}x} - R_i) = \mu_{\max} (t_f - 0) \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3.17)$$

Haciendo uso de la ecuación (3.19) se puede calcular el radio final de las biopartículas.

$$R_{m\acute{a}x} = \mu_{\max} t_f \frac{[S]}{K_s + [S]} + R_i \quad (3.19)$$

Sustituyendo la ecuación (3.19) en la ecuación (3.10) se obtiene la masa total de las biopartículas:

$$M_{Tbp} = \rho_{bp} \left[\frac{4}{3} \pi \left(\mu_{\max} t_f \frac{[S]}{K_s + [S]} + R_i \right)^3 \right] N_{bpT} \quad (3.20)$$

La ecuación (3.20) puede ser sustituida en la ecuación (3.21) o calcularse por separado:

$$\varepsilon = 1 - \frac{M_{Tbp}}{HS \rho_{bp}} \quad (3.21)$$

3.3 Simulación del crecimiento de la biocapa con modelo 2D de Picioreanu

Dado que el objetivo principal del trabajo es proponer una ecuación para estimar la porosidad del lecho fluidizado a flujo inverso con partículas con una biocapa. El crecimiento de la biocapa se simulará usando el simulador publicado por Picioreanu (2006). Para el uso del simulador se requiere definir el sistema que se va a usar, por lo que las condiciones que se considerarán para este trabajo son:

3.3.1 Definición del sistema

- Prueba de corta duración
- Sustrato plano en contacto con una fase fluida completamente mezclada
- Un solo proceso de crecimiento biológico
- Proceso de lisis despreciable comparado con el de crecimiento durante la operación (La constante de muerte celular fue tomada del artículo de Gomes y Malcasa (1999)).
- El proceso de lisis no produce ningún producto particulado
- Tasa de desprendimiento de biomasa despreciable durante la operación
- Se supone que no hay procesos de conversión en el seno de la fase continua
- La biocapa resultante tiene una densidad de biomasa constante
- Condiciones de operación uniformes
- El crecimiento es el mismo para todas las partículas

Las constantes de Monod para la cepa de *Lactobacillus acidophilus* NCFM liofilizado obtenida por Danisco Cultures se obtuvieron del estudio cinético de crecimiento realizado en el Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Biotecnología (UAM-IZT) por Rodríguez Huevo y Duran Lugo.

La ecuación del Dr. Mark C.M. van Loosdrecht, Dr. Cristian Picioreanu y Merle K. de Kreuk (2006), para determinar distintos espesores de biocapa a diferentes tiempos, considera las propiedades del microorganismo como son la velocidad específica de consumo del sustrato q_{\max}^s , la constante media de saturación de oxígeno del

microorganismo k_o , y las propiedades del ambiente como la concentración de oxígeno disuelta en el líquido C_o , el espesor de la capa límite w .

Los valores utilizados para calcular el espesor de la capa biológica se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.4. Parámetros para el modelo de Picioreanu (2006)

Parámetro	Valor	Unidades
q_{\max}^s	0.05	h^{-1}
k_o	1×10^{-4}	g/L
C_o	1×10^{-3}	g/L
w	8×10^{-6}	m
k_d	1×10^{-3}	h^{-1}

El valor de velocidad específica de consumo del sustrato, la constante media de saturación de oxígeno del microorganismo y la constante de muerte son conocidas de la cinética del microorganismo, en este caso la concentración de oxígeno disuelta en el líquido se considero igual a la del agua, ya que se esta trabajando con un sistema anaerobio.

CAPITULO IV.

Experimentación

4.1 Planeación Experimental

Como metodología experimental se propuso determinar primero la altura del lecho a diferentes velocidades de flujo, con dos tipos de lechos de partículas:

- *Partículas con capa inerte (ver figura 4.1)*
- *Partículas con capa biológica (ver figura 4.2).*

Con el lecho de partículas del primer caso se hicieron los ajustes necesarios a la instalación para pasar después a las pruebas con la capa biológica. La descripción de los pasos a seguir, se presentan de manera resumida en los diagramas de las figuras 4.1 y 4.2

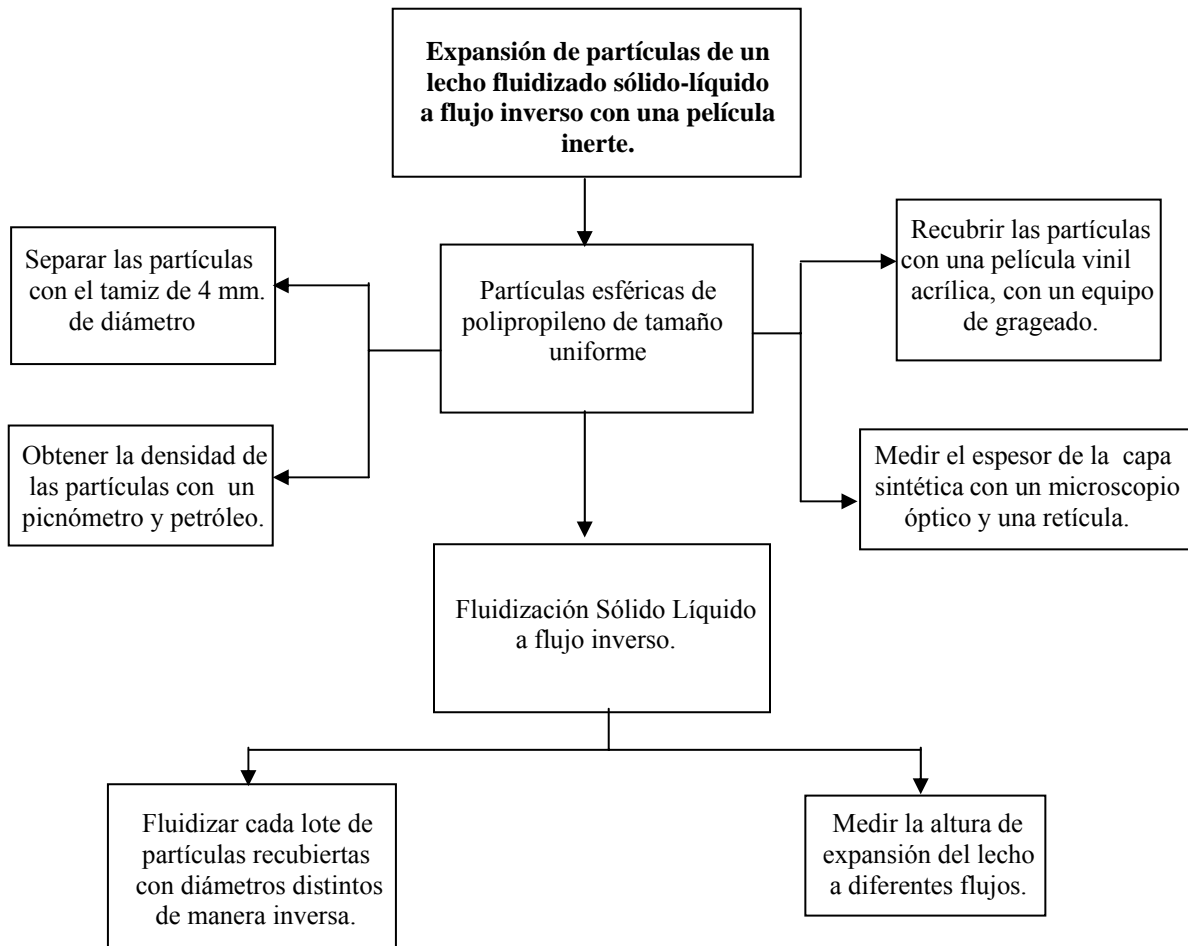


Figura 4.1 Esquema de la primera etapa de la metodología experimental

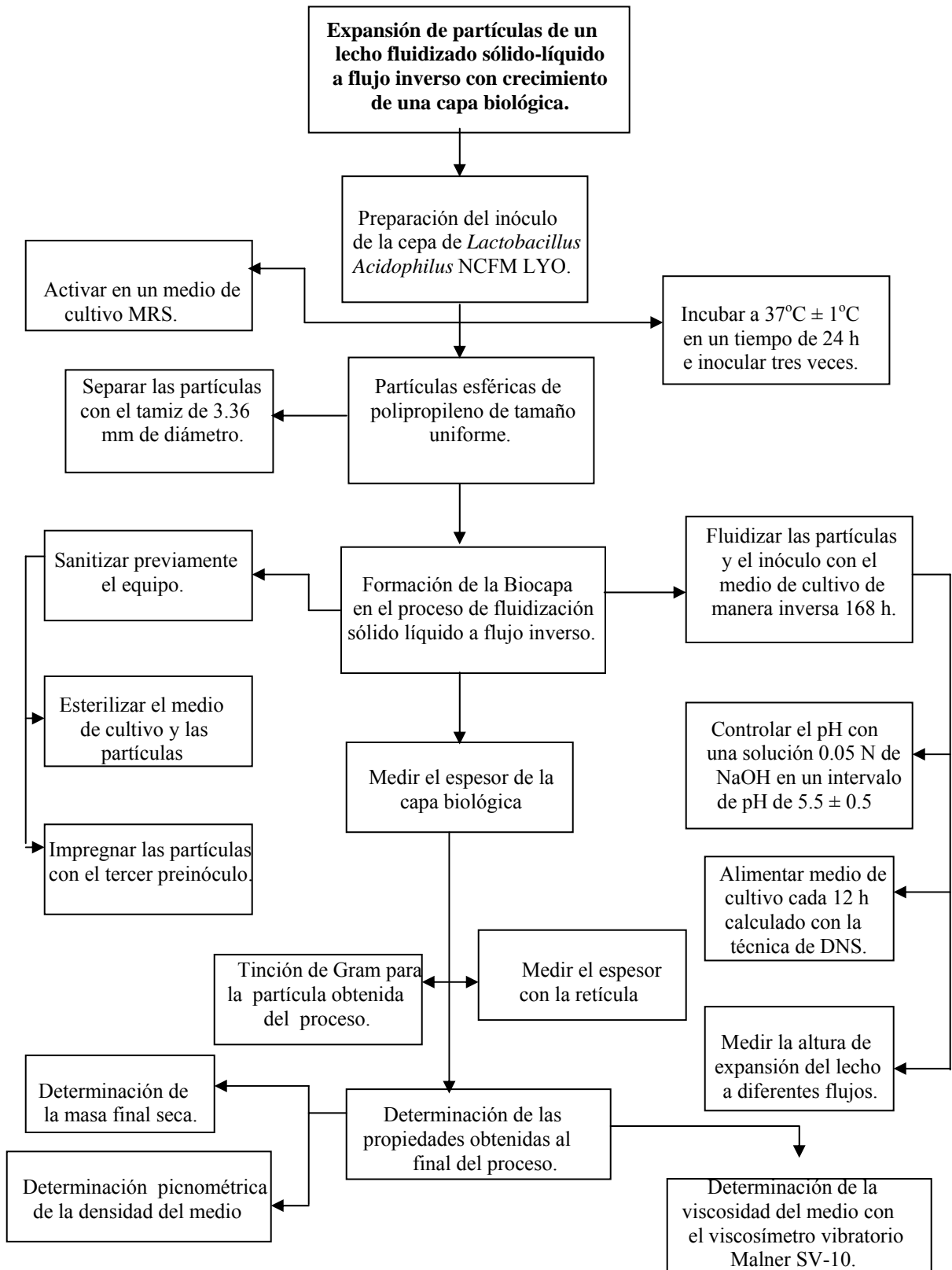


Figura 4.2 Esquema de la segunda etapa de la metodología experimental

4.2 Descripción de la Instalación de un Lecho Fluidizado.

En la figura 4.3 se presenta un diagrama de la instalación experimental que se usó. En este diagrama se pueden observar tres zonas principalmente:

- Zona de Alimentación.
- Zona de Homogeneización.
- Zona de Expansión.

La Zona de Alimentación está constituida por un tanque de alimentación TA que sirve para almacenar el fluido que se alimenta a la columna C, en este tanque se homogeniza la alimentación fresca con el efluente de recirculación. Para medir el gasto se cuenta con un rotámetro R, además de una bomba B1 que se utiliza para alimentar el fluido.

En la Zona de Homogeneización H se encuentra ubicado el distribuidor D que tienen como función distribuir el flujo de agua y evitar que este entre en un solo punto de la columna, lo que permite tener una mejor distribución.

La zona de expansión consta de una columna de vidrio C en la cual se lleva a cabo el fenómeno de fluidización, ya que en dicha zona se mezcla la corriente de agua con las partículas sólidas P, llevando dicha corriente una velocidad que permite que las partículas sólidas empiecen a ser fluidizadas.

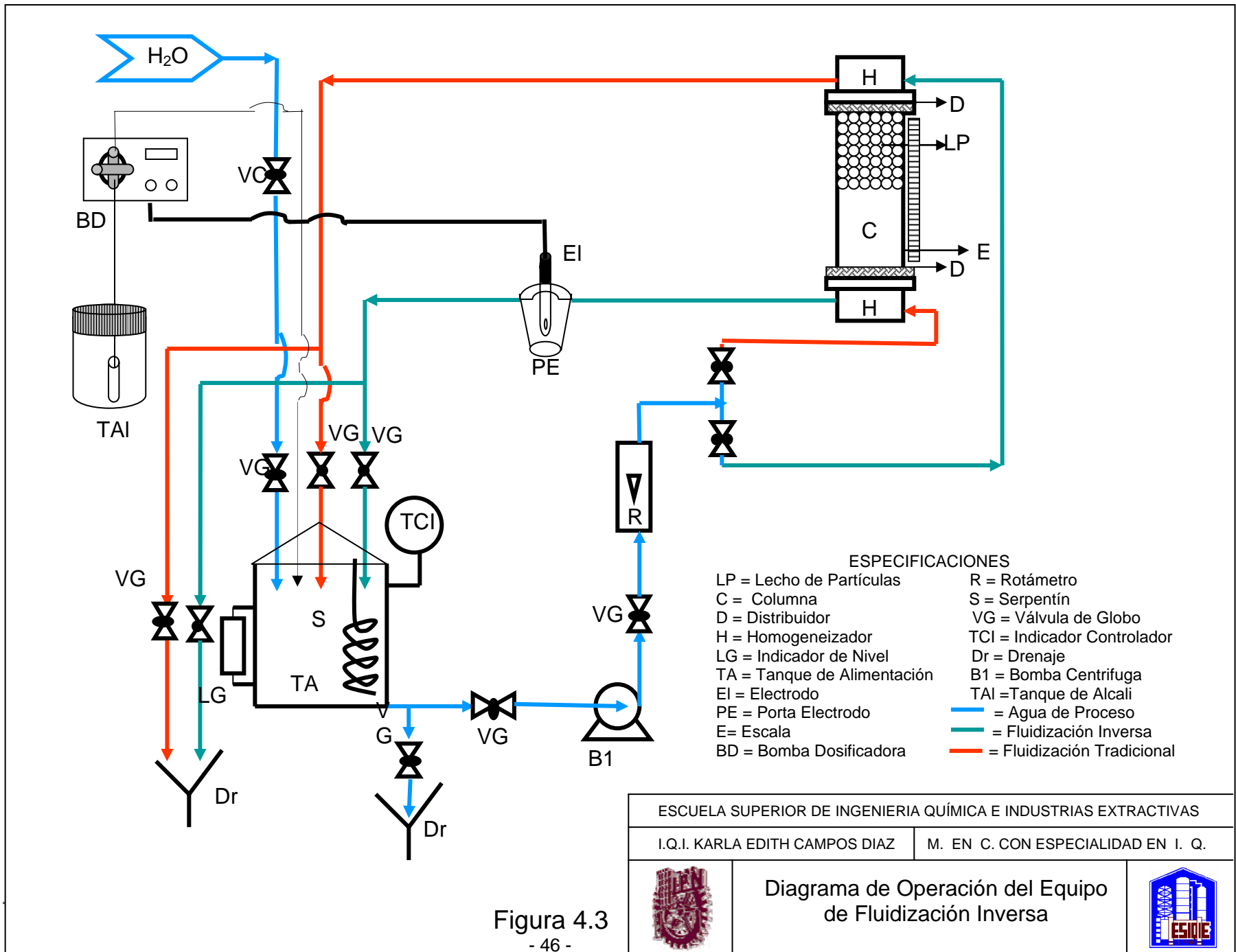


Figura 4.3

4.3 Desarrollo Experimental de la Expansión de las Partículas de un Lecho Fluidizado con una Capa Sintética

4.3.1 Las Partículas

Se usaron partículas esféricas de polipropileno, de 4 mm. de diámetro de tamaño uniforme y con densidad de 808 Kg/m^3 , la cual se determinó con un picnómetro. El aumento del diámetro de las partículas se hizo mediante un recubrimiento con una película (vinil-acrítica), por medio de aspersión y secado en un equipo de grajeado como el que se muestra en la figura 4.4. El recubrimiento se realizó a diferentes intervalos de tiempo hasta lograr que el diámetro de las partículas aumentara y variara la densidad de las partículas.



Figura 4.4 Grajeadora

El espesor de la capa sintética se midió experimentalmente como se muestra en la figura 4.5, tomando una muestra de cada uno de los lotes, y con la ayuda de un microscopio óptico acoplado a una computadora fue posible tomar fotografías de las partículas para medir el espesor, esto se hizo con una escala calibrada en mm. (retícula figura 4.6).

