

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química

***Análisis de las variables que afectan el desarrollo
de microorganismos filamentosos en sistemas de
barros activados para el tratamiento de efluentes
de la industria alimenticia***

Tesis Doctoral
Edgardo Martín Contreras
2001

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Noemí E. Zaritzky y la codirección de la Dra. Leda Giannuzzi.

Agradecimientos

A la Dra. Noemí Zaritzky, quien me dirigió durante estos años brindándome su experiencia, predisposición y apoyo.

A la Dra. Leda Giannuzzi, quien me codirigió (y me tuvo que sufrir!) en este trabajo, por su constante apoyo y optimismo.

A la Dra. María Cristina Añon por haberme permitido realizar tareas de investigación en el CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos).

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs. As. y a la Universidad Nacional de La Plata por su apoyo financiero.

Al Dr. Carlos Santos (mi profesor de Física y Química de la secundaria), a Carl Sagan y a mi padre por haber despertado en mí la pasión por la ciencia.

Quisiera agradecer especialmente a Rodrigo B. y Sergio A.G. por sus enriquecedoras e interminables charlas filosóficas...

Además, cada una de las siguientes personas saben lo que hicieron, dejaron de hacer, me permitieron, me "sugirieron" no hacer (gracias a Dios!) o simplemente pasamos buenos momentos: Nora B., Alicia B., Alicia C., Nestor S., Guillermo "el garoto" K., Martín R., el capitán Alonso, el Cafa, Pablo "Dr. Mirolí" M., Vincent van V., Oscar, el negro Torres, Arthur C., Lucy B., Aldous C., Alex Caravelli, Juancho, Manuel Q. y a todos (a todos!) mis compañeros del CIDCA...

y muy especialmente a mis viejos !!!!

*dedicado a Cacho y Nelva
(quienes me dedicaron su existencia)*



y a Cleo!

INDICE

CAPITULO 1

1.1. Introducción.....	1
1.1.1. La distribución del agua en el mundo.....	1
1.1.2. Clasificación de las aguas residuales.....	2
1.1.3. Parámetros utilizados en la caracterización de las aguas residuales	4
1.1.3.1. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO).....	4
1.1.3.2. Demanda química de oxígeno (DQO).....	4
1.1.3.3. Sólidos suspendidos totales (SST).....	6
1.1.3.4. Sólidos suspendidos volátiles (SSV).....	6
1.1.3.5. Nitrógeno total Kjeldahl (NTK).....	6
1.1.3.6. Nitrógeno amonio (NA).....	6
1.1.3.7. Fósforo total (P_T).....	6
1.1.4. La contaminación de los recursos hídricos en la Argentina.....	6
1.1.4.1. Aguas residuales domésticas.....	9
1.1.4.2. Aguas residuales industriales.....	10
1.1.4.3. Industrias procesadoras de vegetales.....	11
1.1.5. Tratamiento de aguas residuales.....	12
1.1.6. Tratamiento biológico de aguas residuales.....	13
1.1.7. Tratamiento biológico de aguas residuales por barros activados.....	14
1.1.8. Problemas de separación de barros activados. El bulking filamentoso.....	18
1.1.8.1. La estructura del flóculo biológico.....	19
1.1.8.2. Clasificación de los microorganismos filamentosos.....	24
1.1.8.3. Factores que determinan la aparición de bulking filamentoso causado por <i>Sphaerotilus natans</i>.....	26
1.1.9. Control del bulking filamentoso.....	29
1.2. Objetivos.....	32
1.2.1. Objetivo general.....	32
1.2.2. Objetivos específicos.....	32

CAPITULO 2. Caracterización de un sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales

2.1. Materiales y Métodos.....	34
2.1.1.Obtención del sistema modelo efluente.....	34
2.1.2. Análisis del efluente.....	34
2.2. Resultados y Discusión.....	36
2.2.1. Análisis del sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales.....	36
2.2.2. Determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC.....	38
2.2.3. Composición del agua residual en función del tiempo de contacto..	43
2.3. Conclusiones del Capítulo.....	44

CAPITULO 3. Caracterización de las cepas bajo estudio

3.1. Materiales y Métodos.....	45
3.1.1. Planta de barros activados escala laboratorio.....	45
3.1.2. Microorganismos estudiados.....	45
3.1.3. Medios de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de las cepas floculantes.....	46
3.1.4. Procedimiento de aislamiento de bacterias floculantes.....	47
3.1.5. Caracterización de los microorganismos en estudio.....	47
3.1.6. Observaciones microscópicas.....	47
3.1.7. Coloraciones.....	48
3.1.7.1. Coloración de Gram (método modificado por Hücker).....	48
3.1.7.2. Coloración de Neisser.....	48
3.1.7.3. Gránulos de poli- β -hidroxibutirato.....	49
3.1.8. Utilización de diferentes fuentes de carbono.....	50
3.1.9. Pruebas bioquímicas.....	51
3.1.9.1.Oxidasa.....	51
3.1.9.2. Identificación de las cepas aisladas.....	51
3.2. Resultados y Discusión.....	53
3.2.1. Aislamiento de cepas floculantes.....	53
3.2.2. Utilización de diferentes fuentes de carbono por las cepas floculantes aisladas y por <i>Sphaerotilus natans</i>	53

3.2.3. Caracterización de la cepa filamentosa <i>S. natans</i> ATCC #29329.....	57
3.2.4. Fuentes de carbono utilizadas por <i>S. natans</i> ATCC #29329.....	59
3.2.5. Desarrollo de <i>S. natans</i> y de la cepa E932 en cultivos puros en medio líquido utilizando diferentes fuentes de carbono.....	59
3.2.6. Diseño de un medio de cultivo sintético para realizar estudios cinéticos.....	63
3.3. Conclusiones del Capítulo.....	64

CAPITULO 4. Descripción y caracterización del biorreactor empleado

4.1. Descripción del biorreactor.....	66
4.2. Determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno (K_La) mediante el método dinámico.....	68
4.2.1. Efecto de la velocidad de agitación y el caudal de aireación en K_La	73
4.2.2. Determinación del K_La en condiciones de operación.....	78
4.3. Conclusiones del Capítulo.....	81

CAPITULO 5. Evaluación de diferentes métodos para la determinación de biomasa en cultivos puros y en sistemas de barros activados

5.1. Materiales y Métodos.....	83
5.1.1. Microorganismos empleados.....	83
5.1.2. Medio de cultivo.....	84
5.1.3. Reactores utilizados y condiciones experimentales.....	84
5.1.4. Determinación de biomasa mediante Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV).....	84
5.1.5. Modificación de la técnica de SSV para la determinación de la biomasa de bacterias con tamaño menor a 1-2 μm	85
5.1.6. Determinación de biomasa mediante densidad óptica (DO).....	86
5.1.7. Determinación de biomasa como DQO.....	86
5.1.7.1. Método propuesto.....	86
5.1.7.2. Método de Bullock y col. (1996).....	87
5.2. Resultados y Discusión.....	87
5.2.1. Determinación de biomasa mediante SSV.....	87