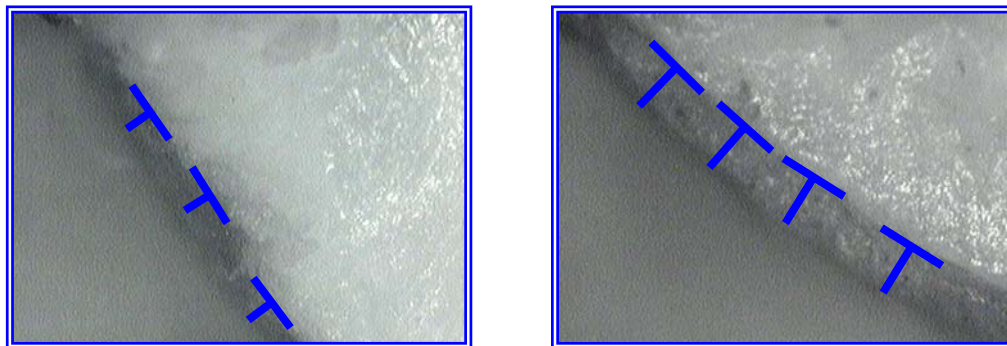


Figura 4.5 Medida del Espesor de la Película Sintética

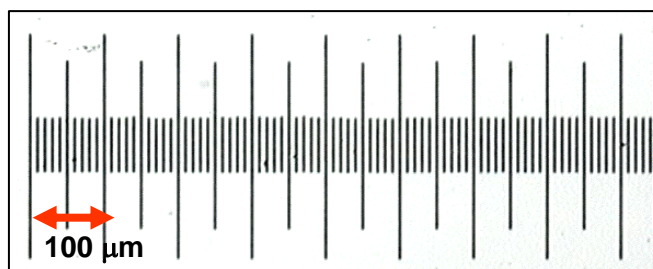


Figura 4.6 Escala calibrada en mm (retícula)

4.3.2 Fluidización Sólido-Líquido a Flujo Inverso.

Cada lote de partículas recubiertas con diámetros distintos se fluidizó de manera inversa en la columna (ver figura 4.7), y se midió la altura de expansión del lecho a diferentes velocidades de flujo. Con estos datos, se determina la porosidad experimental del lecho.



Figura 4.7 Columna de Fluidización Inversa

4.4 Desarrollo Experimental de la Expansión de las Partículas de un Lecho Fluidizado con Crecimiento de una Capa Biológica

4.4.1 Microorganismos.

La bacteria utilizada en este trabajo fue una cepa de *Lactobacillus Acidophilus* NCFM LYO 10 DCU obtenida por Danisco Cultures, la cual se alimentó con un nutriente MRS (Man-Rogosa-Sharpe; Agar para *Lactobacillus*).

4.4.2 Preparación del Inóculo.

El *Lactobacillus Acidophilus* Liofilizado fue activado en el medio de cultivo MRS. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) Pesar una pequeña cantidad de *Lactobacillus Acidophilus* Liofilizado en un matraz Erlenmeyer de 15 mL el cual contenía 10 mL del medio bajo condiciones estériles.
- 2) Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 24 h.
- 3) Pasado este tiempo, transferir 1 mL del primer preinóculo a un matraz erlenmeyer de 15 mL el cual contenía 9 mL de medio de cultivo nuevo, e incubar en las mismas condiciones y tiempo que el primero.
- 4) Repetir el tercer paso para obtener un tercer precultivo con el segundo en las mismas condiciones, para de esta manera asegurar que el *Lactobacillus* se encuentra activo y en fase de crecimiento exponencial, listo para utilizarse en la experimentación.

4.4.3 Identificación del *Lactobacillus Acidophilus*

La verificación del microorganismo que formó la biocapa se hizo primeramente mediante una tinción de Gram de una muestra de partículas al término de la fluidización (ver figura 4.8). Las micrografías tomadas fueron después comparadas con las publicadas^{1,2}, (ver figura 4.9), verificándose así la presencias del *Lactobacillus acidophilus*.

¹ <http://elementy.ru/news/165037>

² <http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora.html>



Figura 4.8 Tinción Gram de *Lactobacillus Acidophilus* NCFM LYO

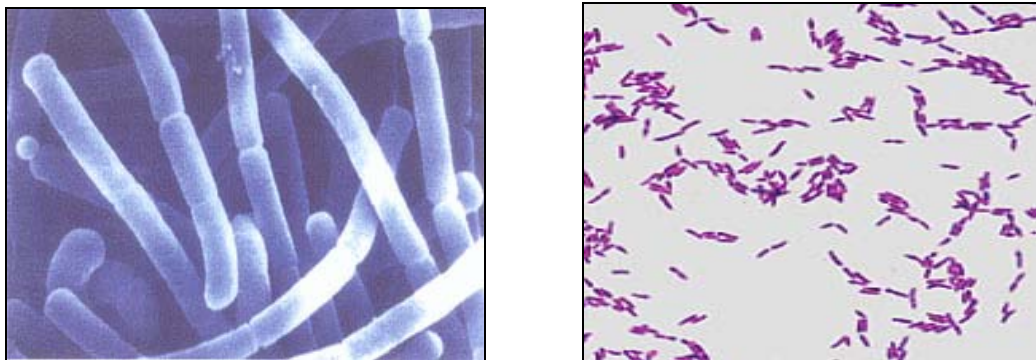


Figura 4.9 Tinción Gram de *Lactobacillus Acidophilus*^(1,2)

4.4.4 Formación de la Biopelícula.

Se utilizó la instalación de fluidización que se muestra en la figura 4.3 previamente sanitizada. Se usaron partículas esféricas de polipropileno de 3.36 mm., de diámetro de tamaño uniforme y con densidad de 808 Kg/m³, estas fueron lavadas y esterilizadas en una autoclave (All American 1941X). Las partículas fueron impregnadas con 10 mL del tercer preinoculo y se introdujeron en la columna.

El tanque se alimentó con 5.75 L de medio de cultivo MRS, el cual fue bombeado por la parte superior de la columna a una velocidad de 0.30 GPM y la salida del medio se recirculó hacia el tanque de alimentación.

El medio de cultivo se mantuvo a una temperatura de 37°C ± 1°C y el pH fue controlado en un intervalo de 5.5 ± 0.5, por medio de la adición de una solución de Hidróxido de Sodio

0.05 N. La fluidización del lecho se mantuvo de forma continua durante 168 h para formar la biocapa en las partículas. Fue necesario alimentar medio de cultivo esterilizado al sistema cada doce horas, para reponer la fuente de carbono consumida por el microorganismo, lo cual se determinó por medio de la técnica colorimétrica de DNS para consumo de azúcares.

La altura del lecho se midió a diferentes intervalos de tiempo y a diferentes valores de flujo. Pasadas las 168 h se midió la altura de expansión del lecho a diferentes velocidades de flujo y con estos datos se determinó la porosidad experimental del lecho.

4.4.5 Espesor de la Biopelícula.

El espesor de la biopelícula fue de 77 μm , el cual se midió de manera experimental tomando una muestra del lote total de partículas las cuales fueron retiradas del proceso de fluidización inversa, primeramente se hizo una tinción de gram sobre las partículas para poder observar la biopelícula la cual se muestra en la figura 4.10, esto se hizo con un microscopio óptico acoplado a una computadora para medir el espesor con ayuda de la escala calibrada en mm. (retícula figura 4.6).

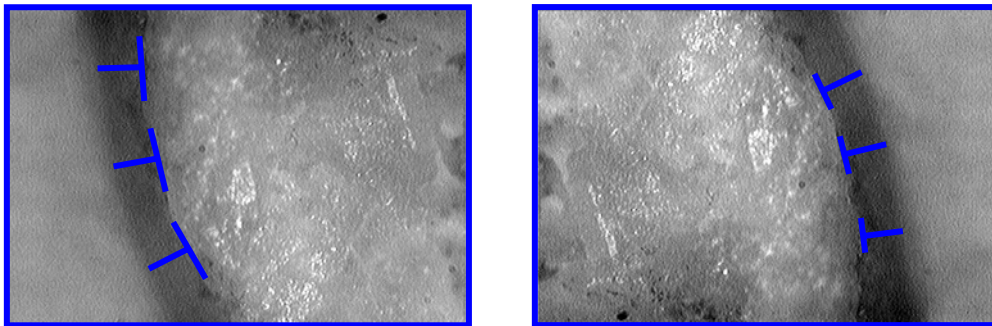


Figura 4.10 Medida del Espesor de la Biopelícula

Finalmente se determinaron las propiedades del medio de cultivo al final del proceso como la densidad con la ayuda de un picnómetro, la viscosidad con un viscosímetro vibratorio Malvern SV-10 (ver figura 4.11), y la masa final de las partículas con biopelícula (peso

seco), la cual se determinó secando las partículas en una estufa de vacío y pesando en una balanza analítica.



Figura 4.11 Viscosímetro Vibratorio

4.4.6 Tratamiento de las Muestras para su observación mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Para poder observar la capa biológica de *Lactobacillus acidophilus* en el microscopio electrónico de barrido, fue necesario hacer un tratamiento previo para fijar los microorganismos de la muestra al soporte debido a que los materiales biológicos resultan ser delicados en su manejo para ser observados. Este procedimiento se hizo en los Laboratorios Centrales del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV.

La técnica consiste en hacer lo siguiente:

- Se lavan las muestras con una solución salina buffer de fosfato (PBS), manteniéndolas en agitación durante un minuto para quitar el exceso de sales del medio de cultivo debido al proceso.
- Se hizo la fijación del material para poder obtener estabilidad en la muestra, utilizando 100 μL de glutaraldehído al 2.5% y la presión osmótica del fijador fue regulada usando 900 μL de una solución buffer de PBS, manteniéndolas en agitación durante una hora

- Una vez fijadas las muestras se lavan en solución amortiguadora, generalmente tres cambios por un tiempo de 15 minutos cada uno. Es importante hacer todas las fijaciones, ya que sirve para mantener un pH básico lo cual es importante en microscopia.
- Para prevenir la deformación del secado al aire se hace posteriormente un tratamiento de postfijación, este tratamiento aumenta la conductividad eléctrica de la muestra y evita casi por completo la extracción de los lípidos de las membranas de los microorganismos durante la deshidratación. Como agente postfijador se utilizó una solución de tetraóxido de osmio al 1%, y se mantuvieron en agitación durante una hora, si las muestras comienzan a tomar un color negro o amarillo es debido a la reacción de oxidación que presenta el tetraóxido de osmio con los lípidos del microorganismo. Es importante tapar las muestras con papel aluminio, ya que el tetraóxido de osmio es fotosensible.
- Para liberar el agua de los tejidos se hace una deshidratación, la cual debe realizarse en forma gradual en baños crecientes del agente deshidratante (etanol), lo cual consiste en poner las muestras en solución de etanol y agitar por 15 minutos, este procedimiento se hace con soluciones de etanol al 50, 60, 70, 80 y 90%, para finalizar se hacen 3 lavados con agitación de 10 minutos cada uno con la solución de etanol al 100%.
- En MEB (Microscopía Electrónica de Barrido) no solamente se debe deshidratar la muestra, también es necesario conseguir una completa desecación. Para ello se aplica el método del punto crítico, este consiste en colocar la muestra en unas cestas con etanol al 100% dentro del equipo, se lleva a una temperatura de 4 °C añadiendo el CO₂ líquido el cual va a desplazar el etanol, después se lleva la muestra al punto crítico del CO₂ (31°C y 74 bar), y ya estable el equipo en estas condiciones se elimina el gas de la cámara y la muestra queda desecada. Todo el líquido pasará a gas sin atravesar las superficies celulares y del tejido incluyendo el contenido en la

muestra con la que se evitan los defectos de arrastre y de tensión superficial que se presentan en la evaporación.

- Las muestras desecadas se colocan en soportes de aluminio especialmente diseñados para el microscopio usando plata coloidal como adherente.
- Esta última fase consiste en sombrear con oro dentro de una cámara de vacío las muestras que se quieren observar en el microscopio, esto se hace para proveer a las muestras de una superficie conductora de la electricidad y del calor.

CAPITULO V.

Resultados y Discusión

5.1. Adhesión de los Microorganismos al Sustrato y Formación de la Biopelícula.

Para comprobar que efectivamente hubo crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* en el soporte inerte se observaron las partículas en el microscopio electrónico de barrido (MEB).

Primeramente se tomaron micrografías de una partícula de referencia a la cual se le denominó blanco, porque no presenta crecimiento microbiológico, para hacer una comparación del blanco con las partículas que fueron obtenidas del proceso de fluidización después de 168 horas. En la figura 5.1 se muestra la superficie del blanco, en la cual no hay crecimiento microbiológico, sin embargo en la figura 5.2 se observa que en la superficie del soporte se encuentran los microorganismos formando colonias y aglomerándose hasta formar algo parecido a una masa.

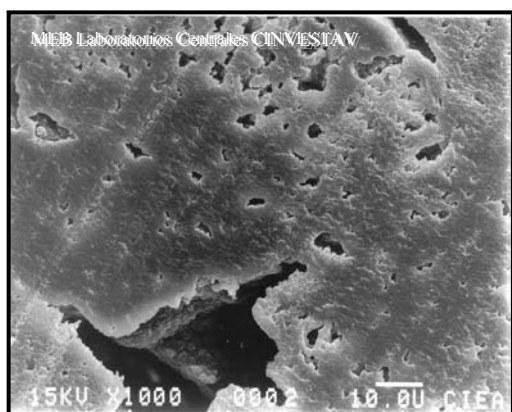


Fig. 5.1. Micrografía Soporte Superficie Blanco

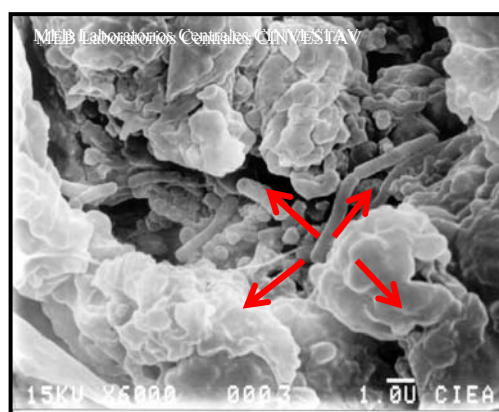


Figura 5.2. Micrografía Soporte Superficie con Tratamiento

En las figuras 5.3 y 5.4, se hace la comparación del corte de una partícula de referencia con otra que presenta crecimiento microbiológico, para poder observar si hay penetración de los *Lactobacillus* en el interior del soporte. De acuerdo con la figura 5.4 se puede ver que los *Lactobacillus* se encuentran en la parte interior del soporte formando un tipo de enrejado por unión de los bacilos.

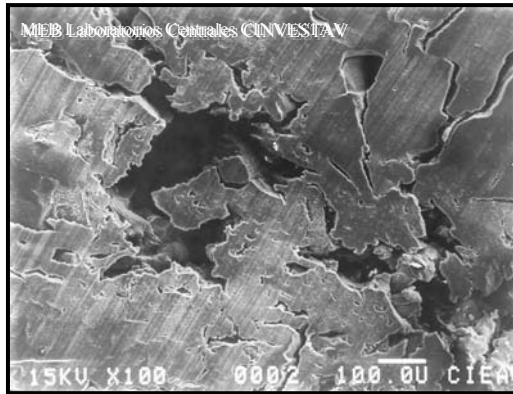


Fig. 5.3. Micrografía Soporte Interior Blanco

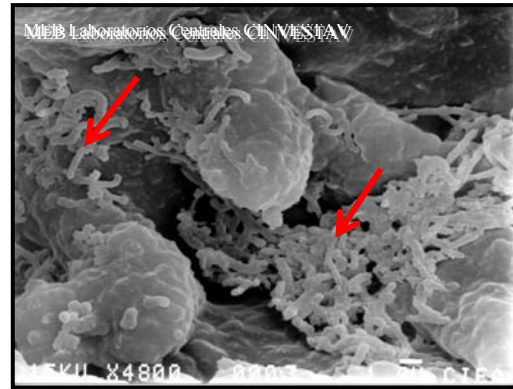


Fig. 5.4. Micrografía Soporte Interior Proceso

En las siguientes figuras se puede observar que la superficie de las partículas de polipropileno es microporosa, lo cual no se ve a simple vista. La micrografía de la figura 5.5 fue tomada en una partícula al tiempo cero del proceso en la que no hay adhesión de microorganismos, ni formación de biopelícula. Las figuras 5.6 y 5.7 se tomaron después de 168 horas de fluidización inversa, y los poros muestran crecimiento del microorganismo y se puede observar que en el interior la morfología y el agrupamiento del microorganismo no es la misma en las diferentes secciones del soporte.