5.2.2. Determinación de biomasa mediante densidad óptica (DO).....	89
5.2.3. Determinación de biomasa como DQO.....	92
5.2.4. Estimación del factor de conversión f_x en diferentes sistemas.....	93
5.2.5. Comparación entre los valores de f_x obtenidos en el presente trabajo con datos bibliográficos.....	98
5.3. Conclusiones del Capítulo.....	100

CAPITULO 6. Análisis de las variables que afectan el desarrollo de la cepa floculante E932 en cultivo continuo

6.1. Efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de la cepa E932.....	101
6.1.1. Resultados y Discusión.....	101
6.2. Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes a la cepa E932 en un medio limitado en fuente de carbono en cultivo continuo.....	104
6.2.1. Resultados y Discusión.....	105
6.3. Conclusiones del Capítulo.....	110

CAPITULO 7. Análisis de las variables que afectan el desarrollo del microorganismo filamentoso *Sphaerotilus natans*

7.1. Efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de <i>S.</i> <i>natans</i>	113
7.1.1. Resultados y Discusión.....	113
7.2. Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de <i>S.</i> <i>natans</i> en un medio limitado en fuente de carbono en cultivo continuo.....	115
7.2.1. Resultados y Discusión.....	115
7.3. Estudio del efecto del pH en el desarrollo de <i>S. natans</i> mediante técnicas respirométricas.....	121
7.3.1. Condiciones experimentales.....	121
7.3.2. Ecuaciones empleadas.....	122
7.3.3. Resultados y Discusión.....	125
7.3.3.1. Modelado del efecto del pH en el desarrollo de <i>S. natans</i>	137

7.4. Conclusiones del Capítulo.....	141
--	------------

CAPITULO 8. Desarrollo de *S. natans* y la cepa E932 en cultivos mixtos

8.1. Desarrollo de una técnica para determinar la composición microbiana de un cultivo mixto.....	144
8.1.1. Observaciones microscópicas.....	144
8.1.2. Adquisición y análisis de la imágenes.....	145
8.1.3. Fundamento teórico de la técnica propuesta.....	145
8.1.4. Resultados y Discusión.....	147
8.1.4.1. Determinación de la fracción de área total ocupada por las bacterias (F_b) en cultivo puro mediante el programa Global Lab <i>Image</i> Versión 2.10.....	147
8.1.4.2. Análisis de las imágenes adquiridas correspondientes a cultivos mixtos.....	150
8.1.4.3. Determinación de la técnica de observación más adecuada para el análisis de las muestras.....	152
8.1.4.4. Determinación del número mínimo de imágenes a analizar...	154
8.1.4.5. Análisis de cultivos mixtos de composición conocida.....	158
8.2. Estudio de cultivos mixtos en quimiostato.....	163
8.2.1. Resultados Obtenidos.....	163
8.2.2. Modelado de los resultados.....	167
8.2.2.1. Simulación numérica del comportamiento del cultivo mixto.	169
8.3. Conclusiones del Capítulo.....	173

CAPITULO 9

Conclusiones.....	174
--------------------------	------------

Bibliografía.....	178
--------------------------	------------

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

1.1.1. La distribución del agua en el mundo

Aunque el agua un elemento relativamente abundante en la Tierra, el 99.9% no es apta y/o disponible para el consumo humano (Tabla 1.1). Casi la totalidad del agua se encuentra en los mares y océanos en forma de agua salada. De las aguas dulces la mayor parte está en forma de hielo y en aguas subterráneas. El agua situada sobre los continentes y la presente en la atmósfera constituye las cantidades proporcionalmente menores, sin embargo su importancia biológica es grande (Miller, 1994).

Tabla 1.1. Distribución del agua en la Tierra

Localización	Volumen (km ³)	%
Agua líquida oceánica	1322 x10 ⁶	97.48
Hielo oceánico	26 x10 ⁶	1.91
Epicontinentales ¹	225000	0.01
En la atmósfera	12000	< 0.01
Aguas subterráneas	2 - 8 x10 ⁶	0.15 - 0.60

¹ En las aguas epicontinentales se incluyen el mar Caspio, el Aral y el mar Muerto, además de lagos, ríos, etc.

Debido a esta aparente abundancia del agua, lagos, ríos y mares se han convertido en el vertedero habitual en el cual se arrojan los residuos producidos por las diferentes actividades del hombre provocando el consiguiente deterioro de los recursos hídricos utilizados para tal fin. Según la Comisión Mundial del Agua para el siglo XXI, más de la mitad de los grandes ríos del mundo sobreexplotados y contaminados, degradan y contaminan los ecosistemas circundantes. De hecho,

solamente el Amazonas y el Congo son los dos únicos grandes ríos del mundo considerados como sanos y la mayoría de los cursos de agua que pasan por las grandes ciudades están biológicamente muertos o condenados (Williams, 2000a).

La degradación de las aguas viene de antiguo; en algunos lugares, como la desembocadura del Nilo, hay niveles altos de contaminación desde hace muchos siglos. Sin embargo desde el siglo XIX este problema se ha extendido a ríos y mares de todo el mundo. Debido al alto crecimiento de la población, principalmente en áreas urbanas, la disposición de las aguas residuales se ha convertido en un problema serio de contaminación del medio ambiente.

En las últimas décadas, en muchos países desarrollados se han invertido importantes sumas en el tratamiento de las aguas residuales con el objeto de revertir la tendencia al deterioro de la calidad del agua de superficie. Sin embargo, en países en desarrollo, la situación es muy distinta principalmente debido a la falta de recursos (Williams, 2000b). La mayoría de los vertidos de aguas residuales que se hacen en el mundo no son tratados; simplemente se descargan en el río, mar o lago más cercano y se deja que los sistemas naturales, con mayor o menor eficacia y riesgo, degraden los desechos de forma natural. Por ejemplo, en la región de América Latina y el Caribe el 49% de la población tiene servicio de alcantarillado, colectándose diariamente 40 millones de metros cúbicos de aguas residuales. De este volumen, menos del 10% recibe tratamiento previo antes de ser descargado a un cuerpo de agua superficial o a su uso para el riego directo de productos agrícolas (Moscoso y León, 1996).

1.1.2. Clasificación de las aguas residuales

Según su origen las aguas residuales se pueden dividir en tres grupos (Rubio, 1995):

- **Aguas residuales urbanas:** provienen de casas particulares (domiciliarias), oficinas, aguas sanitarias de pequeñas y medianas industrias (no relacionadas con el proceso de fabricación en sí), hospitales, escuelas, etc. y aguas domiciliarias no sanitarias (agua de lluvia y napas que filtran a los sistemas de canalización).
- **Aguas residuales industriales:** son aguas que se originan durante la producción misma; la cantidad producida y composición varía según el tipo de industria.
- **Lixiviados:** son aguas residuales formadas en vertederos, basurales o terrenos contaminados. Pueden ser de dos tipos:
 - 1.- Aguas de lluvia que han entrado en contacto con los residuos vertidos.

2.- Provenientes de vertidos que desprenden agua (aguas de consolidación).

Existe un gran número de contaminantes del agua; entre ellos se pueden citar:

1.- Microorganismos patógenos: en los países en vías de desarrollo las enfermedades producidas por estos patógenos son uno de los motivos más importantes de muerte prematura.

2.- Desechos orgánicos. Son el conjunto de residuos orgánicos producidos por los seres humanos, ganado, etc. Incluyen líquidos cloacales y efluentes provenientes de procesos industriales relacionados principalmente con el procesamiento de alimentos. El aporte excesivo de materia orgánica a los cuerpos receptores de aguas naturales favorece el desarrollo de microorganismos, principalmente bacterias. Debido a la alta velocidad de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos, el cuerpo de agua tenderá a desarrollar condiciones anóxicas y/o anaeróbicas con el consiguiente deterioro del ecosistema presente. Adicionalmente, la zona perderá su atractivo desde el punto de vista recreacional afectando a toda actividad económica relacionada (Miller, 1994).

3.- Sustancias químicas inorgánicas. En este grupo están incluidos ácidos, sales y metales tóxicos (mercurio, plomo, cadmio, etc.). Cuando están en cantidades altas pueden causar graves daños a los seres vivos, disminuir los rendimientos agrícolas y corroer los equipos que se usan para trabajar con el agua.

4.- Nutrientes. Los nitratos y fosfatos son sustancias solubles en agua que las plantas necesitan para su desarrollo, pero si se encuentran en cantidad excesiva favorecen el desarrollo de algas provocando la eutroficación de las aguas. Cuando estas algas y otros vegetales mueren, al ser descompuestos por los microorganismos se agota el oxígeno y se hace imposible la vida de otros seres vivos.

5.- Compuestos orgánicos sintéticos. Algunos compuestos orgánicos (petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes, etc.) permanecen largos períodos de tiempo, porque, al ser productos fabricados por el hombre, contienen moléculas difíciles de degradar por los microorganismos.

6.- Material en suspensión. En términos de masa total los materiales en suspensión son la mayor fuente de contaminación del agua. La turbidez que provocan en el agua dificulta la vida de algunos organismos y los sedimentos que se van

acumulando destruyen sitios de alimentación o desove de los peces, rellenan lagos o pantanos y obstruyen canales, rías y puertos.

7.- Sustancias radiactivas. Isótopos radiactivos solubles pueden estar presentes en el agua y, a veces, se pueden ir acumulando a lo largo de las cadenas tróficas.

8.- Contaminación térmica. El agua caliente liberada por centrales generadoras de energía eléctrica o en diversos procesos industriales puede elevar la temperatura de ríos o embalses con lo que disminuye su capacidad de contener oxígeno y afecta a la vida de los organismos.

1.1.3. Parámetros utilizados en la caracterización de aguas residuales

1.1.3.1. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

La DBO es una medida del consumo de oxígeno debido a la oxidación biológica de la materia orgánica y el amonio presente en un efluente que ocurriría cuando las aguas residuales son descargadas en un cuerpo receptor (lagos, ríos mares, etc.); se expresa en mgDBO/L. La DBO es un parámetro muy importante desde el punto de vista del impacto del agua residual en el cuerpo receptor ya que un valor alto de DBO indica un alto potencial de consumo de oxígeno. Por otra parte, debido a que la oxidación de la materia orgánica es llevada a cabo por microorganismos, se dice que la DBO es una medida de la materia orgánica biodegradable. A pesar de su importancia, es un test muy poco práctico ya que los resultados se obtienen como mínimo en 5 días.

1.1.3.2. Demanda química de oxígeno (DQO)

Otro parámetro muy utilizado para estimar el contenido de materia orgánica en aguas es la DQO. En esta determinación, los compuestos orgánicos son oxidados por dicromato de potasio en medio sulfúrico a 150 °C durante 2 horas. El ensayo debe realizarse en presencia de un catalizador, sulfato de plata y mercurio, para facilitar la oxidación de los compuestos orgánicos así como para evitar interferencias de cloruros. La mayoría de los compuestos son oxidados completamente y solamente en algunos hidrocarburos aromáticos y piridinas la oxidación puede resultar parcial. En las condiciones de ensayo, el amonio tampoco puede ser oxidado, razón por la cual no interfiere en los resultados. Este test es relativamente fácil de realizar y los resultados se obtienen en pocas horas, por ello es ampliamente utilizado en estudios de

laboratorio. Los resultados se expresan como la cantidad equivalente de oxígeno que se hubiera consumido para oxidar la materia orgánica presente (mgDQO/L).

Resulta evidente que la DQO total de un agua residual (DQO_T) es una medida que engloba diferentes tipos de sustancias tanto en solución como en suspensión (Figura 1.1). Por un lado, la DQO presente en el agua residual puede ser biodegradable o inerte (no biodegradable). A su vez, es posible que existan componentes solubles y particulados. La DQO biodegradable soluble se asocia a compuestos como ácidos grasos de cadena corta, carbohidratos y alcoholes, los cuales pueden ser utilizados directamente por los microorganismos para su desarrollo. La DQO biodegradable particulada corresponde a moléculas de alto peso molecular que por hidrólisis se descomponen dando sustrato soluble. Algunos autores incluso hacen una distinción entre hidrólisis rápida y lenta; sin embargo, estas diferentes fracciones son muy difíciles de identificar (Orhon y Artan, 1994).

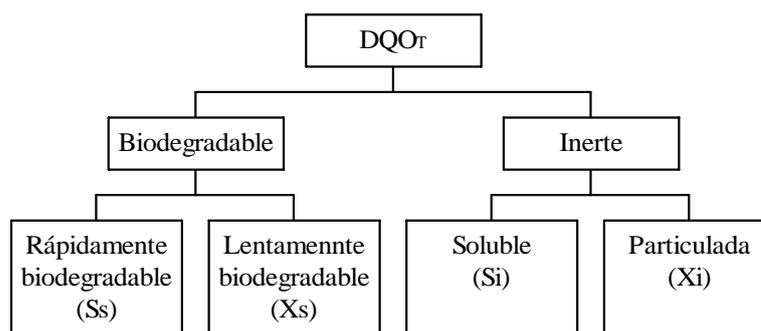


Figura 1.1. Componentes de la DQO_T en un agua residual

1.1.3.3. Sólidos suspendidos totales (SST)

Es el peso de la materia secada durante dos horas a 105 °C contenida en un cierto volumen de muestra; se expresan en mgSST/L. En sistemas modelo y cultivos puros representa aproximadamente la masa microbiana, no así en lodos activados donde puede existir una proporción importante de materia inorgánica.

1.1.3.4. Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Es el peso de los compuestos que pueden ser volatilizados a 600 °C durante 15 minutos contenidos en un cierto volumen de muestra y se asocian a la cantidad de materia orgánica en suspensión o a los microorganismos presentes en un sistema determinado; se expresa en mgSSV/L. La diferencia entre los SST y los SSV corresponde a los sólidos suspendidos fijos (SSF) y son una medida de la fracción inorgánica (sales) presente en la muestra expresados como mgSSF/L.

1.1.3.5. Nitrógeno total Kjeldahl (NTK)

Representa la concentración total de todos los compuestos de nitrógeno presentes en una muestra y se expresa en mgN/L.

1.1.3.6. Nitrógeno amonio (NA)

Representa la concentración del amonio presente en la muestra y se expresa en mgN/L. La diferencia entre el NTK y el NA representa el nitrógeno unido o que forma parte de la materia orgánica.