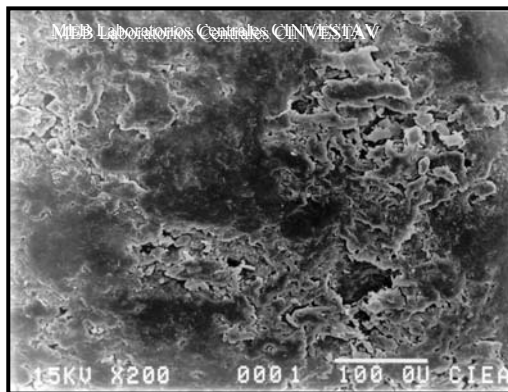


Fig. 5.5. Micrografía Soporte Superficie antes de proceso

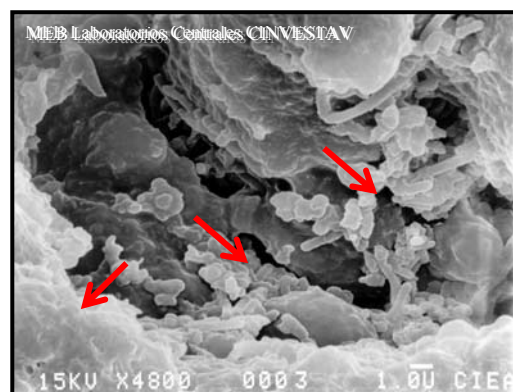


Fig. 5.6. Micrografía Soporte Poro después de proceso

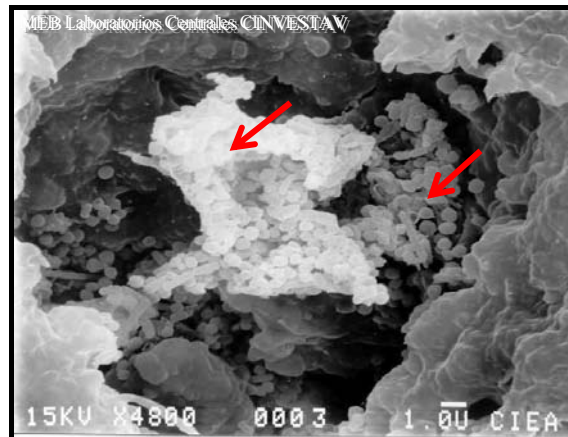


Fig. 5.7. Lactobacillus en el interior del Soporte

Las fotografías con el microscopio electrónico de barrido, permitieron confirmar la adhesión de Lactobacillus en los poros interiores del soporte.

5.2. Resultados de la Medición del Espesor de la Biocapa

En la figura 5.8 se muestra un corte de una partícula con biocapa obtenida del reactor de lecho fluidizado, en esta micrografía se observa una capa delgada de microorganismos. En la figura 5.9 se presenta un acercamiento para poder medir el espesor de la biocapa.

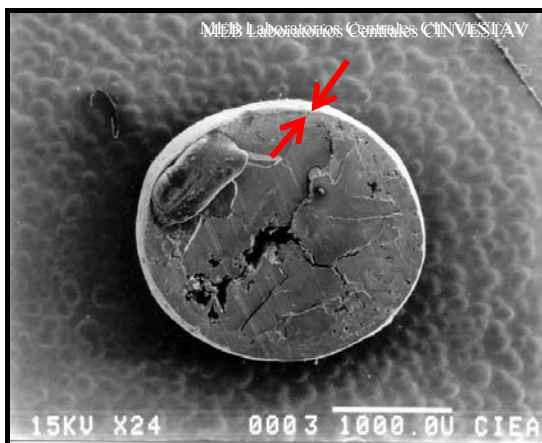


Fig. 5.8. Micrografía Espesor de Biocapa

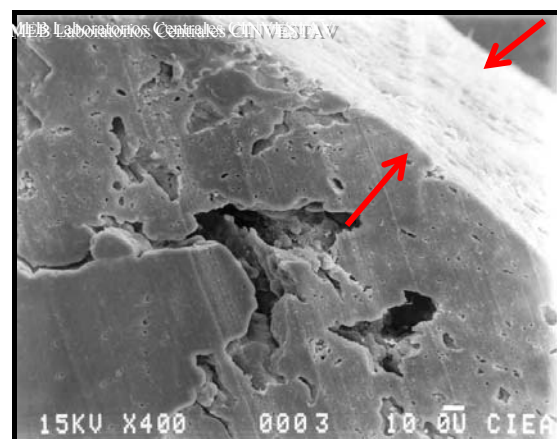


Fig. 5.9. Acercamiento Espesor de Biocapa

Con el acercamiento y el número de aumentos de la micrografía se obtuvo un espesor de 0.077 mm.

5.3. Resultados del Cálculo Teórico del Diámetro de Partículas y de la Masa Total de las Biopartículas en Función del Tiempo.

Haciendo uso de las ecuaciones 3.19 y 3.20 las cuales se presentan en el capítulo III, y los datos que se muestran en la tabla 5.1, se hizo el cálculo teórico del diámetro de las partículas y de la masa total adherida a las mismas, los resultados se presentan en la tabla 5.2.

Tabla 5.1. Valores Experimentales para Partículas sin Recubrimiento

μ_{\max}	Dia ⁻¹	0.012
K_s	g/L	1.8
[S]	g/L	110
T	°C	37 ± 1
r_o	mm.	1.68
ρ_o	Kg./m ³	808
ρ_{TBP}	Kg./m ³	842
N_{partículas}	-----	7343

Tabla 5.2. Valores Experimentales para Partículas con Recubrimiento Inerte

t (h)	d_{Bp} (mm.)	M (g)
24	3.384	125.41
32	3.392	126.28
34	3.393	126.51
46	3.405	127.83
56	3.415	128.94
74	3.432	130.96
77	3.436	131.30
98	3.456	133.67
124	3.462	136.67
168	3.525	141.83

Usando la ecuación 3.19, el espesor teórico que se obtiene para un tiempo de 168 horas es de 0.0825 mm.

5.4. Comparación del Cálculo del Espesor de la Capa Biológica con el Simulador del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Tecnología de Delf.

De acuerdo con el simulador del Dr. Mark C.M. van Loosdrecht, Dr. Cristian Picioreanu y Merle K. de Kreuk del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Tecnología de Delf, se pueden medir distintos espesores de biocapa a diferentes tiempos, con lo cual fue posible comparar el dato que se obtuvo de manera experimental a las 168 horas de haber concluido el experimento, con el dato proporcionado por el simulador.

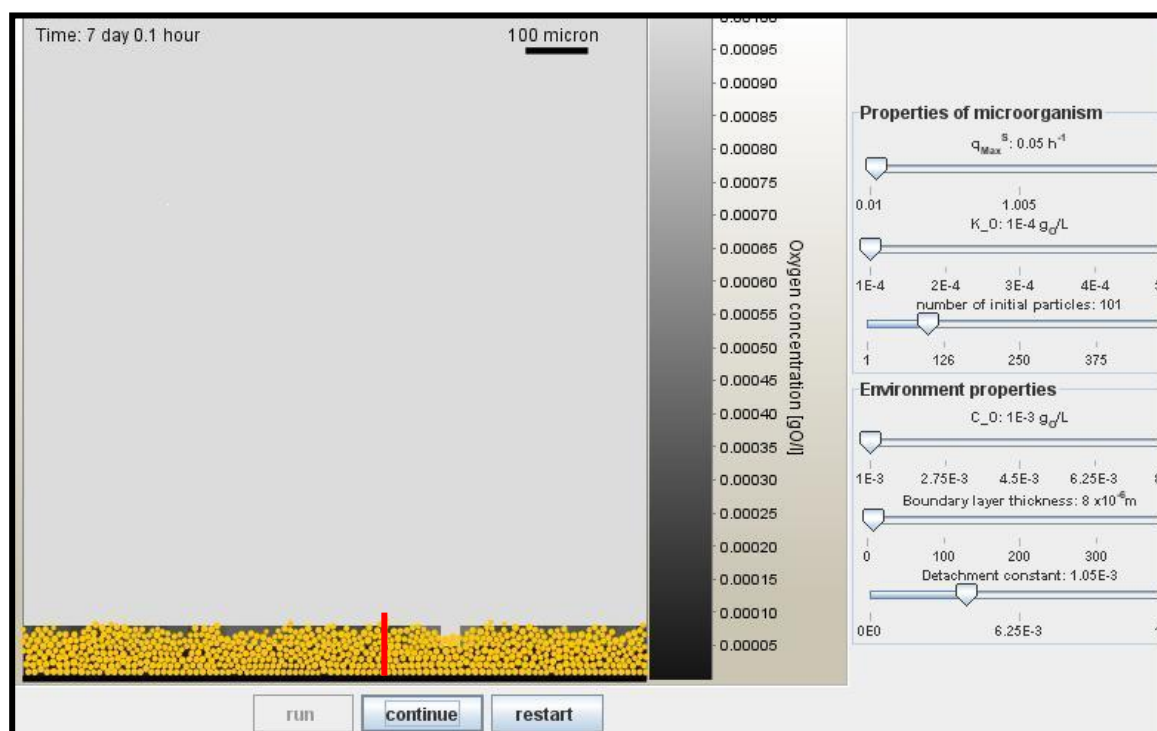


Figura 5.10. Simulación del Crecimiento de la Biocapa

Si se compara el valor del espesor de la biocapa que resulta de la ecuación 3.19 para un tiempo de 168 horas de 0.0825 mm., y el valor obtenido de manera experimental obtenido con el microscopio óptico y que fue medido con la escala calibrada de 0.077 mm., se obtiene un error de 6.6%. Si se compara el valor del espesor de la biocapa que se obtuvo con el simulador arriba mencionado que fue de 0.076 mm., y el valor obtenido de manera experimental de 0.077 mm., se obtiene un error del 1.3%.

5.5. Valores de las Variables y Números Adimensionales Consideradas en la Expansión del Lecho.

En las tablas 5.3, 5.4 y 5.5 se presentan los valores de las variables consideradas en la expansión del lecho, así como los números adimensionales que relacionan estas variables. La tabla 5.3 corresponde a los valores experimentales obtenidos con partículas esféricas sin recubrimiento, con un diámetro de partícula de 4 mm., y densidad de 808 Kg./m³, se utilizó como fluido de trabajo agua con una densidad de 1000 Kg./m³, y viscosidad de 1 cp, el número de Arquímedes permanece constante y tiene un valor de 272,615.

Tabla 5.3. Valores Experimentales para Partículas sin Recubrimiento para el Calculo de la Expansión del Lecho

Q (L/min)	v (cm/s)	Re
1.93	2.56	86.30
2.31	3.07	103.57
2.70	3.59	120.83
3.09	4.10	138.09
3.47	4.61	155.35
3.86	5.12	172.61
4.25	5.64	189.87

La tabla 5.4 es la que corresponde a los valores experimentales para partículas con recubrimiento inerte, para el primer recubrimiento se utilizaron partículas con un diámetro de 4.16 mm., y 825 Kg./m³ densidad, el número de Arquímedes es de 217,757 el cual permanece constante durante toda la experimentación y para el segundo recubrimiento las partículas presentaron un diámetro de 4.18 mm. y 867 Kg./m³ de densidad, las propiedades del fluido de trabajo son las mismas que para las partículas sin recubrimiento.

**Tabla 5.4. Valores Experimentales para Partículas con Recubrimiento Inerte para el
Calculo de la Expansión del Lecho**

Q (L/min)	v (cm/s)	Re Primer recubrimiento	Re Segundo recubrimiento
1.89	1.64	90.50	90.87
2.27	1.96	108.60	109.05
2.64	2.29	126.70	127.22
3.02	2.62	144.80	145.40
3.40	2.95	162.90	163.57
3.78	3.28	181.00	181.74
4.16	3.60	199.10	199.92

La tabla 5.5 corresponde a los valores obtenidos de partículas con biocapa. El diámetro de las partículas es de 3.514 mm., y densidad de 842 Kg./m³, las propiedades del fluido de trabajo (medio de cultivo) son: $\rho_L = 1013 \text{ Kg./m}^3$ y $\mu_L = 1.4 \text{ cp}$. El número de Arquímedes es de 45,100.

Tabla 5.5. Valores Experimentales para Partículas con Biocapa

Q (L/min)	v (cm/s)	Re
0.38	0.51	13.04
0.57	0.76	19.56
0.77	1.02	26.08
0.96	1.28	32.60
1.15	1.53	39.12
1.35	1.79	45.64
1.54	2.05	52.16
1.73	2.30	58.68
1.93	2.56	65.20
2.12	2.82	71.72
2.31	3.07	78.24
2.51	3.33	84.76

Q (L/min)	v (cm/s)	Re
2.70	3.59	91.28
2.89	3.84	97.80
3.09	4.10	104.32
3.28	4.35	110.84
3.47	4.61	117.36
3.67	4.87	123.88
3.86	5.12	130.40
4.05	5.38	136.92
4.25	5.64	143.44

5.6. Análisis de los Resultados de Porosidad del Lecho Obtenidos por la Expansión de Partículas en un Lecho Fluidizado con Película Sintética y con Capa Biológica.

El análisis de los resultados se hará primeramente graficando los valores de las funciones de porosidad de las ecuaciones que se consideran en este estudio contra los valores experimentales de porosidad del lecho con la intención de conocer la tendencia de los datos experimentales contra la forma matemática que pretende representarlos. Después se presentan las gráficas de comparación del valor experimental contra el valor teórico y los valores del porcentaje de error para las ecuaciones consideradas. Finalmente, se considerarán las ecuaciones que resulten con el menor porcentaje de error para el cálculo de la porosidad del lecho.

5.6.1. Función de Porosidad de Wen y Yu.

Como se puede observar en la figura 5.11, se trata de una función exponencial que con los números de Reynolds y Arquímedes ajusta la tendencia de los datos experimentales en general, con una ligera subestimación para los valores de partículas con biocapa entre 0.6 y 0.73 de grado de porosidad del lecho. En este caso la explicación se puede atribuir a que la ecuación de Wen y Yu considera que, para el régimen laminar, la fuerza de arrastre que se ejerce sobre una partícula esférica está dada por la Ley de Stokes. Como se sabe esta ley se dedujo para partículas rígidas inertes; y el comportamiento de una partícula con biocapa no se comporta necesariamente como una partícula rígida. Aún así la desviación es pequeña y valdría la pena corroborar su aplicación para espesores de biopelícula más grandes.

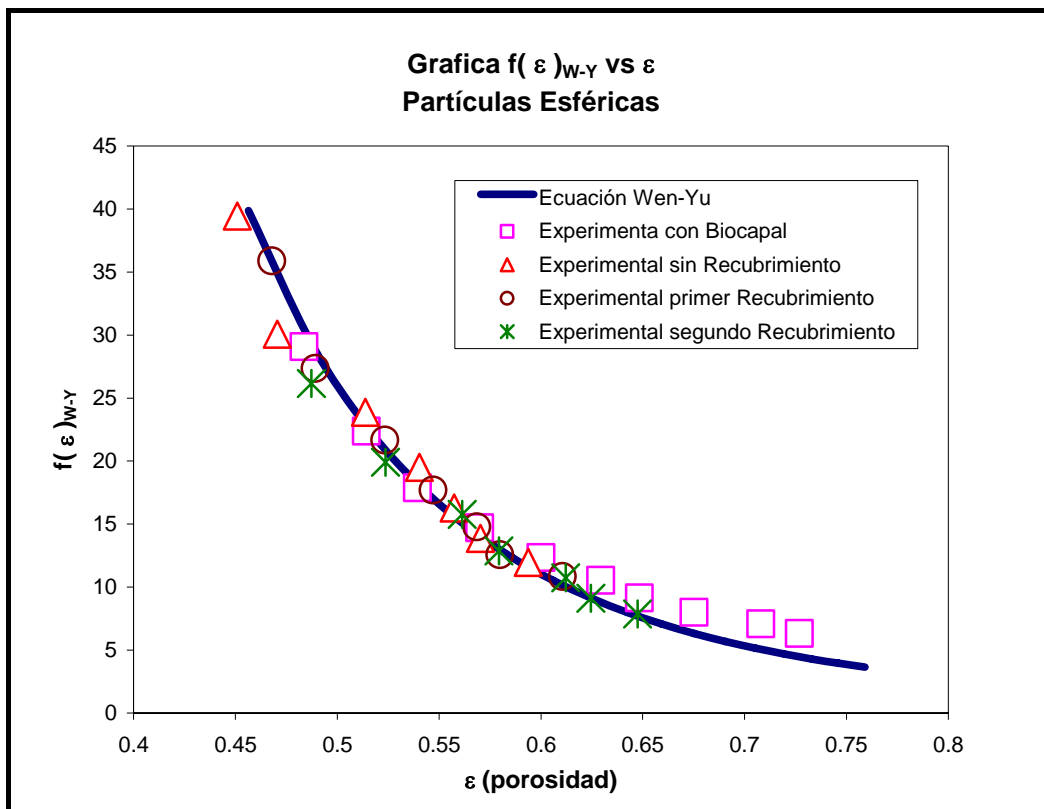


Figura 5.11. Gráfica $f(\epsilon)$ usando la ecuación de Wen y Yu contra ϵ con Película Sintética y Biocapa

5.6.2. Función de Porosidad de Riba y Couderc.

En la gráfica de la figura 5.12 se observa que la función de porosidad de la ecuación de Riba y Couderc ajusta bien los valores experimentales para partículas con biocapa, pero no así para los valores de porosidad del lecho para partículas sin película y con película inerte, ya que la curva se presenta ligeramente arriba, una vez más se corrobora que las variables consideradas son las pertinentes; y que son aplicables para flujo inverso las ecuaciones desarrolladas con flujo tradicional. En este caso la explicación a las desviaciones se puede atribuir a que la ecuación de Riba y Couderc considera un término relativo al coeficiente de arrastre de partículas rígidas en régimen laminar.