1.1.3.7. Fósforo total (P_T)

Corresponde a la concentración total de todos los compuestos presentes en una muestra que contienen fósforo (ortofosfatos y compuestos orgánicos) y se expresa en mgP/L.

1.1.4. La contaminación de los recursos hídricos en Argentina

Las principales fuentes de abastecimiento utilizadas en Argentina son aguas superficiales conformadas por los ríos de la llanura de la región del litoral y los cursos de agua originados en la cordillera. El resto lo constituyen aguas subterráneas de diferentes calidades. Se destaca una amplia zona en el centro del país que no dispone de fuentes superficiales cercanas y tiene aguas subterráneas salobres y/o con presencia de arsénico y flúor que las hacen difícilmente aprovechables para el consumo humano (CIDIS, 1997).

A pesar de la relativa abundancia de fuentes de agua, la situación en Argentina

no es muy alentadora. El 73% del agua potable que se consume es utilizada en la agricultura, principalmente para riego, valor relativamente alto si se lo compara con las medias de Sudamérica (59%) y Norte y Centroamérica combinados (49%) (Figura 1.2).

Los datos disponibles indican que la Argentina es el país sudamericano de mayor consumo de agua potable per cápita, superando la media mundial (Figura 1.3). De hecho, Argentina ocupa el puesto 23 entre los países de mayor consumo per cápita del mundo (World Resources 1996-1997).

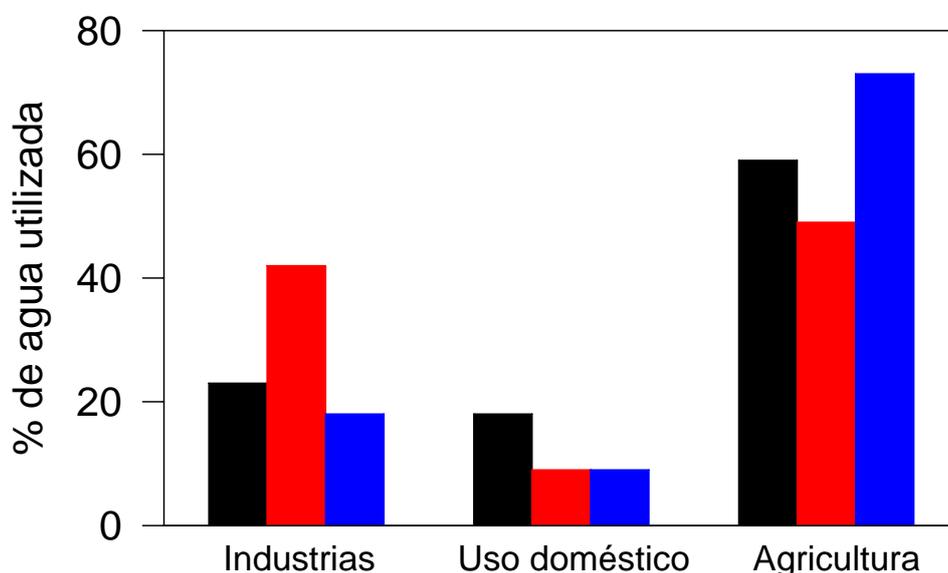


Figura 1.2. Utilización del agua por sectores (World Resources 1996-1997)
 (v) Sudamérica, (v) América Central y Norteamérica, (v) Argentina

En el orden local, de acuerdo a datos del año 1999, el consumo diario de agua potable por habitante en el Gran La Plata, incluyendo a Berisso y a Ensenada, fue de 550 litros cuando lo aconsejado por las normas internacionales es de menos de 350 litros (El Día, 3/6/2000). Las principales causas de este consumo exagerado del agua se debe a varios factores entre los que se cuentan:

1.- Pérdidas en el sistema de distribución de agua potable debido a que no se han renovado las instalaciones existentes (las cuales han cumplido su ciclo de vida útil) y un mantenimiento deficiente (principalmente por falta de inversión).

2.- Ignorancia de la gente respecto del verdadero precio del agua potable ya que muchas personas piensan que el agua que sale por las canillas es gratis.

3.- Usos y costumbres característicos de la población. Los factores culturales influyen fuertemente en el consumo de agua por la gente, principalmente la forma de procesar los alimentos y el aseo personal.

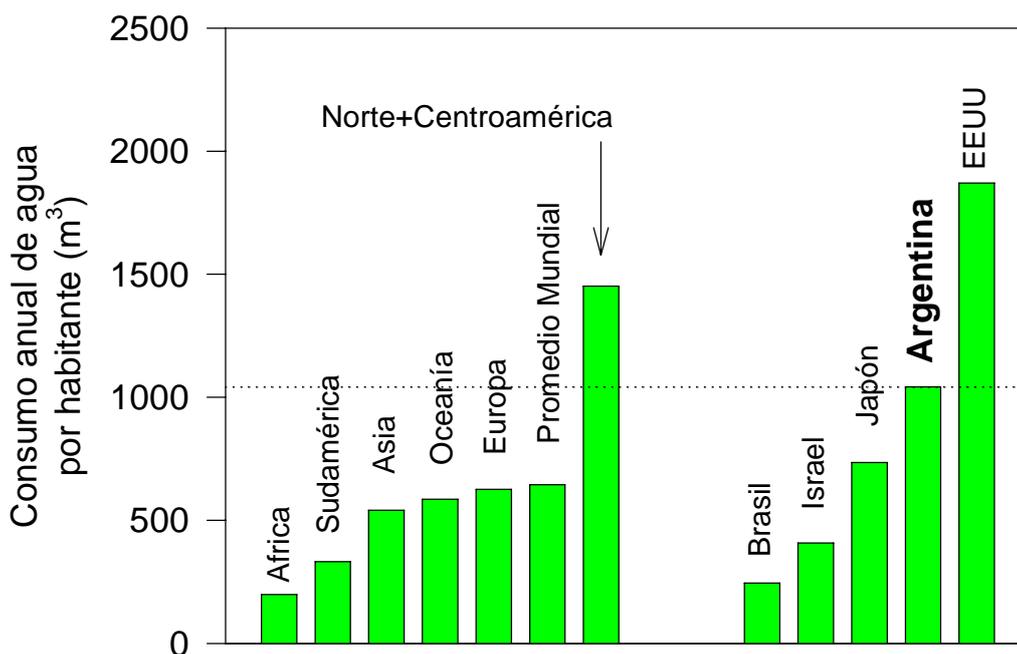


Figura 1.3. Consumo anual de agua por habitante en diferentes países y continentes (World Resources 1996-1997)

1.1.4.1. Aguas residuales domésticas

Las aguas residuales domésticas son una importante fuente de contaminación de los recursos hídricos en Argentina. Esto se debe a que a pesar de contar con el producto nacional bruto (PNB) más alto de América Latina, Argentina está entre los últimos en cobertura de servicios de agua y alcantarillado (World Resources 1996-1997). En la Figura 1.4 se observa que el área de baja cobertura de servicios está situada principalmente en el anillo exterior del área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), siendo ésta la zona más densamente poblada del país.

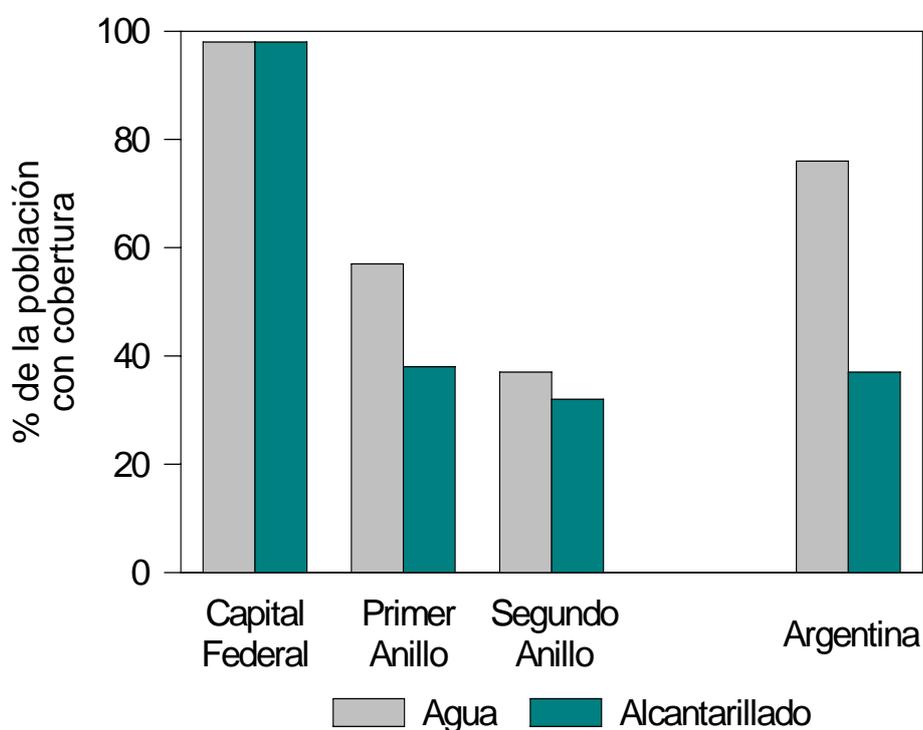


Figura 1.4. Comparación de la cobertura del servicio de agua y alcantarillado en el Area Metropolitana de Buenos Aires (AMBA)

Según un informe del Banco Mundial (1995), las deficiencias abarcan los cuatro componentes principales de un sistema de agua y alcantarillado que están relacionados estrechamente: (1) producción y tratamiento del agua; (2) distribución del agua; (3) recolección de las aguas servidas y (4) tratamiento y eliminación de las aguas servidas. En este mismo informe se indica que alrededor de 4 millones de personas en el AMBA que no están conectadas a la red pública de suministro de agua,

obtienen su agua de pozos individuales los cuales carecen virtualmente de monitoreo de calidad. Aproximadamente la mitad de estos pozos sacan agua del acuífero Epipelche, el cual está contaminado. Además, varios cientos de miles de personas que reciben agua de la red pública, también se alimentan de pozos que bombean del acuífero Puelche, el cual está a mayor profundidad y menos contaminado. Sin embargo, la falta de control en el uso de éste en el transcurso de los años ha ocasionado serios problemas de salinización en muchas áreas, así como elevado el contenido de nitratos que exceden los límites permisibles en el agua potable.

Con relación al servicio sanitario, alrededor de 5 millones de personas dependen de tanques sépticos, cámaras u otros sistemas in situ que permean directamente al acuífero Epipelche. Estos métodos son la principal causa de contaminación del acuífero así como del elevado contenido de nitratos del Puelche.

Los lodos de los tanques sépticos que se extraen periódicamente generan un riesgo ambiental adicional debido a que son arrojados indebidamente en basurales, ríos, cloacas y alcantarillados que ya están sobrecargados. Adicionalmente, unas 5 millones de personas están conectadas al servicio central de alcantarillado y cloacas que descargan grandes cantidades de aguas servidas sin tratar o con un tratamiento parcial en los principales cuerpos de agua del país

1.1.4.2. Aguas residuales industriales

Las descargas industriales son otra importante fuente de contaminación de las aguas en la Argentina. Según una estimación realizada por el Banco Mundial (1995) más del 60% de toda la producción industrial se concentra en el AMBA; la descarga total de aguas residuales industriales en esta zona es tan importante como las descargas de origen domiciliario.

Durante 1993 la Secretaría de Recursos Naturales y Ambiente Humano (SERNAH) realizó un relevamiento de las descargas de aguas residuales generadas por diferentes industrias en la Provincia de Buenos Aires. En esa encuesta se determinó que el sector de industrias dedicadas al procesamiento de alimentos era el mayor generador de aguas residuales (22% del total descargado por las industrias) seguido por la industria textil (16%) y fabricante de bebidas (14%) entre otras.

1.1.4.3. Industrias procesadoras de vegetales

El gran volumen de aguas residuales generado es uno de los principales problemas de las industrias relacionadas con el procesamiento de vegetales; entre estas se destaca la producción de papa deshidratada con 30.6 m³ de agua residual generada por tonelada de vegetal procesado (Tabla 1.2).

La composición del agua residual esta determinada principalmente por el proceso utilizado. Durante el pelado mecánico de los vegetales se liberan grandes cantidades de residuos en forma de cáscaras y recortes; cuando se realiza pelado químico aparecen además restos de las disoluciones empleadas (hidróxido de sodio) determinando un efluente con valores altos de pH. Por otra parte, durante la operación de escaldado se liberan grandes cantidades de almidón, azúcares, proteínas y otros productos solubles del vegetal generando un agua residual con una alta carga orgánica aunque fácilmente biodegradable. Adicionalmente pueden aparecer detergentes u otros productos utilizados en la limpieza de la maquinaria y naves de la fábrica (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Características fisicoquímicas de las aguas residuales provenientes de industrias procesadoras de vegetales (Seoánez Calvo, 1996)

Producto	Volumen (m ³ /tm)	pH	SST (g/m ³)	DBO (g/m ³)	kgSST/tm	KgDQO/tm
Espárragos	13	7.3	100	60	1.3	0.8
Zanahoria pelada	5.6	8.9	2000	1400	11.2	7.8
Zanahoria cortada	18	-	700	860	12.6	15.5
Remolacha de mesa	4.1	6.5	1250	4000	5.1	16.4
Espinaca	27	7	330	500	8.9	13.5
Tomate	10	-	1070	2040	10.7	20.4
Papa congelada	7.6	-	-	1300	-	9.9
Papa deshidratada	30.6	-	1200	330	36.7	10.1

1.1.5. Tratamiento de aguas residuales

La alta carga orgánica de las aguas residuales provenientes de las industrias procesadoras de vegetales genera un serio problema de contaminación cuando es descargada sin ningún tipo de tratamiento a ríos y mares. Con la aparición de leyes que limitan la descarga de contaminantes, las industrias fueron forzadas a encontrar un tratamiento previo de sus residuos (Karim y Sistrunk 1984,1985).