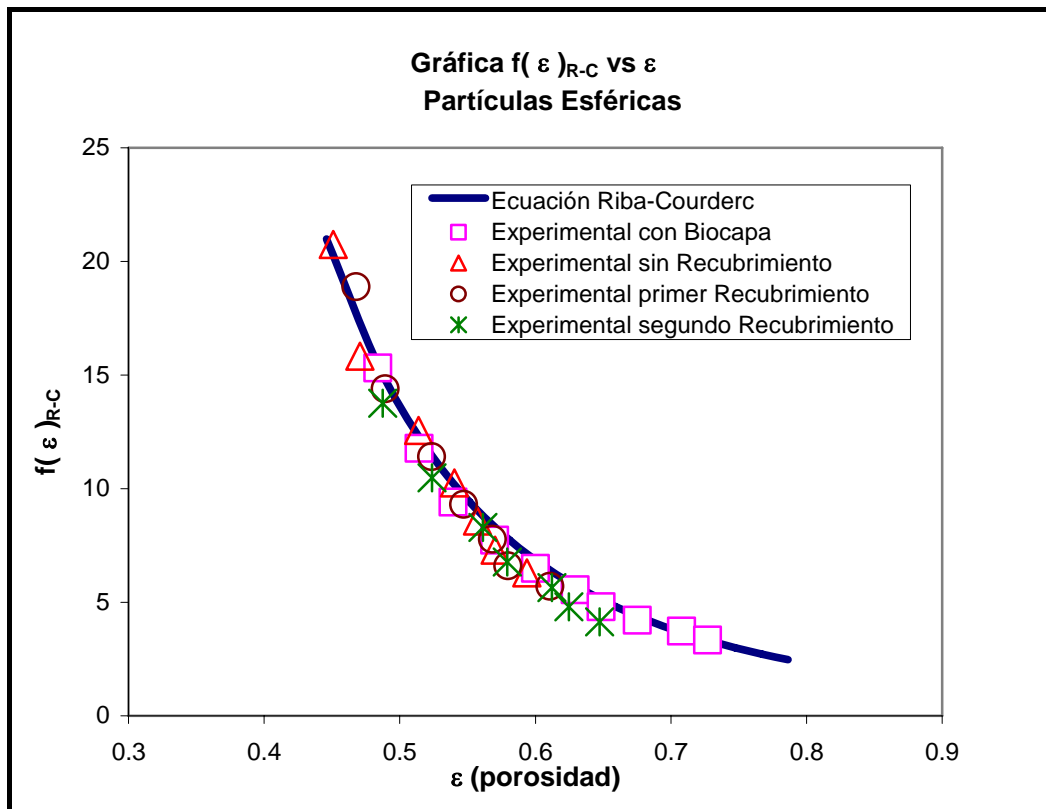


Figura 5.12. Gráfica $f(\varepsilon)$ usando la ecuación de Riba y Couderc contra ε con Película Sintética y Biocapa

5.6.3. Función de Porosidad de Ramamurthy-Subbaraju.

En la gráfica 5.13 se observa que la tendencia de los valores experimentales sigue siendo bien representada por una función exponencial de la porosidad del lecho, aunque en este caso la curva teórica cruza la tendencia de los valores experimentales, lo que nos indica que algún término de la función de porosidad hace cambiar la dirección de la curva. Esto se puede atribuir a que la principal suposición de la ecuación de Ramamurthy-Subbaraju es que las partículas están acomodadas en un nodo virtual de arreglo cúbico; sin embargo, es de resaltar que aunque fue desarrollada en columnas anulares de flujo tradicional, se puede aplicar con desviaciones aceptables, para estimar porosidades de lechos operados a flujo inverso.

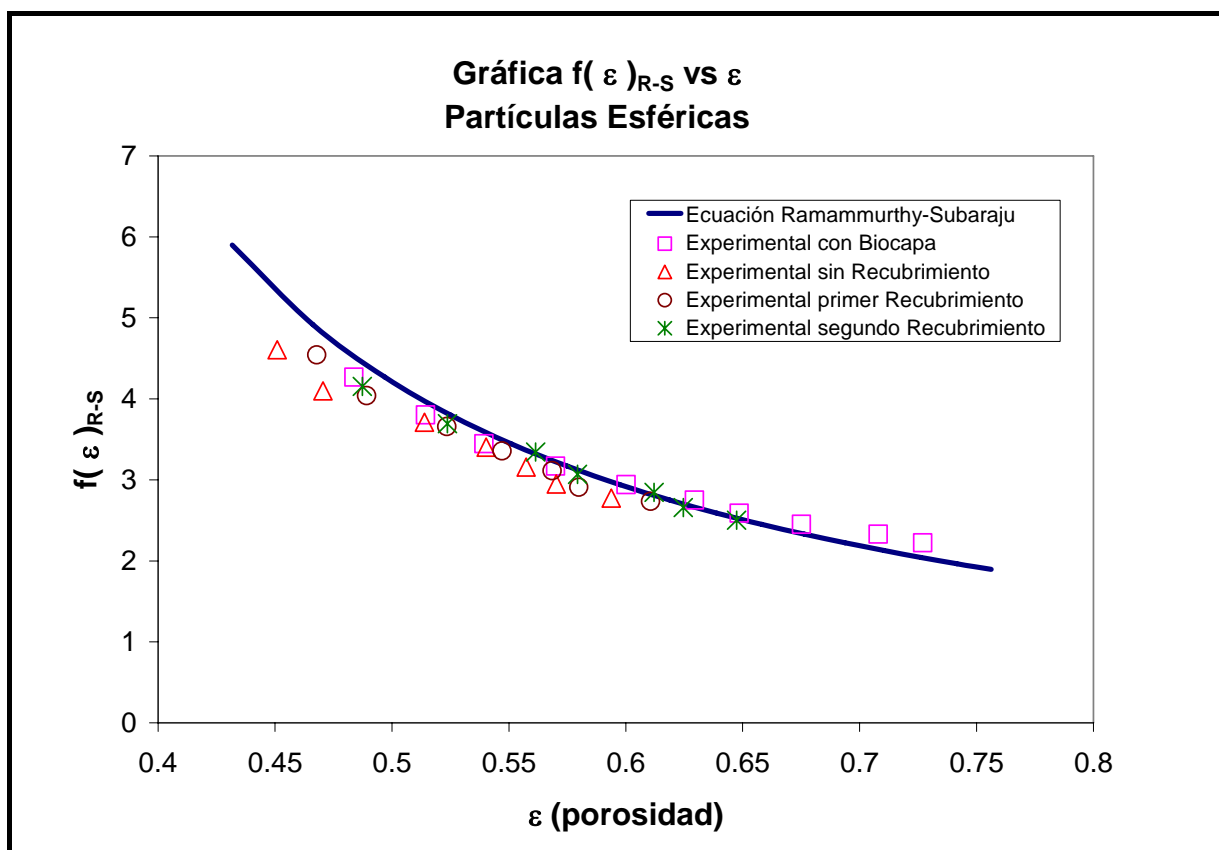


Figura 5.13. Gráfica $f(\epsilon)$ contra ϵ usando la ecuación de Ramamurthy-Subbaraju con Película Sintética y Biocapa

5.6.4. Función de Porosidad de Richardson y Zaki

En la figura 5.14 se observa que la función como una función exponencial de Richardson y Zaki si ajusta la tendencia pero no representa los valores experimentales de porosidad del lecho. Es de notar que en algunos casos, los valores experimentales se presentan alineados como una recta y los valores teóricos de la función de porosidad están alejados de los valores experimentales, pero ordenados por tamaño del diámetro.

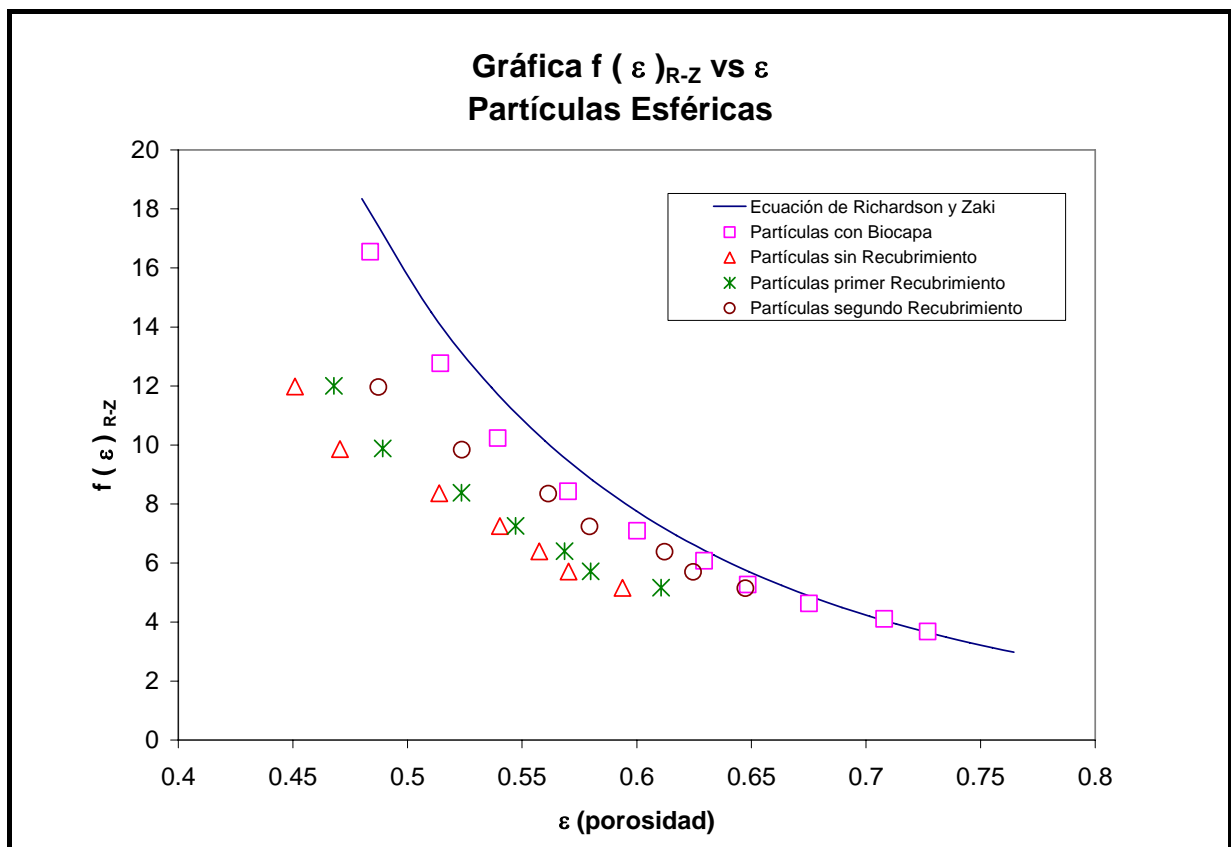


Figura 5.14. Gráfica $f(\epsilon)$ contra ϵ usando la ecuación Richardson y Zaki con Película Sintética y Biocapa

5.6.5. Función de Porosidad de Setiadi

En la figura 5.15 se observa que la función propuesta por Tjandra Setiadi cruza la tendencia de los valores experimentales de porosidad de lecho para partículas con biocapa, lo que permite inferir que la función considera las variables adecuadas para representar la porosidad del lecho con este tipo de partículas, aunque la forma matemática en que están correlacionadas no es la adecuada. Por otro lado, se observa como los valores de porosidad para partículas inertes se aleja notoriamente de los valores teóricos de la función de porosidad de Setiadi. Una observación adicional es que las tendencias de los valores experimentales se presentan como rectas para la función de porosidad, lo que no coincide con la función exponencial que proponen otros autores.

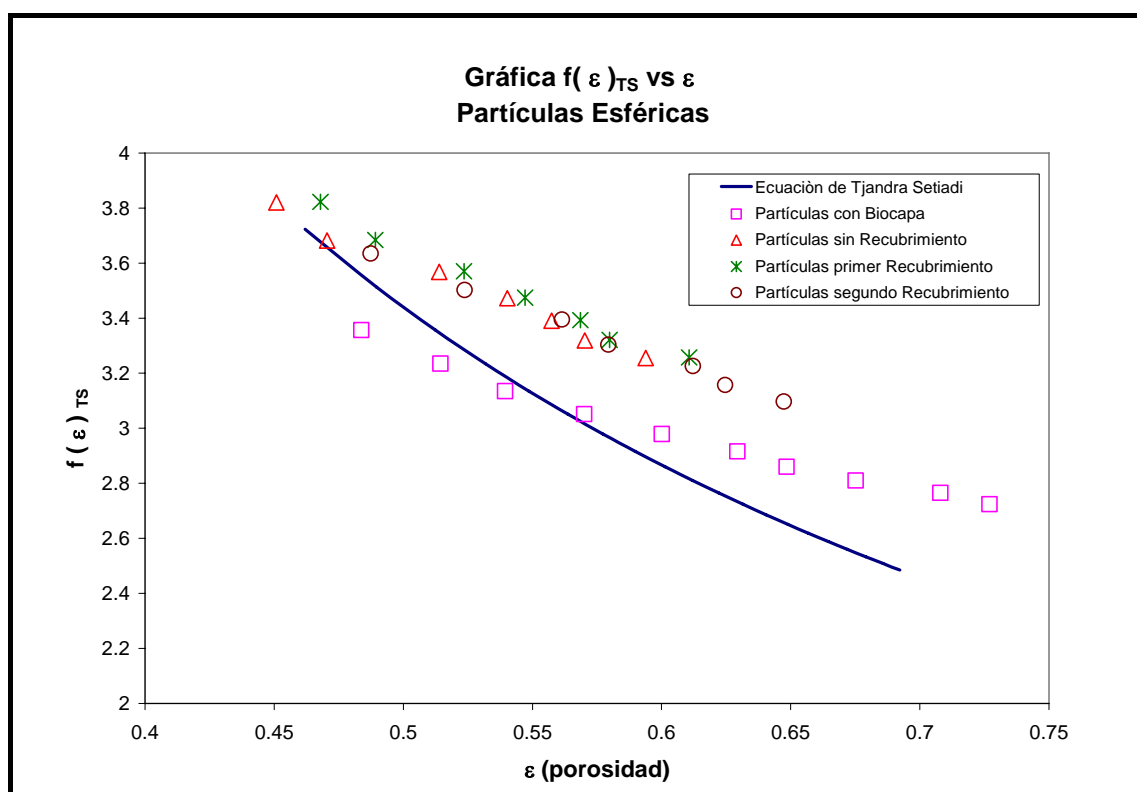


Figura 5.15. Gráfica $f(\epsilon)$ contra ϵ usando la ecuación Tjandra Setiadi con Película Sintética y Biocapa

5.6.6. Función de Porosidad de Campos Díaz-Limas Ballesteros.

En la gráfica de la figura 5.16 se observa que la función de porosidad sí representa la tendencia de los valores experimentales de porosidad del lecho. Los datos de porosidad de lecho para partículas con biocapa son bien representados por esta función en el intervalo de porosidad de 0.47 a 0.73. Para partículas sin recubrimiento la tendencia de los datos sólo es representada en un intervalo pequeño de porosidad de 0.55 a 0.6, presentando una ligera subestimación para valores menores de 0.55. Para las partículas con capa inerte la representación de los datos presenta una subestimación de la tendencia que se incrementa para valores cercanos a 0.45. Las desviaciones observadas se pueden atribuir a que la extensión se hizo considerando pocos datos experimentales en el intervalo de operación de Reynolds menores a 200, sin embargo la desviación estándar que se obtiene, en combinación con su posibilidad de aplicarse para partículas no esféricas da una potencialidad mayor a esta ecuación.

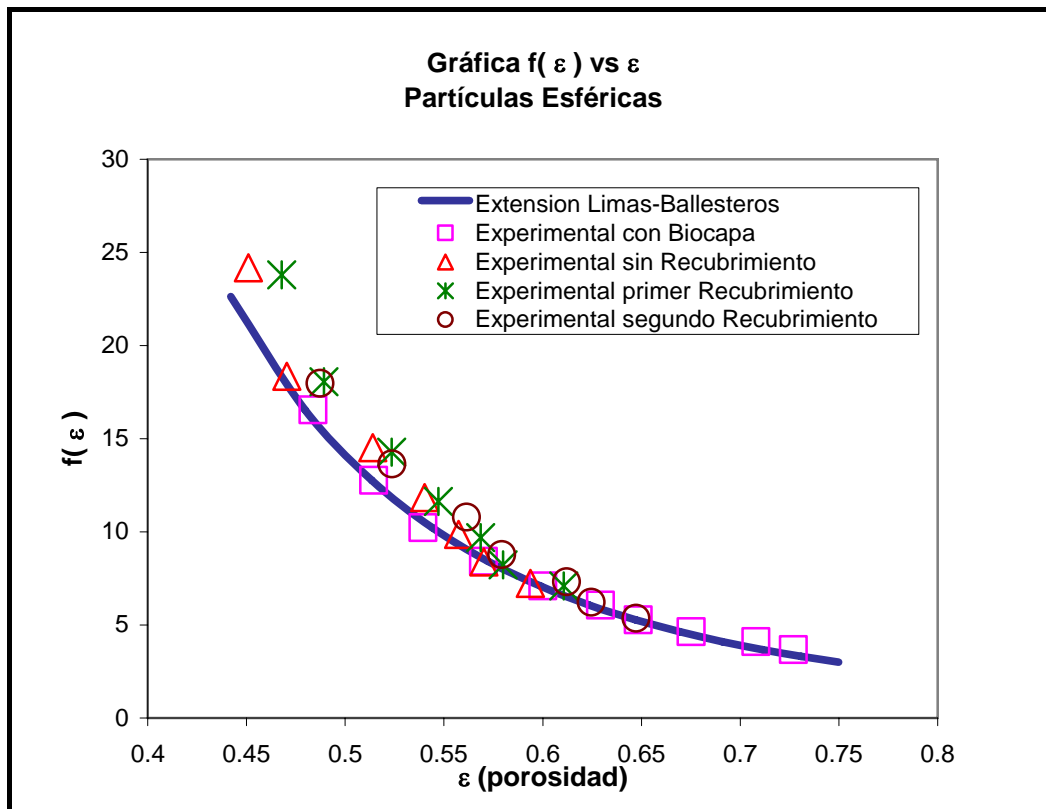


Figura 5.16. Gráfica $f(\epsilon)$ contra ϵ usando la ecuación de Campos Díaz-Limas Ballesteros con Película Sintética y Biocapa

5.7. Cálculo de los Porcentajes de Error de las Ecuaciones Consideradas.

5.7.1. Porcentaje de Error de la Ecuación de Wen y Yu.

La figura 5.17 presenta la comparación gráfica de los valores experimentales y los valores teóricos de la porosidad del lecho para la ecuación de Wen y Yu. Como se observa, en este caso la ecuación teórica hace una ligera sobre estimación de los valores experimentales para partículas con biocapa, para valores de porosidad de lecho superiores a 0.6. Para las demás partículas la estimación de la porosidad es muy buena aunque con una pequeña desviación cercana a los valores de porosidad mínima de fluidización, que están entre 0.45 y 0.5. El porcentaje de error para todos los valores es de 2.6 %.