El objetivo del tratamiento es la remoción de la materia orgánica, nitrógeno, fósforo y otros contaminantes contenidos en el agua residual tal que la cantidad remanente sea aceptable de acuerdo a la ley que rige en cada caso en particular. Algunos requerimientos mínimos que rigen en la Provincia de Buenos Aires para la descarga de efluentes líquidos se presentan en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Parámetros de calidad de las descargas límites admisibles en la Provincia de Buenos Aires (Resolución AGOSBA 389/98)

Parámetro	Unidades	1	2	3	4
Temperatura	°C	45	45	45	45
PH	UpH	7 - 10	6.5 - 10	6.5 - 10	6.5 - 10
Sól. Sed. 10 min	mg/L	Ausentes	ausentes	ausentes	Ausentes
Sól. Sed. 2 hs	mg/L	5	1	5	5
DBO ₅	mg/L	200	50	200	20
DQO	mg/L	700	250	500	500
NTK	mg/L	30	10	30	30
Nitrógeno-NH ₃	mg/L	75	25	75	75
Fósforo total	mg/L	10	10	10	10
Coliformes totales	NMP/100mL	20000	2000	2000	20000

1. Colectora cloacal
2. Conducto pluvial o cuerpo de agua superficial
3. Absorción por suelo
4. Mar abierto

Existen distintos tipos de tratamiento de aguas residuales; se pueden usar desde sencillos procesos físicos como la sedimentación, en la que se deja que los contaminantes se depositen en el fondo por gravedad, hasta complicados procesos químicos, biológicos o térmicos.

La digestión microbiana es superior a la incineración ya que es más segura desde el punto de vista ambiental, no requiere inversión de equipos de tecnología avanzada y el tratamiento puede realizarse en el mismo sitio donde se generan los desperdicios.

Los tratamientos biológicos también son superiores a los químicos debido a que los productos finales son de mejor calidad y los costos asociados al tratamiento generalmente son menores. Dadas las ventajas expuestas, el tratamiento biológico es la primera opción a considerar en la depuración de aguas residuales (Rubio, 1995).

1.1.6. Tratamiento biológico de aguas residuales

Existen diferentes formas de agrupar a los tratamientos biológicos:

- 1.- Según el régimen de aireación: Aerobios
 Anaerobios
- 2.- Según el régimen de operación: flujo continuo
 flujo por cargas (batch)
- 3.- Según el tipo de reactor utilizado: cultivos suspendidos
 cultivos fijos

Muchas veces, debido a la complejidad de las aguas a tratar, la combinación de tratamientos es la opción más adecuada. La combinación del régimen de aireación, operación y tipo de reactor da lugar a la variante biotecnológica de la depuración. La selección del tratamiento adecuado depende de diversos factores entre los que se destacan el marco legal local, los objetivos o metas a alcanzar y en general, el contexto local específico donde serán aplicados (Boller, 1997).

En la Provincia de Buenos Aires, una encuesta realizada por SERNAH determinó que el 48% de las industrias dedicadas al procesamiento de alimentos realizaban algún tipo de pretratamiento de sus efluentes generados antes de la descarga final; en un 69% de los casos se practicaba un tratamiento mecánico primario, el 26% un tratamiento químico primario mientras que un 25% tenían un tratamiento secundario o biológico de sus efluentes. Debido a la falta de sistemas de tratamiento adecuados o a problemas de funcionamiento en los ya instalados, el 89% de estas industrias no cumplían con las normas de descarga (informe del Banco

Mundial, 1995).

1.1.7. Tratamiento biológico de aguas residuales por barros activados

Entre los diferentes tipos de tratamientos biológicos de efluentes líquidos, el proceso de lodos activados es uno de los sistemas más difundidos y estudiados. El proceso de lodos activados (también conocido como fangos o barros activados) consta de un reactor o tanque de aireación (Fig. 1.5) y un sedimentador o clarificador secundario (Fig. 1.6).



Figura 1.5. Tanque de aireación de una planta de tratamiento de aguas residuales por barros activados



Figura 1.6. Clarificador secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales por barros activados

El agua residual cruda es descargada en el tanque de aireación y se genera una suspensión la cual es la biomasa activa responsable de la depuración. Esta suspensión pasa a un clarificador donde sedimenta, se concentra en el fondo y el fango concentrado es bombeado nuevamente al tanque de aireación para que recircule por el sistema (Fig. 1.7). La recirculación de los barros puede considerarse la característica fundamental del proceso de barros activados ya que, manteniendo una alta concentración de biomasa en el tanque de aireación, el proceso de tratamiento puede hacerse en un tiempo tecnológicamente aceptable.

Uno de los parámetros más importantes en el modelado y diseño de plantas de tratamiento de efluentes por barros activados es la edad de lodos (θ_x); este parámetro se define como el cociente entre la biomasa total en el tanque de aireación y la producción neta de biomasa por unidad de tiempo (Orhon y Artan, 1994). Debido a que en estado estacionario las velocidades de producción y de salida de biomasa del sistema son similares, la expresión para θ_x correspondiente al sistema representado en la Figura 1.7 en este caso resulta:

$$\theta_x = \frac{V X}{Q_p X_r} \quad (1.1)$$

donde V es el volumen del tanque de aireación. Cabe aclarar que en la Ec. (1.1) se consideró que la concentración de biomasa de entrada (X_o) y de salida (X_e) eran despreciables.

Planteando un balance para la biomasa en el sedimentador se demuestra que:

$$X_r = X \frac{Q_o + Q_r}{Q_p + Q_r} \quad (1.2)$$

Combinando las ecs. (1.1) y (1.2) se obtiene la siguiente expresión:

$$\theta_x = \frac{V}{Q_p} \left(\frac{Q_p + Q_r}{Q_o + Q_r} \right) = \left(\frac{V}{Q_o + Q_r} \right) \left(1 + \frac{Q_r}{Q_p} \right) \quad (1.3)$$

y por lo tanto, un aumento de Q_p determina un descenso en la edad de lodos (θ_x).

Otro parámetro importante es la relación alimento/microorganismo o carga orgánica (F/M) la cual se define como la cantidad de materia orgánica tratada diariamente por unidad de biomasa en el tanque de aireación:

$$F/M = \frac{Q_o S_o}{V X} = \frac{S_o}{\theta_H X} \quad (1.4)$$

donde $\theta_H (= V/Q_o)$ es el tiempo de residencia hidráulico.

Evidentemente parámetros θ_x y F/M están íntimamente relacionados ya que disminuyendo la purga (y por lo tanto se aumenta θ_x), se incrementa la concentración de barros en el tanque de aireación (X) y consecuentemente disminuye F/M. En la Tabla 1.4 se presentan los valores típicos de θ_x , F/M y θ_H utilizados en el diseño y operación de un sistema de tratamiento de efluentes por barros activados.