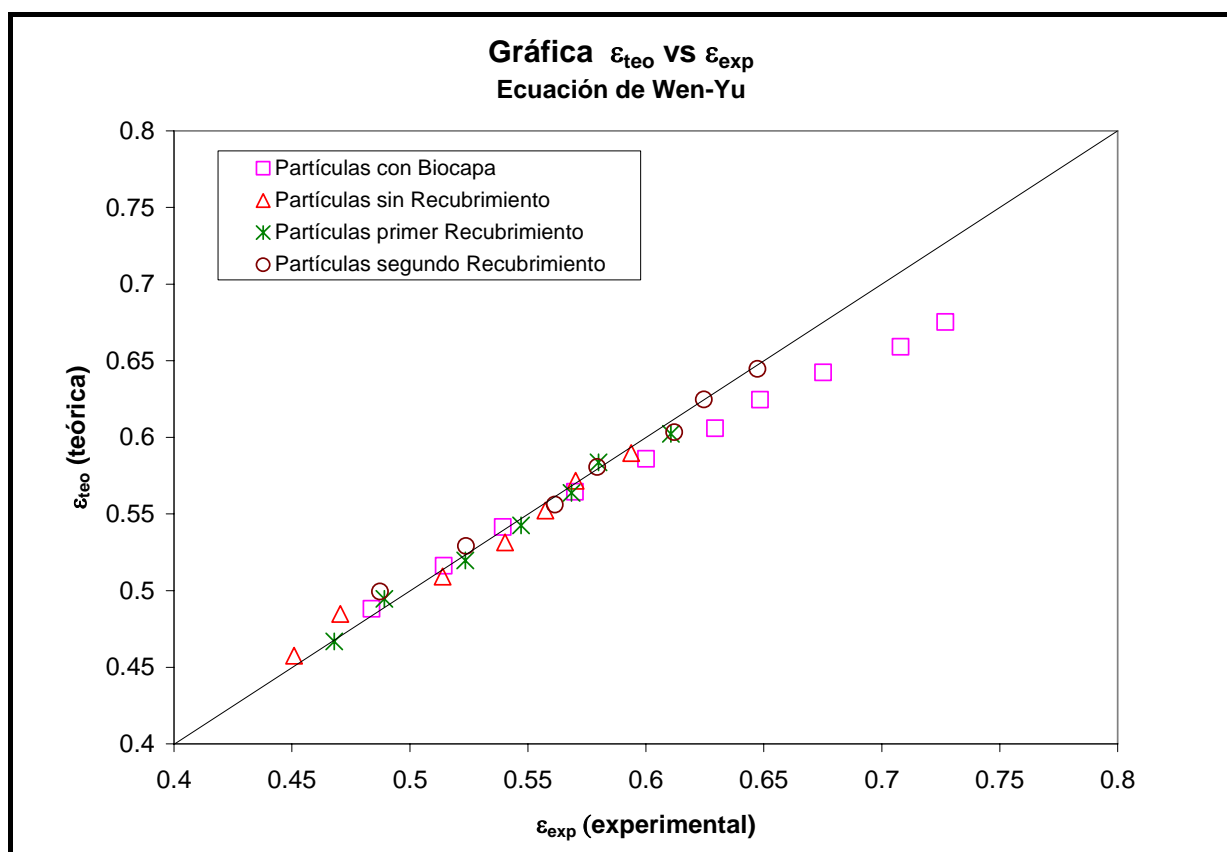


Figura 5.17. Gráfica de ϵ teórica contra ϵ experimental usando la ecuación de Wen y Yu con Película Sintética y Biocapa

5.7.2. Porcentaje de Error de la Ecuación de Riba y Couderc.

En la figura 5.10, se observa que en este caso los valores teóricos de la ecuación subestiman todos los valores experimentales entre 0.55 y 0.65 para partículas con y sin capa inerte. Para el caso de las partículas con biopelícula se puede decir que las estimaciones de porosidad son muy cercanas a las experimentales, con diferencias menores al 1 %. El valor de la desviación estándar es de 2.38 %

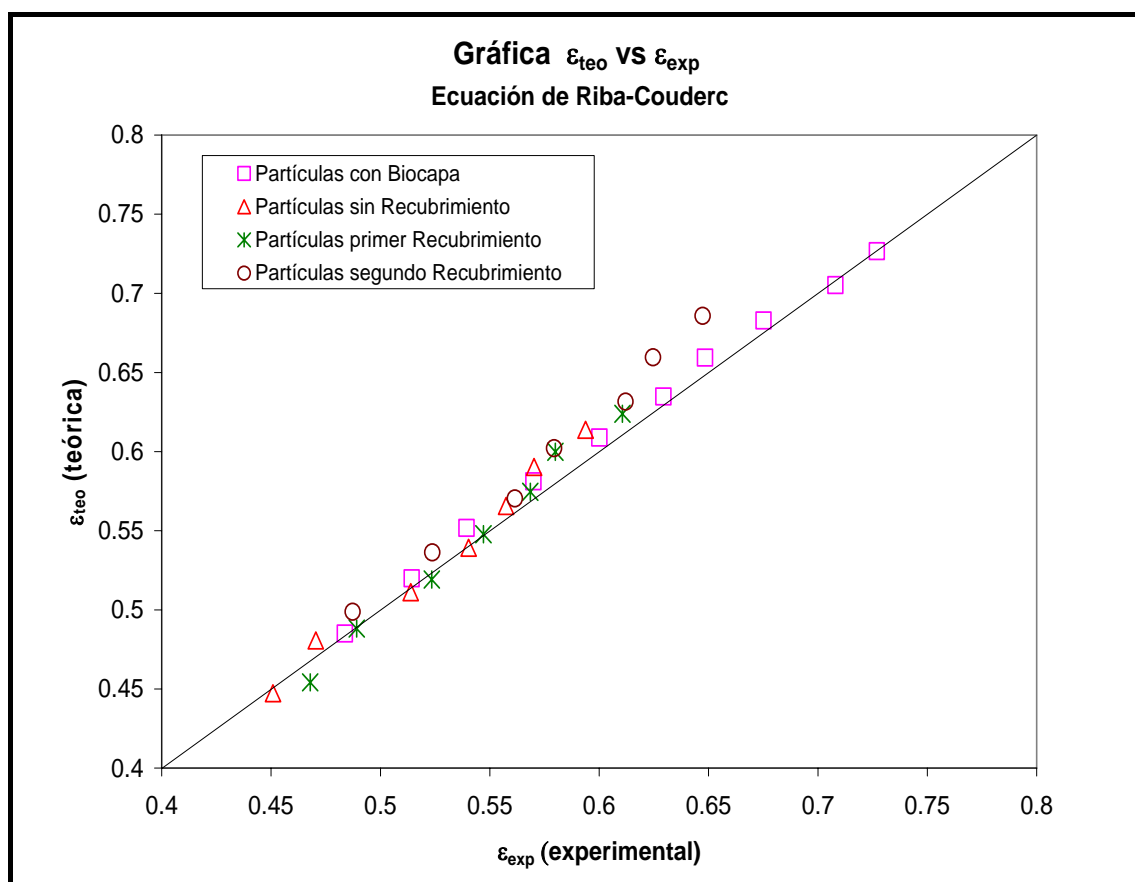


Figura 5.18. Gráfica de ϵ teórica contra ϵ experimental usando la ecuación de Riba y Couderc con Película Sintética y Biocapa

5.7.3. Porcentaje de Error de la Ecuación de Ramamurthy y Subbaraju.

En la figura 5.19, se observa que la ecuación propuesta por estos autores subestima los valores de la porosidad del lecho para todas las partículas excepto para las partículas sin recubrimiento. El porcentaje de error es de 4.51%

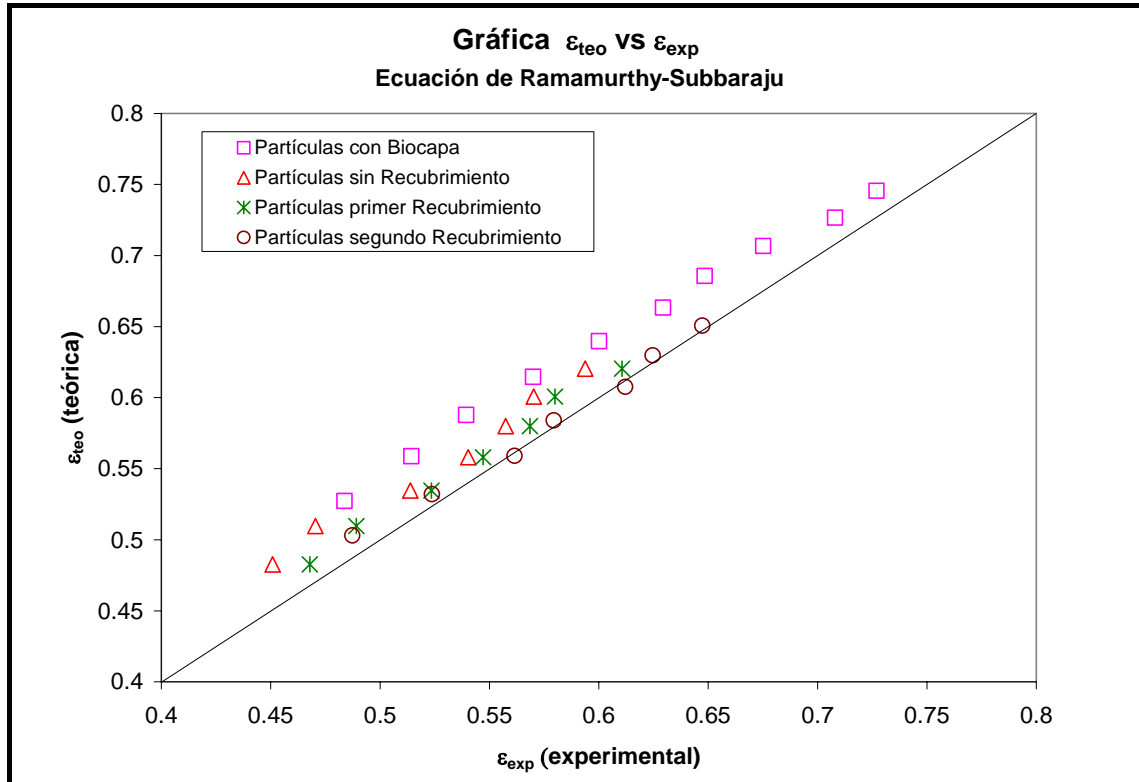


Figura 5.19. Gráfica de ϵ teórica contra ϵ experimental usando la ecuación de Ramamurthy y Subbaraju con Película Sintética y Biocapa

5.7.4. Porcentaje de Error de la Ecuación de Richardson y Zaki.

En la figura 5.11 se observa que la ecuación propuesta por estos autores subestima los valores de la porosidad del lecho para todas las partículas excepto para las partículas con biocapa, para las que presenta una sobreestimación de valores a partir de porosidades de 0.6, y subestimaciones por debajo de ese valor. El porcentaje de error es de 9.2 %

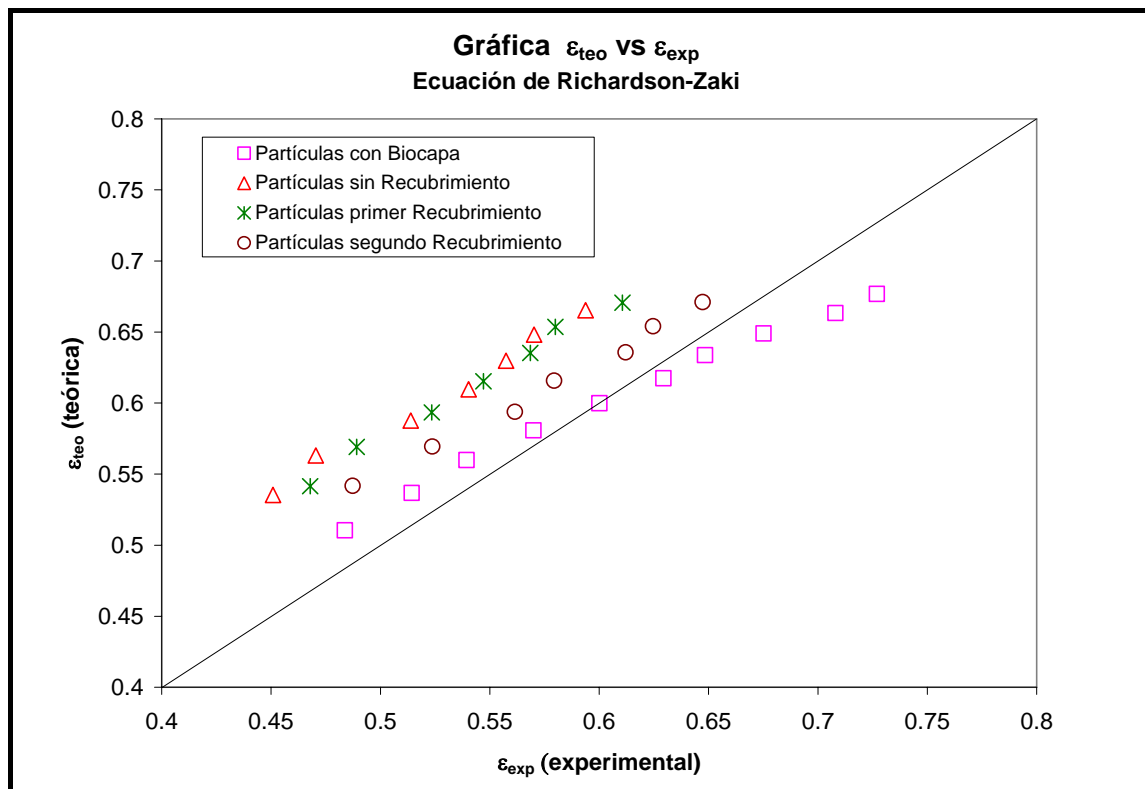


Figura 5.20. Gráfica de ϵ teórica contra ϵ experimental usando la ecuación de Richardson y Zaki con Película Sintética y Biocapa

5.7.5. Porcentaje de Error de la Ecuación de Tjandra Setiadi.

De la observación de la gráfica resulta evidente que la correlación no es la adecuada para representar los valores experimentales. La alineación de los datos permite inferir que efectivamente, los datos tienen una clara separación entre los que son de partículas inertes y los que tienen biocapa. El porcentaje de error es de 9.73 %

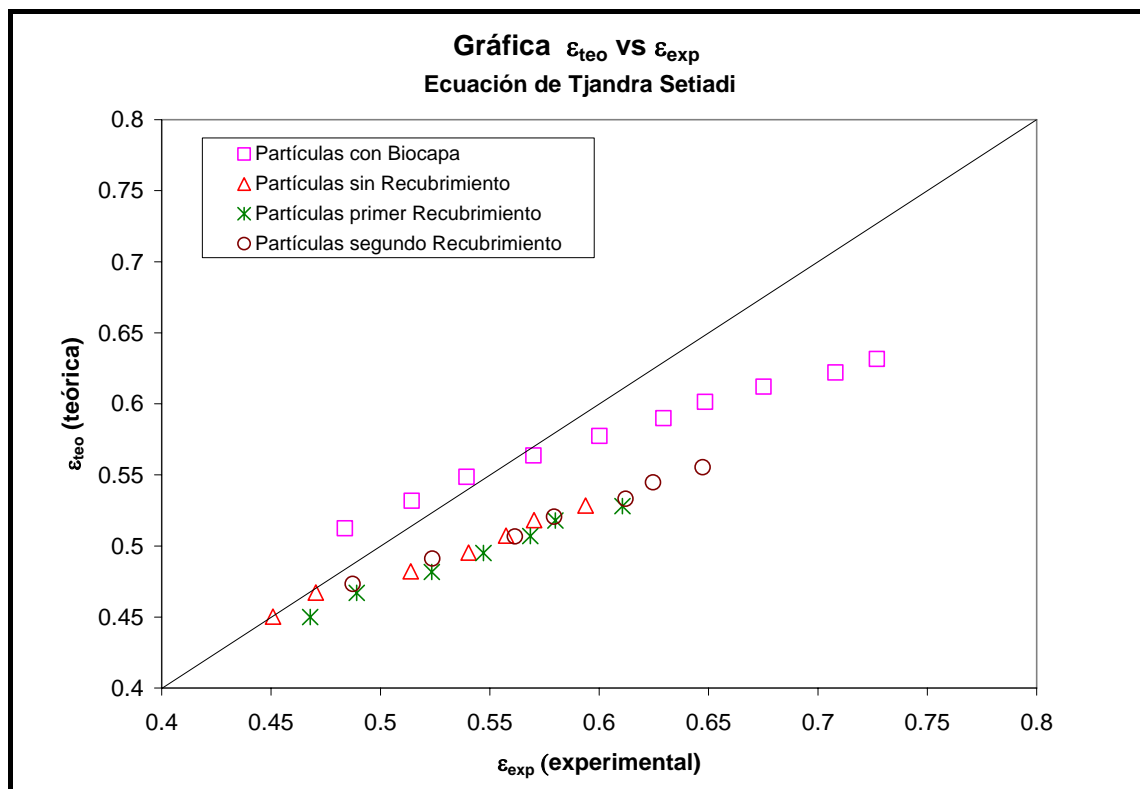


Figura 5.21. Gráfica de ϵ teórica contra ϵ experimental usando la ecuación de Tjandra Setiadi con Película Sintética y Biocapa

5.7.6. Porcentaje de Error de la Ecuación Campos Díaz – Limas Ballesteros.

En la figura 5.22, se observa que la ecuación propuesta en este trabajo representa muy bien los valores experimentales de porosidad de lecho para partículas con biocapa y sobreestima la porosidad para las partículas con y sin recubrimiento inerte, obteniéndose una desviación estándar global de 3.98 %.

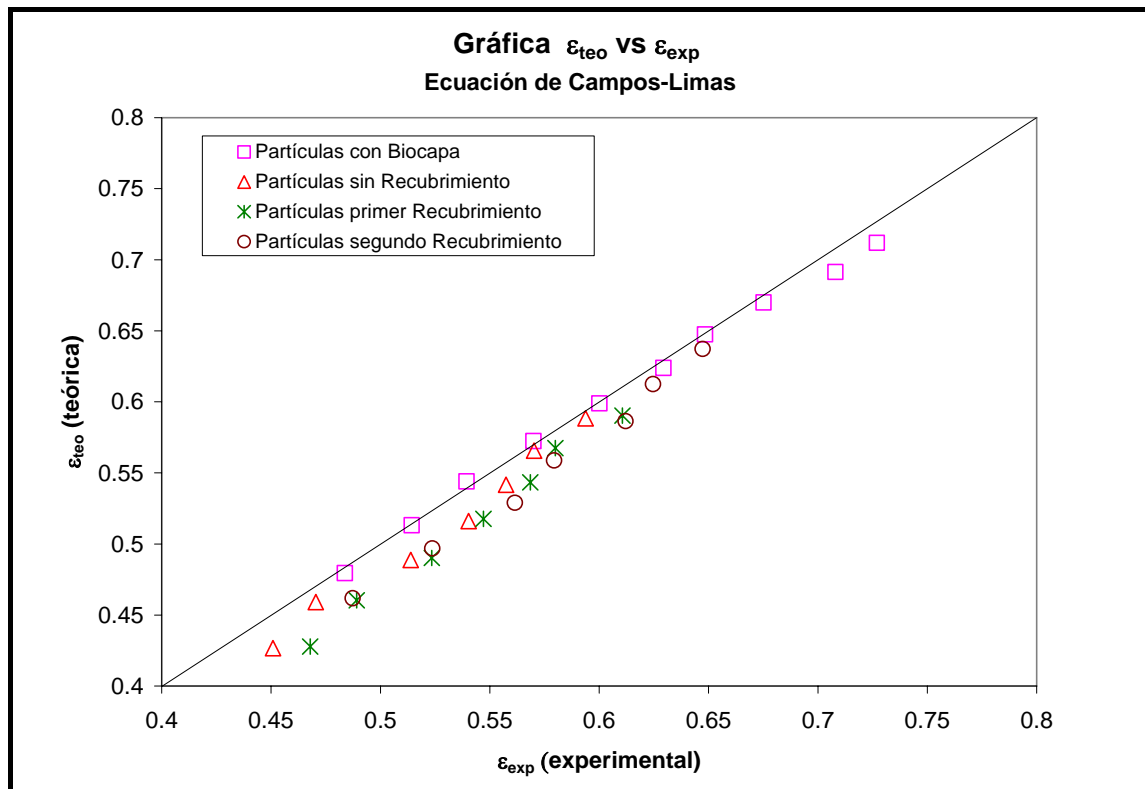


Figura 5.22. Gráfica de ϵ teórica contra ϵ experimental usando la ecuación de Campos Díaz - Limas Ballesteros con Película Sintética y Biocapa

5.8. Cálculo de la Porosidad del Lecho en Función del Tiempo.

Con los datos de la tabla 5.5, la extensión de la ecuación de Campos Díaz - Limas-Ballesteros y la correlación que presentó menor desviación estándar del análisis del inciso 5.7, se hizo el cálculo de la porosidad del lecho a diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. Valores para el cálculo de la porosidad del lecho en función del tiempo

t (h)	H (m)	v(cm/s)	Re	Ar	ϵ_{exp}	ϵ_{R-C}	ϵ_{CD-LB}
24	0.237	1.28	31.39	33586.19	0.4998	0.5169	0.5109
32	0.237	1.28	31.46	33821.13	0.4961	0.5164	0.5105
34	0.237	1.28	31.48	33880.03	0.4952	0.5163	0.5103
46	0.242	1.28	31.59	34234.90	0.5005	0.5156	0.5096
56	0.243	1.28	31.68	34532.51	0.4983	0.5149	0.5089
74	0.243	1.28	31.85	35072.54	0.4904	0.5138	0.5079
77	0.258	1.28	31.88	35163.09	0.5187	0.5136	0.5077
98	0.26	1.79	44.89	35801.30	0.5138	0.5828	0.5743
124	0.265	1.79	45.23	36602.11	0.5123	0.5811	0.5726
168	0.273	1.79	45.79	37984.37	0.5087	0.5781	0.5697

La desviación estándar obtenida para la ecuación de Campos Díaz-Limas Ballesteros es: 6.18%

La desviación estándar obtenida para la ecuación de Riba-Couderc es: 7.14%

De esta forma se puede calcular la porosidad del lecho de partículas con biocapa en fluidización sólido-líquido a flujo inverso con la ecuación 3.19 y con la correlación matemática de Campos Díaz-Limas Ballesteros.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se puede concluir que:

1. Los resultados demuestran que el enfoque del balance de fuerzas que inciden sobre una partícula como la fuerza de gravedad, la fuerza de flotación y la de arrastre aplicadas a las correlaciones matemáticas ya publicados en la literatura utilizadas para predecir la expansión de un lecho fluidizado sólido-líquido a flujo tradicional (de abajo hacia arriba), también se pueden usar para estimar la porosidad de un lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso (de arriba hacia abajo).
2. Los bajos valores de porcentaje de error entre los valores teóricos y experimentales de porosidad del lecho, obtenidos con las ecuaciones de Riba et al., Wen y Yu, Limas et al., confirman que, considerando una relación mayor de 10 entre el diámetro de la columna y el diámetro de la partícula, no es necesario incluir un termino adicional que considere los efectos de la pared de la columna como afirman algunos autores.
3. La ecuación de Wen y Yu, representan con una menor desviación estándar la expansión del lecho fluidizado sólido líquido a flujo inverso de los datos experimentales obtenidos para una película sintética.
4. Haciendo la comparación de todos los experimentos realizados en este trabajo se puede concluir que la correlación que representa mejor la fluidización inversa en dos fases (sólido-líquido), para partículas esféricas es la de Riba y Couderc ya que presenta una desviación estándar menor.

5. El modelo obtenido por Campos Díaz-Limas Ballesteros para representar la expansión del lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso, representa con una menor desviación estándar la expansión del lecho fluidizado sólido líquido a flujo inverso para las partículas esféricas con biocapa que las correlaciones publicadas en la literatura.
6. Es posible obtener una capa biológica adherida a un soporte inerte en un lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso.
7. No se presentó acumulación, ni obstrucción por la presencia de biomasa en el lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso, lo cual representa una ventaja ya que los tiempos muertos por mantenimiento del equipo se minimizan.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar experimentos con números de Reynolds mayores que se encuentren en el intervalo de 200 a 6000 y probar que la ecuación de Limas-Ballesteros representa con menor desviación estándar la expansión del lecho.
- ✓ Estudiar el fenómeno de difusión de sustrato que se lleva desde el fluido de trabajo hasta el interior del soporte en un reactor de lecho fluidizado sólido-líquido a flujo inverso.
- ✓ Estudiar la morfología de los microorganismos e identificación de los mismos en la superficie y en el interior del soporte.
- ✓ Determinar el número de capas que conforman la biopelícula.
- ✓ Identificar los productos que se obtienen con este microorganismo y su uso a nivel industrial.
- ✓ Estudiar el efecto que tiene el gas dentro del lecho, la forma en la cual se puede recuperar y su uso.
- ✓ Realizar experimentos con el mismo microorganismo y con soportes de diferentes materiales y formas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DIBOUNI, M. R., GARSIDE, J. (1979), Particle Mixing and Classification in Liquid Fluidised beds, *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, Vol. 57, p. 94-103.

BIGNAMI, L., ERAMO, B., GAVASCI, R., RAMADORI, R., ROLLE, E. (1991), Modelling and Experiments on Fluidized Bed Biofilm Reactors, *Wat. Sci. Tech.*, No. 7, Vol. 24; p. 47-58.

BUFFIERE, P., MOLETTA, R. (1999), The Inverse Turbulent Bed: A Novel Bioreactor for Anaerobic Treatment, *Biotech. Bioeng.*, Vol. 8; p. 673-677.

COMPTE, M. P., BASTOUL, D., HEBRARD, G., ROUSTAN, M. (1997), Hydrodynamics of a three-phase Fluidized Bed-The Inverse Turbulent Bed, *Chemical Engineering Science*, No. 21-22, Vol. 52; p. 3971-3977.

DAVIDSON, J. F., CLIFT, R., HARRISON, D. (1985), *Fluidization* 2nd edition; Academic Press, p. 44.

DI FELICE, R. (1995), Hydrodynamics of Liquid Fluidisation, *Chemical Engineering Science*, No. 8, Vol. 50; p. 1213-1245.

DIEZ, B. V., GARCIA, E. P., FERNÁNDEZ, P. F. (1995), Effects of Biofilm Growth Gas and Liquid Velocities on the Expansion of an Anaerobic Fluidized Bed Reactor (AFBR), *Elsevier Science*, No. 59, p. 1649-1654.

DION, N., BOYAVAL, P. (1988), Milk Protein Hydrolysis in a Inverse Fluidized Bed Biofilm Reactor with *L. helveticus* Cells Immobilized in Polystyrene Balls. *Abstr. Int. Biotechnol. Symp. Paris, France*, 271 (July 17-22).

EHLINGER, F., ESCOFFIER, Y., COUDERC, J. P., LEYRIS, J.P., MOLETTA, R. (1994), Development of an Automatic Control System for Monitoring an Anaerobic Fluidized Bed, *Wat. Sci. Tech.*, No. 10-11, Vol. 29; p. 289-295.

ENDO, L. T., NAGAMUNE, K. T., KOBAYASHI, T. (1988), Fluidized Bed Bioreactor: Antibiotic Production. *Abstr. Int. Biotechnol. Symp. Paris, France*, Vol. 37; p. 17-22.

FAN, L. S., MUROYAMA, K. (1982), Hydrodynamic Characteristics of Inverse Fluidization in Liquid-Solid and Gas-Liquid-Solid Systems, *The Chem. Eng. Journal*, Vol. 24; p. 143-150.

FOUDA, E. A., CAPES, E. C., (1977), Hydrodynamic Particle Volume and Fluidized Bed Expansion, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 55; p. 386-391.

GARCIA, B. D., BUFFIERE, P. (1998), Application of the Down-Flow Fluidized Bed to the Anaerobic Treatment of Wine Distillery Wastewater, *Wat. Sci Tech.*, Vol. 38; p. 393-399.

- GARCIA, C. D., BUFFIERE, P. (1998), Anaerobic Digestion of Wine Distillery Wastewater in Down-Flow Fluidized Bed, Elsevier Science, Vol. 38; p. 3593-3600.
- GARSDALE, J., AL-DIBOUNI, M. R. (1977), Velocity-Voidage Relationships for Fluidization and Sedimentation in Solid-Liquid Systems, Ind. Engng. Chem. Process Des. Dev., Vol. 16, p. 206-213.
- HARTMAN, M., TRNKA, D., HAVLIN, V. (1992), A Relationship to Estimate the Porosity in Liquid-Solid Fluidized Beds. Chemical Engineering Science, No. 12, Vol. 47; p. 3162-3166.
- HENK, J. B., HENNY, C. M. (2006), Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. Clinical Microbiology Reviews, No. 1, Vol. 19; p. 127-141.
- HOLLADAY, D. W., et al. (1978), Biodegradation of Phenolic Waste Liquors in Stirred Tank, Columnar and Fluidized Bed Bioreactors. AIChE Symp. Ser., Vol. 74; p. 241.
- HYUN, LEE D. (2001), Transition Velocity and Bed Expansion of Two-Phase (Liquid-Solid) Fluidization System, Korean J. Chem. Eng., p. 347-350.
- IMAI, T., KUSUDA T., FURUMAI, H. (1994), Kinetic Study and Mathematical Modeling of Biofilm in a Anaerobic Fluidized Bed., Wat. Sci. Tech., No. 10-11; p. 369-376.
- IZA, J. (1991), Fluidized Bed Reactors for Anaerobic Wastewater Treatment, Wat. Sci. Tech., No. 8, Vol. 24; p. 109-132.
- JERIS, J. S., OWENS, R. W., FLOOD, F. (1981), Secondary Treatment Municipal Wastewater with Fluidized Bed Technology. Biological Fluidized Bed Treatment of Water and Wastewater, P. F. Cooper and B. Atkinson, Eds., 112, E. Horwood, Chichester, U. K.
- JEWELL, W. J., SWITZENBAUM, M. S., MORRIS, J. W. (1981), Municipal Wastewater Treatment with the Anaerobic Attached Microbial Film Expanded Bed Process. J. Water Poll. Control Fed., Vol. 53; p. 482.
- KARAMANEV, D. G., NIKOLOV, L. N. (1992), Bed Expansion of Liquid-Solid Inverse Fluidization, AIChE J., Vol.38; p. 1916-1922.
- KUBA, T., KUSUDA, T. (1990), A Kinetic Study on Methanogenesis by Attached Biomass in a Fluidized Bed, Wat. Res., Vol.24; p. 1365-1372.
- KUNII, D., LEVENSPIEL, O. (1991), Fluidization Engineering, Wiley, New York; Second Edition; Butterworth-Heinemann, p.1-15, 57-58, 64.
- LIMAS, B. R., RIBA, J. P. (1982), Expansion de Couches de Particules non Sphériques Fluidisées par un Liquide, ENTROPIE, Vol. 106; p. 37-45.

LIVINGSTON, A. G., CHASE, A. H. (1989), Modelling Phenol Degradation in a Fluidized Bed Bioreactor. *AIChE J.*, Vol. 35; p. 1980.

GOMES, M. P. A., MALCATA, X, F. (1999), *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, Biochemical, Technological and Therapeutical Properties Relevant for use as Probiotics, *Trends in Food Science and Technology*, No. 10; p. 139-157.

MARÍN, P., ALKALAY, D., GUERRERO, L., CHAMY, R., SCHIAPPACASSE C. M. (1999), Design and Startup of an Anaerobic Fluidized Bed Reactor, *Wat. Sci. Tech.*, No. 8; Vol. 40; p. 63-70.

MILLER, L. G. (1959), Use Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analitical Chemistry*, No. 3, Vol. 31; p. 426-428.

MULCAHY, T. L., SHIEH, K. W. (1987), Fluidization y Reactor Biomass Characteristics of the Denitrification Fluidized Bed Biofilm Reactor, *Wat. Res.*, No. 4, Vol. 21; p. 451-458.

MULCAHY, T. L., SHIEH, K. W., LAMOTTA, J. E. (1981), Simplified Mathematical Models for a Fluidized Bed Biofilm Reactor, *AIChE Symposium Series*, p. 273-285.

MUROYAMA, K., FAN, L. S. (1985), Fundamentals of Gas-Liquid-Solid Fluidization, *AIChE J.*, No. 1, Vol. 31; p. 1-34.

NGIAN, F. K., MARTIN, R. B. W. (1980), Bed Expansion Characteristics of Liquid Fluidized Particles with Attached Microbial Growth, *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 22; p. 1843-1856.

NIKOLOV, L. N., KARAMANEV, D. G., ELENKOV, D. (1981), Biofilm Reactor with Mobile Bed, *Bulgarian Patent* 32, 910 (Sep. 21, 1981).

NIKOLOV, L. N., KARAMANEV, D. G. (1987), Experimental Study of Inverse Fluidized Bed Biofilm Reactor, *Can. J. Chem. Eng.*, Vol. 65; p. 214-216.

NIKOLOV, L. N., KARAMANEV, D. G. (1990), The Inverse Fluidized Bed Biofilm Reactor: A New Laboratory Scale Apparatus for Biofilm Research, *J. of Ferm. And Eng.*, Vol. 69; p. 265-267.

OH, D. K., HYUN, C. K., KIM, J. H., PARK, Y. H. (1988), Production of Penicillin in a Fluidized Bed Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 32; p. 569.

OZTURK, I., TURAN M., IDRIS, H. A. (1994), Scale-up and Biomass Hold-up Characteristics of Biological Fluidized Bed Reactors, *Wat. Sci. Tech.*, No. 10-11; p. 353-360.

RAMAMURTHY, K., SUBBARAJU, K. (1973), Bed Expansion Characteristics of Annular Liquid-Fluidized Beds, *Ind. Engng. Chem. Process Des. Dev.*, Vol. 12; p. 184-189.

RENGANATHAN, T., KRISHNAIAH, K. (2004), Stochastic Simulation of Hydrodynamics of a Liquid-Solid Inverse Fluidized Bed, *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 43; p. 4405-4412.