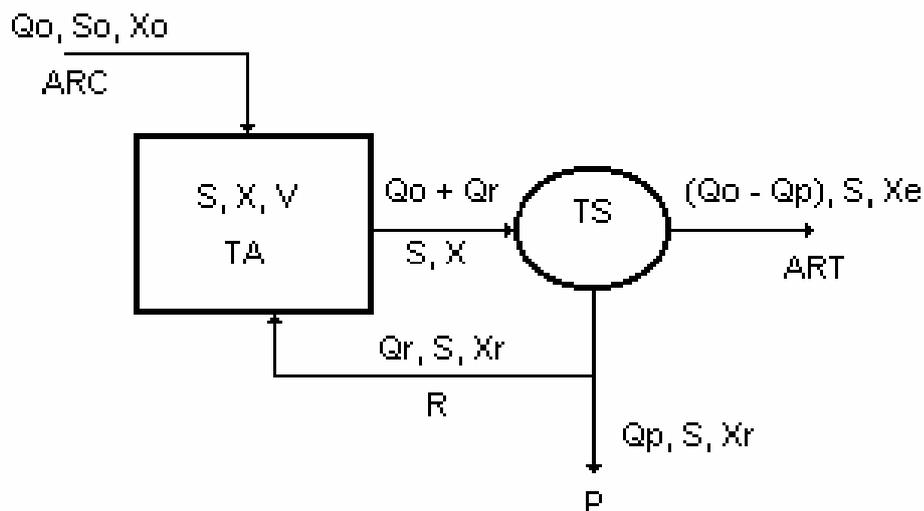


Figura 1.7. Diagrama de un sistema de barros activados de mezcla completa.
 ARC - Agua Residual Cruda; ART - Agua Residual Tratada; TA - Tanque de Aireación;
 TS - Tanque de Sedimentación; R - Reciclo de Barros; P - Purga.

Tabla 1.4. Valores típicos de algunos parámetros utilizados en el diseño y operación de un sistema de tratamiento de efluentes por barros activados (Orhon y Artan, 1994)

		Barro Activado Convencional	Aireación Extendida
θ_x (d)			
Clima	Cálido	3 – 6	10 – 20
	Templado	5 – 10	20 – 30
	Frío	10 – 15	> 30
Relación F/M ($\text{gBOD gSSV}^{-1} \text{d}^{-1}$)			
Clima	Cálido	0.4 – 0.6	0.2 – 0.25
	Templado	0.3 – 0.5	0.1 – 0.2
	Frío	0.2 – 0.4	< 0.1
θ_H (h)			
		3 – 8	12 – 36

La principal ventaja del sistema de barros activados es que puede producir un efluente de muy alta calidad. Comparado con una laguna de oxidación, el proceso de barros activados es capaz de alcanzar reducciones similares para el sustrato soluble pero en reactores con un volumen mucho menor y produciendo un efluente relativamente libre de sólidos suspendidos. Por otra parte, el sistema es controlable ya que a través del ajuste de la cantidad de barro purgado se puede regular el tiempo de residencia celular para obtener la calidad deseada de efluente. Los reactores de barros activados son relativamente resistentes a las condiciones de carga variable pudiendo alcanzar una calidad de efluente aceptable aún en condiciones dinámicas de alimentación; estabilidad que se observa también frente a sustancias tóxicas (Durán, 1999).

Un problema asociado a este tipo de plantas está relacionado con los costos de construcción, operación y mantenimiento los cuales determinan que el proceso de barros activados sea la elección más adecuada solamente en ciertos casos como por ejemplo cuando se desee una alta calidad final del efluente, en el tratamiento de grandes volúmenes de aguas residuales relativamente diluidas o en los casos en que el espacio físico es limitado o costoso. Por otra parte, el exceso de barros debe ser purgado del sistema y tratado adecuadamente antes de su disposición final incrementando los costos de operación (Durán, 1999).

1.1.8. Problemas de separación de barros activados - El bulking filamentoso

Aunque la recirculación de los barros es la clave del proceso de tratamiento de efluentes líquidos por barros activados, es también la principal desventaja y limita sus aplicaciones. El barro activado debe ser separado de la corriente principal de agua ya tratada y luego concentrado de manera que asegure una suficiente concentración de biomasa en el tanque de aireación. Debido a los altos volúmenes que se manejan en una planta de este tipo, la única manera de lograrlo es por sedimentación y posterior concentración del barro por gravedad; esto implica que los barros deben tener buenas propiedades de sedimentabilidad; es evidente entonces que el desempeño del sedimentador ejerce gran influencia en la calidad final del efluente (Jenkins, 1992).

Entre los problemas de separación de sólidos citados en la Tabla 1.5, el bulking filamentoso es uno de los que aparece con más frecuencia en sistemas de barros activados. Según un estudio realizado en Gran Bretaña, el 63% de las plantas de tratamiento de efluentes domésticos presentaron problemas de bulking filamentoso; sin embargo en Francia se observó solamente en el 25% de los casos (Wanner, 1994). Eikelboom y Geurkink (2001) investigaron 71 plantas de tratamiento de efluentes industriales por barros activados situadas en Dinamarca, Alemania, Italia y Holanda encontrando problemas de bulking filamentoso en el 60% de los casos estudiados. Entre las industrias con mayor frecuencia de aparición de bulking filamentoso se destacaron la industria procesadora de papa (se detectó bulking en el 86% de los casos), papeleras (83%), procesadoras de alimentos (70%) y lácteas (60%).

Aunque no existen datos oficiales relacionados con la aparición de bulking en Argentina, se estima que todas las plantas de tratamiento de efluentes cloacales en la Provincia de Buenos Aires han tenido en alguna ocasión problemas relacionados con el bulking filamentoso (Nomdedeu, comunicación personal). Con relación a los efluentes industriales generados en la Provincia de Buenos Aires, Di Marzio (2001) informa haber encontrado problemas de bulking filamentoso en plantas de tratamiento biológico de efluentes provenientes de gran cantidad de industrias entre las que se encuentran las textiles, curtiembres, frigoríficos, farmacéuticas y cerveceras.

1.1.8.1. La estructura del flóculo biológico

Como puede observarse en la Tabla 1.5, la mayoría de los problemas de separación de barros puede asociarse a la estructura del flóculo biológico. La biofloculación es el proceso mediante el cual las bacterias se agregan formando flóculos. La forma, tamaño y composición de éstos determinan las propiedades de sedimentabilidad y en última instancia, el desempeño de la planta (Jenkins, 1992).

Tabla 1.5. Problemas más frecuentes en la separación de sólidos en plantas de tratamiento de efluentes líquidos por barros activados (Jenkins, 1992).

Problema	Causa	Efectos
Crecimiento disperso	No hay formación de flóculos, los microorganismos crecen en forma dispersa.	El efluente queda turbio debido a que no hay sedimentación de los barros.
“Pin floc” o “Pinpoint floc”	Aparecen flóculos pequeños, compactos, quebradizos y de forma esférica. Los agregados grandes sedimentan rápido mientras que los pequeños lo hacen lentamente.	Buenas propiedades de sedimentación pero el efluente aparece turbio.
Bulking viscoso (“bulking no filamentoso”)	Aparición de una gran cantidad de polímeros extracelulares. En casos severos el barro adquiere una consistencia muy viscosa y no puede ser bombeado.	Reducción de la velocidad de sedimentación y en la compactación. En casos severos prácticamente no hay separación de sólidos y los lodos desbordan del sedimentador. Casos más leves son usuales.
“Bulking filamentoso”	Producido por microorganismos filamentosos que se extienden desde el flóculo hacia el seno de la solución. Interfieren en la compactación y sedimentación de los barros.	Malas propiedades de sedimentación pero con un sobrenadante claro. La concentración de lodos en la corriente de recirculación es baja. En casos severos puede haber desborde de barros en el sedimentador.
Barros flotantes	Los procesos de desnitrificación en el sedimentador secundario liberan N ₂ que se une a los flóculos y los mantiene a flote.	Se forma una capa espumosa en la superficie del sedimentador.
Formación de espumas (foaming)	Causada por surfactantes no biodegradables y/o la presencia de ciertas bacterias (<i>Nocardia</i> sp., <i>Microthrix parvicella</i>).	La espuma lleva a la superficie grandes cantidades de barro activado. También se puede acumular en ciertos sectores de la planta generando olores.