RENGANATHAN, T., KRISHNAIAH, K. (2007), Spatio-Temporal Evolution of Void Fraction in Liquid-Solid Inverse Fluidized Bed. *Chemical Engineering Science*, Vol. 62; p. 328-338.

RIBA, J. P., COUDERC, J. P. (1977), Expansion de couches fluidisées par des liquides, *Can. J. Chem. Engng.*, Vol. 55; p. 118-121.

RICHARDSON, J. F. and ZAKI, W. N. (1954), Sedimentation and Fluidization, *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, Vol. 32; p. 35-53.

SARAVANANE, R., MURTHY, S. V. D., KRISHNAIAH, K. (2001), Bioaugmentation and Anaerobic Treatment of Pharmaceutical Effluent in Fluidized Bed Reactor, *J. Environ. Sci. Health A*. 36, Vol. 6; p. 779-791.

SETIADI, T. (1995), Predicting the Bed of an Anaerobic Fluidised Bed Bioreactor, *Wat. Sci. Tech.*, No. 9, Vol. 31; p. 181-191.

SHIEN, K. W. (1980), Suggested Kinetic Model for the Fluidized-Bed Biofilm Reactor, *John Wiley & Sons*, Vol. 22; p. 667-676.

SOUZA, R. R., BRESOLIN, I. T. L., BIONI, T. L., GIMENES, M. L., DIAS-FILHO, B. P. (2004), The Performance of a Three-Phase Fluidized Bed Reactor in Treatment of Wastewater with High Organic Load, *Braz. J. Chem. Eng.*, , No.2, Vol.21; p. 2.

TANG, W. T., FAN L.-S. (1987), Steady-State Phenol Degradation in a Draft-Tube, Gas-Liquid-Solid Fluidized-Bed Bioreactor. *AIChE J.*, Vol. 33; p. 239.

THELEN, T. V., RAMIREZ, W. F., (1997), Bed Height Dynamics of Expanded Beds, *Chemical Engineering Science*, Vol. 52; p. 3333-3344.

TURAN, M., OZTURK, I. (2001), Influence of Different Bioparticles on Bed Expansion Characteristics of Anaerobic Fluidized Bed Reactors, *J. Environ. Sci. Health A*.36, Vol. 6; p.1041-1053.

VIVAS, C., JORGE, M. N. (2002), Estudio teórico de las relaciones matemáticas que presenta la hidrodinámica de un lecho fluidizado invertido. Tesis I.Q.I.- ESIQIE-IPN, México.

WANNER, O., EBERL, H. J., MORGENROTH, E., NOGUERA, D., PICIOREANU, C., RITTMANN, B. E., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. (2006), Mathematical Modeling of Biofilms, IWA Scientific and Technical Report No.18, IWA Publishing, ISBN 1843390876, p. 199.

WEN, C. Y., and FAN, L. S. (1974), Some Remarks on the Correlation of Bed Expansion in Liquid-Solid Fluidized Beds, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop.*, No. 2, Vol. 13; p. 194-197.

WEN, C. Y., and YU, Y. H. (1966), A Generalized Method for Predicting the Minimum Fluidization Velocities, *AIChE J.*, Vol. 12; p. 610-612.

WILHELM, H. R., and KAUK, M. (1948), Fluidization of Solid Particles, *Chemical Engineering Progress*, No. 3, Vol. 44; p. 201-218.

ANEXO A

Curvas de Calibración

Tabla. A.1. Datos para la Curva de Calibración del Rotámetro

Qrot (L/seg)	W (Kg)	V (L)	Qexp (L/seg)
0	0	0	0
1.577×10^{-2}	0.860	0.860	1.433×10^{-2}
1.892×10^{-2}	0.998	0.998	1.664×10^{-2}
2.207×10^{-2}	1.188	1.188	1.981×10^{-2}
2.523×10^{-2}	1.379	1.379	2.299×10^{-2}
2.838×10^{-2}	1.403	1.403	2.338×10^{-2}
3.154×10^{-2}	1.798	1.798	2.996×10^{-2}
3.469×10^{-2}	1.754	1.754	2.923×10^{-2}
3.785×10^{-2}	2.163	2.163	3.605×10^{-2}
4.100×10^{-2}	2.340	2.340	3.900×10^{-2}
4.415×10^{-2}	2.272	2.272	3.786×10^{-2}
4.731×10^{-2}	2.624	2.624	4.374×10^{-2}
5.046×10^{-2}	2.785	2.785	4.642×10^{-2}
5.362×10^{-2}	3.112	3.112	5.187×10^{-2}
5.677×10^{-2}	3.384	3.384	5.640×10^{-2}
5.992×10^{-2}	4.008	4.008	6.681×10^{-2}
6.308×10^{-2}	4.096	4.096	6.827×10^{-2}
6.939×10^{-2}	4.521	4.521	7.536×10^{-2}
7.570×10^{-2}	4.859	4.859	8.098×10^{-2}
8.200×10^{-2}	5.141	5.141	8.569×10^{-2}

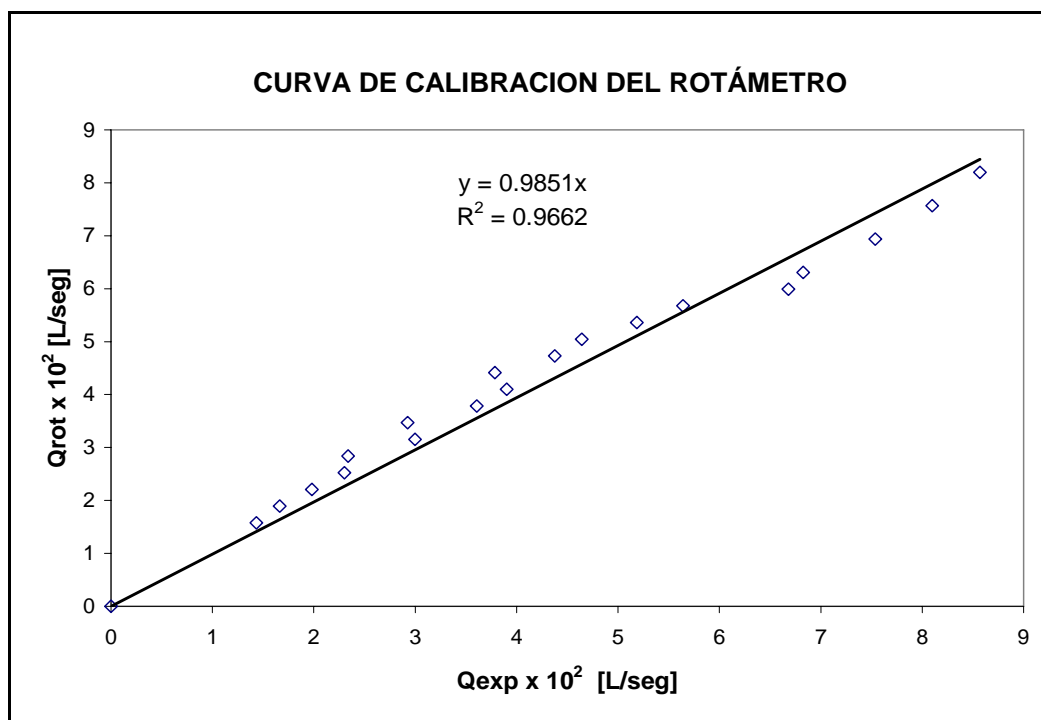


Figura A.1. Curva de Calibración del Rotámetro

Tabla A.2. Informe de Calibración de la Escala de Temperatura

Valor nominal evaluado	Desviación	Incertidumbre Expandida
(C)	(C)	(C)
-10	-0.02	± 0.03
0	-0.02	± 0.05
10	-0.01	± 0.04
20	0	± 0.03
30	0.01	± 0.03
40	0.03	± 0.04
50	0.09	± 0.04
60	0.07	± 0.04
70	0.01	± 0.03
80	-0.01	± 0.04
90	-0.01	± 0.04
100	-0.05	± 0.04

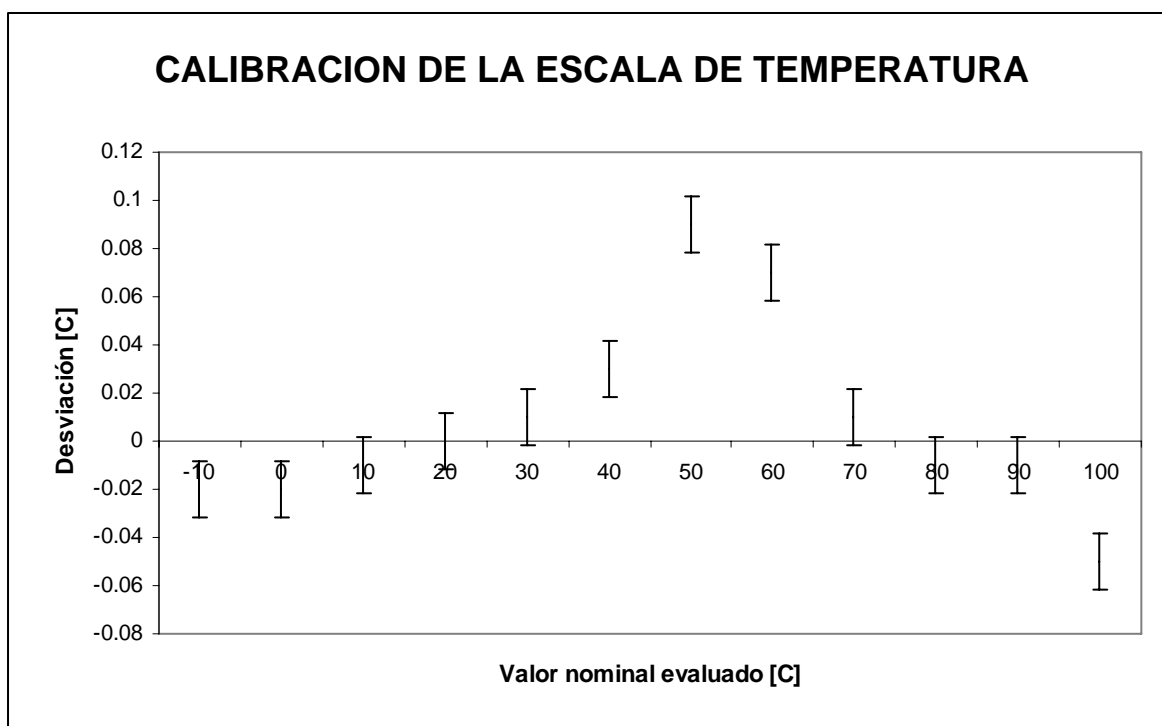
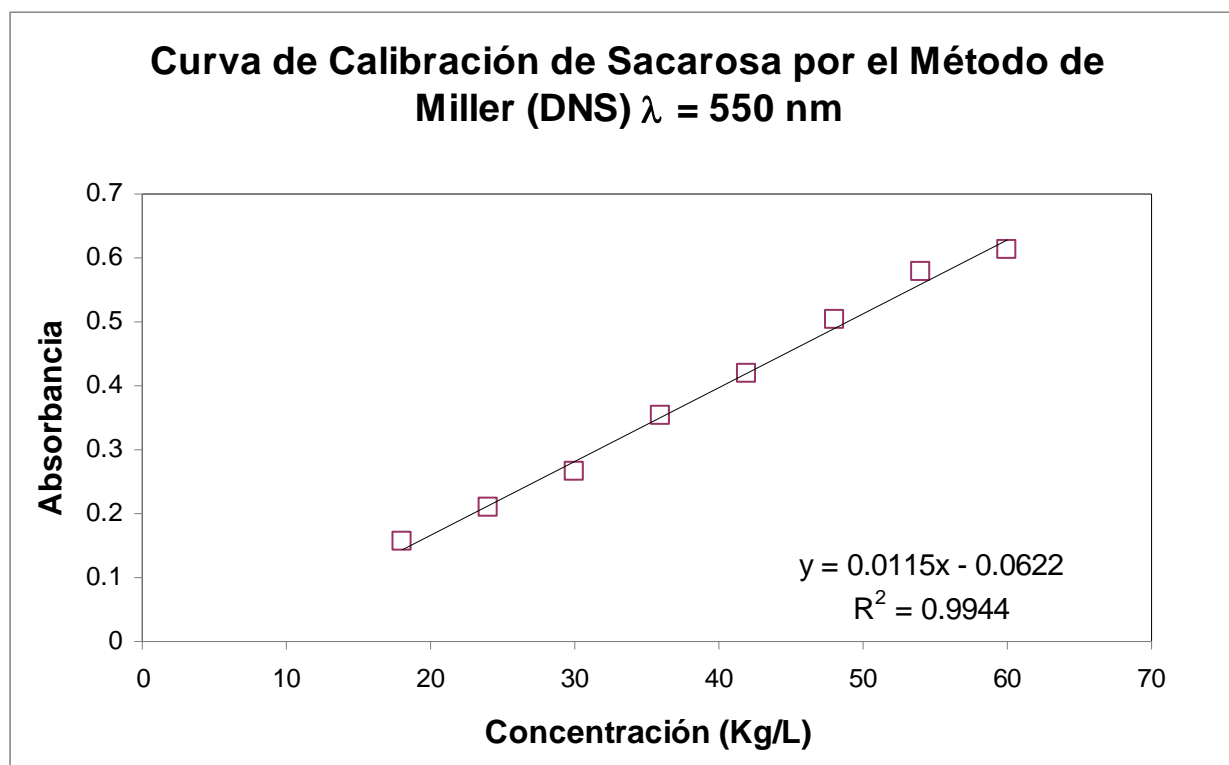


Figura A.2. Curva de Calibración de la Escala de Temperatura

Tabla A.3. Datos para la Curva de Sacarosa por el Método de Millar (DNS) $\lambda = 550 \text{ nm}$

Curva de Calibración de Sacarosa por el Método de Miller (DNS) $\lambda = 550 \text{ nm}$			
Concentración Kg/L	Blanco agua		Promedio
	Tubo1	Tubo 2	
60	0.638	0.587	0.6125
54	0.557	0.597	0.577
48	0.506	0.498	0.502
42	0.429	0.408	0.4185
36	0.352	0.353	0.3525
30	0.265	0.269	0.267
24	0.221	0.197	0.209
18	0.149	0.164	0.1565
12	0.153	0.119	0.136
6	0.079	0.065	0.072
0	0.066	0.064	0.065



**Figura A.3. Curva de Calibración de Sacarosa por el Método de Millar (DNS)
 $\lambda = 550 \text{ nm}$**

ANEXO B

Datos Wilhelm y Kwauk

Haciendo una recopilación de los experimentos realizados por Wilhelm y Kwauk (1948)^[1], los cuales trabajan con números de Reynolds menores a 200, se realizó la extensión de la ecuación de Limas-Ballesteros, los datos se muestran en las tablas B.1, B.2, B.3 y B.4.

Tabla B.1. Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros
Cuentas pequeñas de Socony en Agua.

d_p (m)	v (m/seg)	ρ_p (Kg/m ³)	Re_s	ϵ
3.28E-03	0.0188	1603	61.41	0.39
3.28E-03	0.0211	1603	68.67	0.41
3.28E-03	0.0237	1603	77.31	0.429
3.28E-03	0.027	1603	87.95	0.455
3.28E-03	0.0291	1603	94.90	0.473
3.28E-03	0.0323	1603	105.34	0.495
3.28E-03	0.0366	1603	119.25	0.52
3.28E-03	0.0384	1603	125.21	0.534
3.28E-03	0.0418	1603	136.14	0.554
3.28E-03	0.0482	1603	157.01	0.591
3.28E-03	0.0576	1603	187.82	0.642

Tabla B.2. Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros
Cuentas grandes de Socony en Agua.

d_p (m)	v (m/seg)	ρ_p (Kg/m ³)	Re_s	ϵ
4.42×10^{-3}	0.0208	1603	91.68	0.375
4.42×10^{-3}	0.0212	1603	93.02	0.378
4.42×10^{-3}	0.0218	1603	95.70	0.388
4.42×10^{-3}	0.0221	1603	97.18	0.391
4.42×10^{-3}	0.0232	1603	101.87	0.397
4.42×10^{-3}	0.0244	1603	107.50	0.407
4.42×10^{-3}	0.0259	1603	113.93	0.416
4.42×10^{-3}	0.0267	1603	117.55	0.425
4.42×10^{-3}	0.0276	1603	121.57	0.43
4.42×10^{-3}	0.0303	1603	133.10	0.45
4.42×10^{-3}	0.0335	1603	147.44	0.467
4.42×10^{-3}	0.0354	1603	155.49	0.48
4.42×10^{-3}	0.0378	1603	166.21	0.495
4.42×10^{-3}	0.0408	1603	179.61	0.51
4.42×10^{-3}	0.0451	1603	198.38	0.536

Tabla B.3. Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros
Cuentas de Vidrio No.7

d_p (m)	v (m/seg)	ρ_p (Kg/m ³)	Re_s	ϵ
5.11×10^{-4}	0.0124	2492	6.32	0.609
5.11×10^{-4}	0.0156	2492	7.94	0.655
5.11×10^{-4}	0.0196	2492	9.94	0.712
5.11×10^{-4}	0.0239	2492	12.15	0.766
5.11×10^{-4}	0.0281	2492	14.28	0.814
5.11×10^{-4}	0.0344	2492	17.50	0.879
5.11×10^{-4}	0.0393	2492	19.97	0.928

Tabla B.4. Datos para la Extensión de la Ecuación Limas-Ballesteros
Cuentas grandes de Socony

d_p (m)	v (m/seg)	ρ_p (Kg/m ³)	Re_s	ϵ
4.42×10^{-3}	0.0267	1603	117.28	0.409
4.42×10^{-3}	0.0341	1603	150.12	0.448

ANEXO C

Programa

C.1. Programa para Calcular la Masa Final de una Partícula cuando hay Crecimiento Microbiológico.

Para llevar a cabo el cálculo de la masa final de las partículas cuando hay crecimiento microbiológico a diferentes tiempos de una forma práctica se hizo un programa.

El programa se describe a continuación:

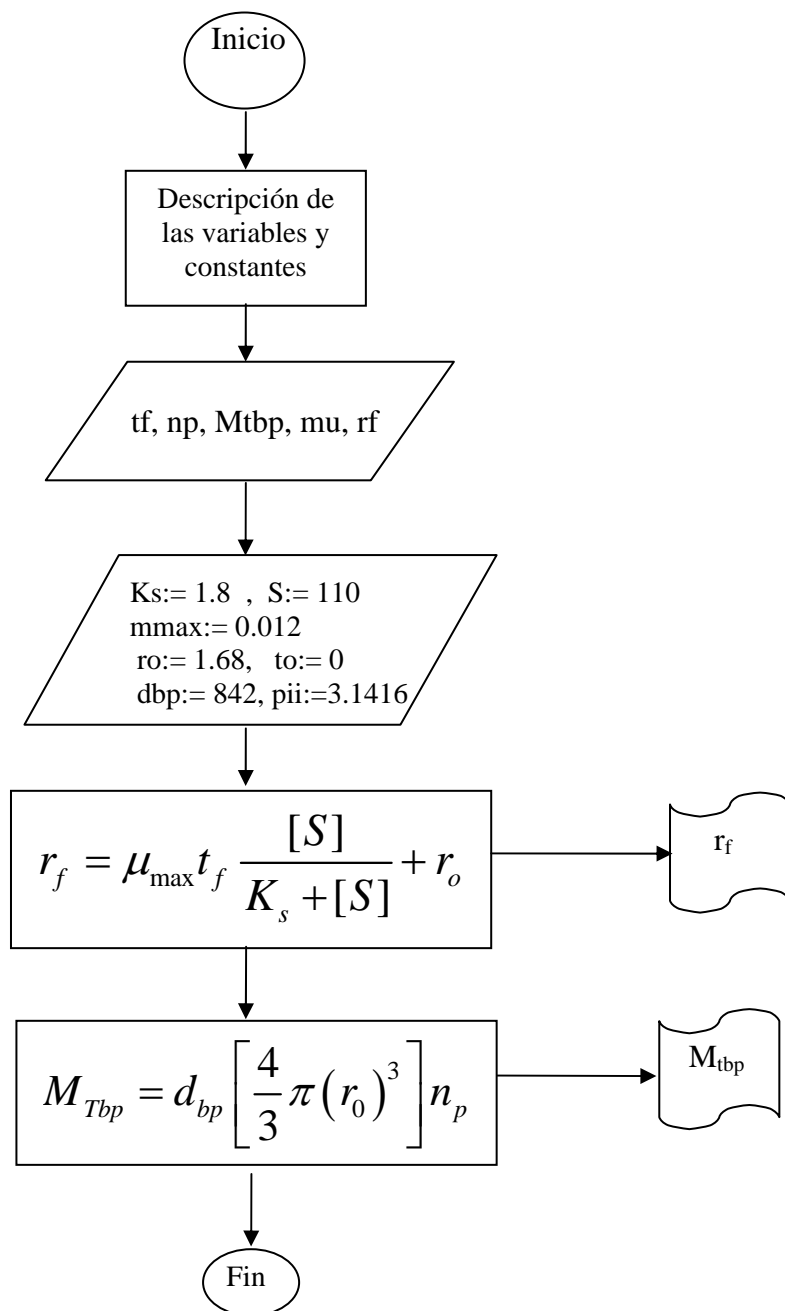


Fig. C.1. Diagrama de Flujo del Programa para Calcular la Masa Final de una Partícula cuando hay Crecimiento Microbiológico

!Programa para Calcular la Masa Final de una Partícula cuando hay Crecimiento Microbiológico

```

PROGRAM CALCULO_MASA_FINAL
!=====
=
! Programa que calcula la masa final de una partícula a diferentes
! tiempos cuando hay crecimiento de una capa biológica
!=====
==
!GLOSARIO DE TERMINOS
!dbp = densidad de la biopartícula (Kg/m3)
!ks = constante de Saturación (Kg/L)
!Mfbp = masa final de las partículas del lecho con recubrimiento (Kg)
!mmax= velocidad especifica máxima de crecimiento (1/h)
!mu = velocidad especifica de crecimiento (1/h)
!np = número total de partículas en el lecho
!pii= constante 3.141592654
!rmax= radio final o máximo (m)
!ro = radio inicial o radio de la partícula (mm)
!rf = radio final de la partícula (mm)
!S = concentración de Sustrato (Kg/L)
!tf = tiempo inicial (s)
!to = tiempo final (s)

double precision mu, mmax, S, ks, to, tf, ro, Mtbp
double precision np, pii, dbp, rf
pii=3.141592654d0

WRITE (*,*)
WRITE (*,*)' PROGRAMA QUE CALCULA EL ESPESOR DE UNA
PARTICULA'
WRITE (*,*)' A DIFERENTES TIEMPOS'
WRITE (*,*)
WRITE (*,*)
WRITE (*,*)
WRITE (*,*)
WRITE (*,*)'La velocidad especifica max. de crecimiento es mmax:'
WRITE (*,*)
READ (*,*) mmax
WRITE (*,*)
WRITE (*,*) 'La constante de saturación es ks: '
WRITE (*,*)
READ (*,*) ks
WRITE (*,*)
WRITE (*,*)'La concentración de sustrato es [S]: '
WRITE (*,*)
READ (*,*) S
WRITE (*,*)
WRITE (*,*)'El radio inicial de la partícula es ro:'
WRITE (*,*)

```

```
    READ (*,*) ro
    WRITE (*,*)
    WRITE (*,*)'El tiempo inicial del proceso es to:'
    WRITE (*,*)
    READ (*,*) to
    WRITE (*,*)
    WRITE (*,*)'El tiempo final del proceso es tf:'
    WRITE (*,*)
    READ (*,*) tf
    WRITE (*,*)
    WRITE (*,*)'El número total de partículas en el lecho es np:'
    WRITE (*,*)
    READ (*,*) np
    WRITE (*,*)
    WRITE (*,*)'La densidad de la biopartícula es dbp:'
    WRITE (*,*)
    READ (*,*) dbp
    WRITE (*,*)
!CALCULO DEL RADIO FINAL
    rf=ro+exp((-mmax*tf*S)/(ks+S))
    WRITE (*,*)'El radio final de la partícula es:',rf
    WRITE (*,*)
    rfm = rf*0.001
    WRITE (*,*)
!CALCULO DE LA MASA TOTAL DE LA BIOPARTICULA
    Mtbp=dbp*((4d0/3d0)*pii*(rfm**3d0))*np
    WRITE (*,*)'La masa total de las biopartículas es:',Mtbp
    WRITE (*,*)
    STOP
    END
```

ANEXO D

Determinación de Sacarosa

D.1. Técnica para la determinación de azúcares por DNS (sacarosa)

Para la Determinación de Sacarosa

Material.

- Tubos de Ensaye
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz Aforado
- Vaso de Precipitados
- Micropipeta
- Bureta
- Pipeta
- Espátula

Reactivos.

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico
- Ácido Clorhídrico
- Hidróxido de Sodio
- Fenol Cristalizado
- Tartrato de sodio y de potasio
- Sulfito de sodio
- Fenoftaleína
- Glucosa
- Agua destilada

Soluciones.

➤ Reactivo DNS (1 Litro de Solución)

10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico

10 g de NaOH

2 g de fenol.

1 L de Agua destilada

Nota: Disolver primero la sosa y el ácido dinitrosalicílico, después adicionar el fenol y mezclar bien. El reactivo es estable como lo describe Miller (1959). Titular una muestra de 3 mL con HCl 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador. Se deben gastar 5-6 mL.

Adicione NaOH si es necesario (2 g = 1mL HCl, 0.1 N).

➤ Solución de Sulfito de Sodio 50 g/L (10 mL)

➤ Solución al 40 % de tartrato de sodio y de potasio (1 mL/ muestra).

Procedimiento para la Curva de Calibración de Sacarosa (DNS).

1. Pesar 60 mg de sacarosa y disolverlos en 100 mL de agua
2. Preparar por duplicado una serie de tubos con 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, y 0 mL de agua destilada.
3. A cada uno de los tubos anteriores adicionar respectivamente 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL de la solución de sacarosa.
4. Hidrolizar la muestra
 - * Adicione una gota o 25 μ L de Ácido Clorhídrico concentrado ó al 37 % ó 11.9 N a 1 mL de solución de sacarosa.
 - Permita la hidrólisis durante 8 minutos a 90 °C (las muestras deben taparse con canicas durante el tratamiento).
 - Para neutralizar el ácido, adicione 1 gota o 25 μ L de una solución al 40 % de NaOH.
 - Adicione 2 mL de agua destilada
5. Antes de usar el reactivo DNS se toma una alícuota y se agrega 1 ml de la solución de sulfito de sodio, por cada 100 mL del reactivo.
6. Llevar a 3 mL la muestra con agua y agregar 3 mL de reactivo de DNS.
7. Para estabilizar el color, agregar 1 mL de la solución de tartrato a cada muestra, después enfríe en agua.
8. Leer absorbencia a 575 nm (con un blanco de agua).

9. Grafique %A vs. Concentración (mg/ml). Debe obtenerse una línea recta que intercepta la abscisa en 0.04 mg de glucosa, que representa la glucosa pérdida por oxidación las muestras ácidas deben neutralizarse puesto que el color se desarrolla sólo en condiciones alcalinas

Nota 1.- Las muestras una vez hervidas y tratadas con el tartrato pueden dejarse un tiempo razonable antes de leer. Las muestras sin hervir se deterioran gradualmente.

Nota 2.- Para una mejor determinación de bajas concentraciones de glucosa adicionar 0.1 mg de glucosa a cada muestra.

Nota 3.- 3 mL del reactivo DNS reacciona con hasta 10 mg de glucosa. Las muestras que sean demasiado oscuras para leerse pueden diluirse hasta 10 veces con agua y todavía darán buenos resultados. La dilución se hace después de hervir la muestra, el resultado se multiplica por el factor de dilución.

Nota 4.- El tartrato permite estabilizar el color, pero puede interferir con la remoción de oxígeno por el sulfito (protege la glucosa de oxidación). El inconveniente de la oxidación de sulfito puede evitarse si se prepara el reactivo en lotes grandes sin sulfito y este se agrega unas horas antes de que el reactivo se use.

Procedimiento para la Curva de Calibración de Sacarosa (DNS).

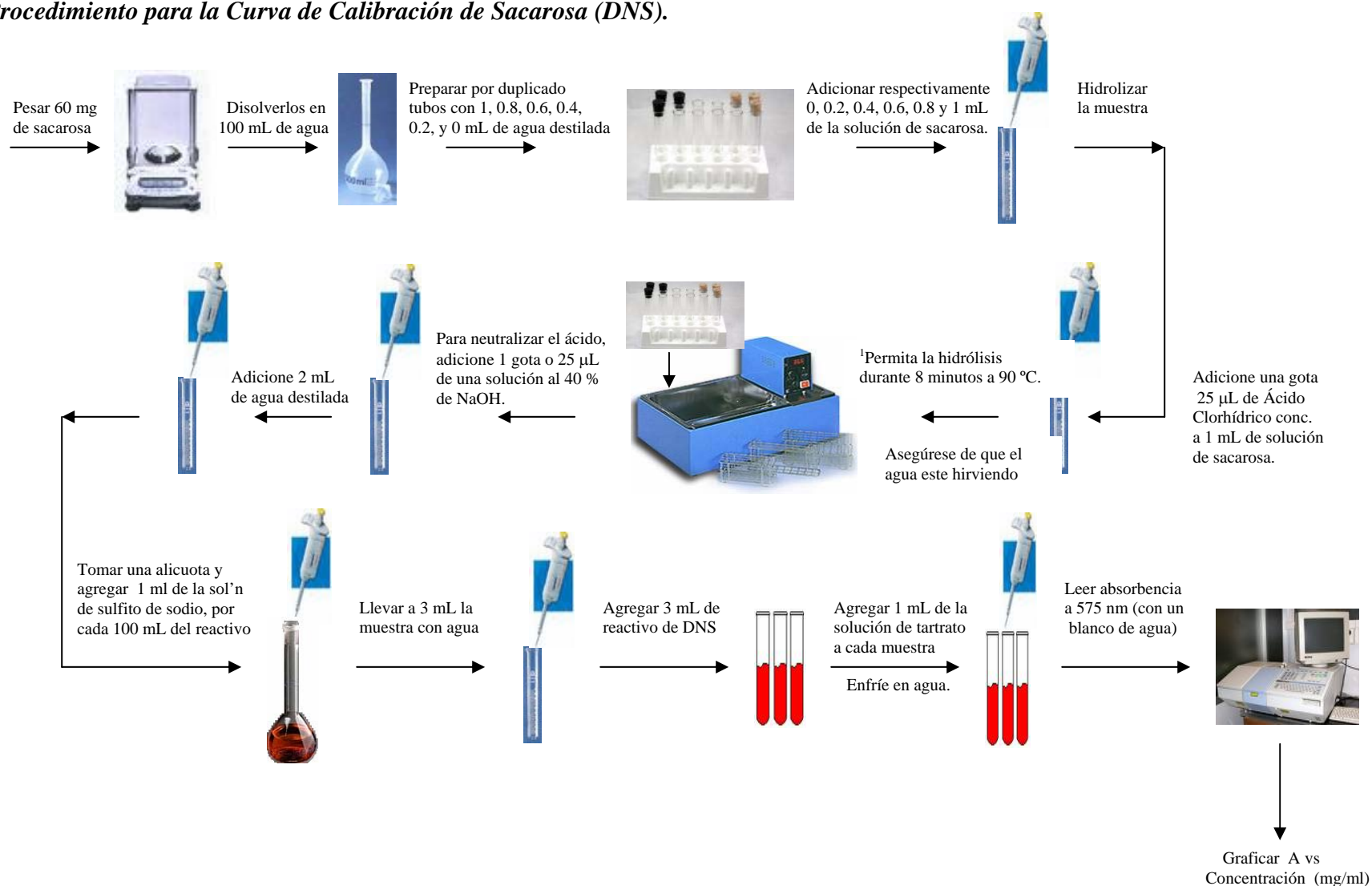


FIG. D.1. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES POR DNS (SACAROSA)

¹Las muestras deben taparse con canicas durante el tratamiento

² Para estabilizar el color

ANEXO E

Tinción Gram

E.1. Tinción de Gram para determinar si hay contaminación en el medio de cultivo del proceso

Procedimiento:

1. Limpiar el portaobjetos con agua y jabón.
2. Flamear el asa bacteriológica con ayuda de un mechero y esperar a que se enfríe un poco. Tomar el asa (previamente flameada) y con ésta tomar un poco de muestra, o tomar un pellet de polipropileno obtenido del proceso al azar y colocarlo en un vaso de precipitados.
3. Una vez obtenida una pequeña cantidad de la muestra (con el asa), hacer que ésta tenga contacto con una lámina portaobjetos, la cual servirá para depositar la muestra contenida en el asa.
4. Con el asa (conteniendo la muestra) sobre la lámina portaobjetos, proceder a realizar la extensión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa) sobre la lámina, de tal forma que al terminar la extensión, tengamos como producto una espiral en la parte media de la lámina.
5. Fijar a la flama del mechero rápidamente sin quemar la muestra y esperar que la muestra se seque.

➤ **Tinción**

6. Con violeta cristal o violeta de genciana, utilizando una cantidad suficiente de dicho colorante sobre la muestra, como para lograr cubrirla por completo. Se deja actuar al colorante por 1 minuto. Esta tinción de 1 minuto está dada para trabajar a una temperatura ambiente de 25 °C.

➤ **Enjuague**

7. Al transcurrir el minuto, se debe enjuagar la lámina conteniendo la muestra con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua NO debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser un chorro delgado, aproximadamente de medio a un centímetro de espesor. También el enjuague se debe realizar poniendo la lámina en posición inclinada hacia abajo.

➤ **Mordiente**

8. Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplica como mordiente yodo o lugol durante 1 minuto más. El mordiente es cualquier sustancia que forme compuestos insolubles con colorantes y determine su fijación a las bacterias

➤ **Decoloración**

9. Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decolora con etanol al 75 %, etanol al 95 %, acetona o alcohol-acetona, hasta que ya no escurra más líquido azul. Para esto se utiliza el gotero del frasco del decolorante. Se van añadiendo cantidades suficientes del decolorante, hasta lograr que éste salga totalmente transparente, es decir, hasta que ya no escurra más líquido azul.

➤ **Lavado y secado**

10. Lavar con agua para quitar los residuos de decolorante y esperar que seque la lámina al aire libre o con la ayuda de la llama de un mechero de la forma anteriormente descrita.

➤ **Tinción de contraste**

11. Una vez que la lámina ya secó, procedemos a teñir nuevamente, pero esta vez se va a utilizar un colorante de contraste como por ejemplo la safranina, dejar actuar durante 30 segundos.

➤ **Nuevo enjuague**

12. Pasado el minuto correspondiente, se procede a enjuagar la lámina con agua, se escurre el agua sobrante y se seca en la forma anteriormente descrita.

13. Observar al microscopio con objetivo de 50X, u observar con objetivo de 100X y aceite de inmersión.