Según diversos autores (Eriksson y col., 1992; Urbain y col., 1993; Wanner, 1994; Jorand y col., 1995) la estructura del flóculo esta determinada por diferentes factores:

1.- Tipos de microorganismos presentes (principalmente bacterias)

2.- Cantidad de polímeros extracelulares endógenos (proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos, etc.; producidos por el metabolismo bacteriano o por lisis) y exógenos (ácidos húmicos, celulosa, etc.; provenientes del propio medio).

3.- Presencia de cationes divalentes (principalmente Mg^{+2} y Ca^{+2}) cuyo papel estaría relacionado con la neutralización de cargas negativas en la superficie de las partículas, permitiendo un mayor acercamiento entre sí.

Aunque los tres factores antes mencionados determinan las propiedades de los flóculos, la teoría más ampliamente aceptada en la actualidad resalta el papel de los microorganismos que forman el flóculo (Sezgin y col., 1978). Los microorganismos presentes en los flóculos biológicos pueden agruparse en dos tipos: floculantes (también llamados formadores de flóculo) y filamentosos. Según Sezgin y col. (1978) los microorganismos filamentosos formarían un andamiaje o esqueleto sobre la cual se agregarían los microorganismos floculantes y la estructura del flóculo dependería de la cantidad relativa entre microorganismos filamentosos y floculantes:

* En un barro con buena sedimentabilidad y compactación adecuada, los flóculos pueden acercarse y encajar unos con otros de tal forma que el agua presente entre ellos es repelida (Fig. 1.8).

* Cuando hay exceso de bacterias filamentosas se produce el fenómeno conocido como “bulking filamentoso”, donde aparecen flóculos extendidos, con una baja densidad y en general con malas propiedades de sedimentación (Fig. 1.9).

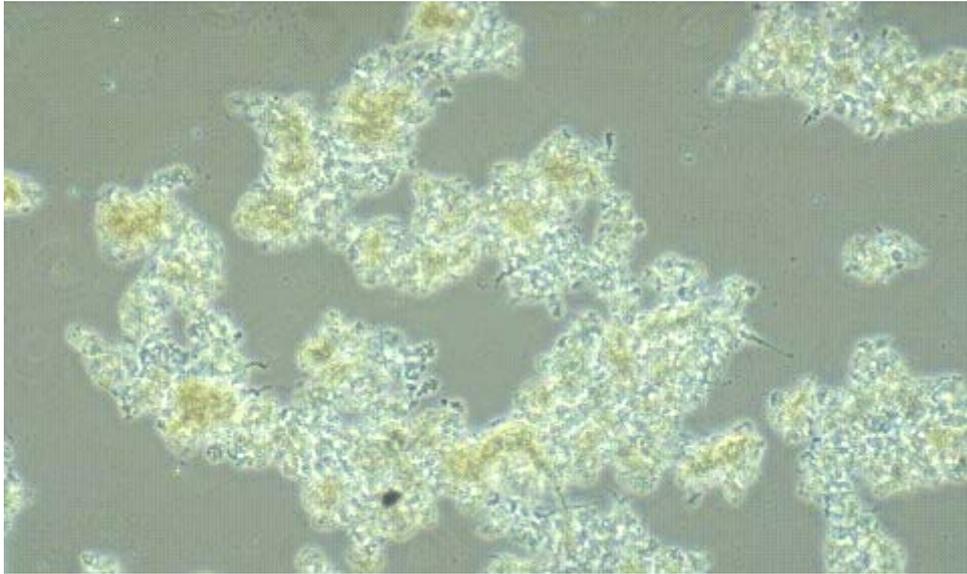


Figura 1.8. Flóculos biológicos con adecuada sedimentabilidad

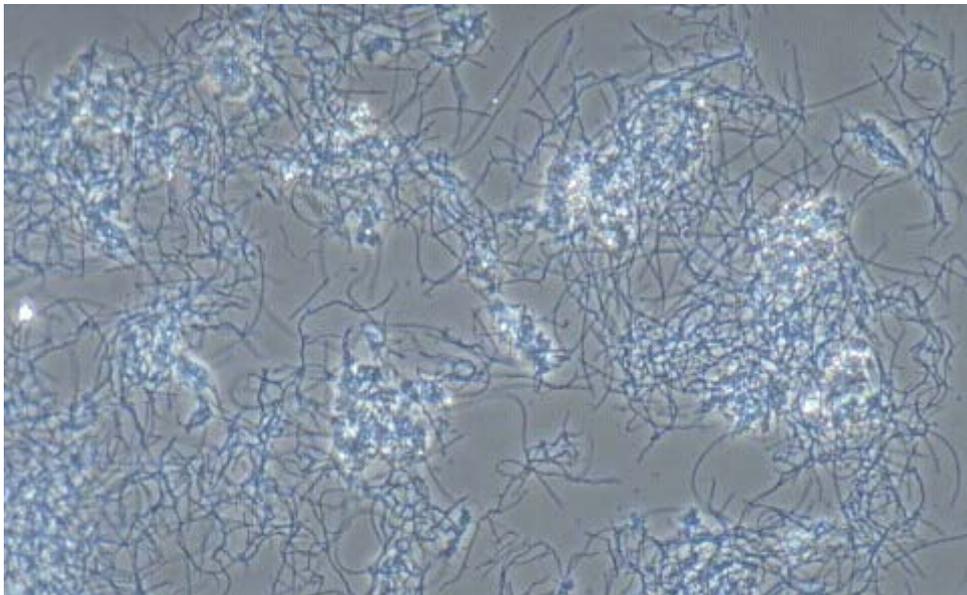


Figura 1.9. Barro activado con problemas de bulking filamentoso

Los microorganismos filamentosos pueden interferir en las características de sedimentabilidad de los barros de dos maneras (Jenkins y col., 1993; Wanner, 1994):

1.- Algunos microorganismos filamentosos pueden crecer bien dentro de los flóculos, generan flóculos de estructura abierta y dentro de esta estructura abierta queda retenida agua. Así, aunque los flóculos se pueden acercar, queda gran cantidad de agua capturada que contribuye a disminuir la densidad de los flóculos y por lo tanto los barros presentan una baja velocidad de sedimentación.

2.- Un mecanismo alternativo de acción de los microorganismos filamentosos es impedir el acercamiento de los flóculos. La mayoría de los microorganismos filamentosos observados en barros con “bulking filamentosos” crecen formando extensiones que salen de la superficie de los flóculos. Estas extensiones impiden en forma mecánica el acercamiento de los flóculos y por lo tanto queda agua retenida en este espacio generando barros que sedimentan lento y se compactan poco.

El ambiente en el cual se desarrollan los microorganismos en el sistema de barros activados ejerce una cierta presión de selección de tal forma que en determinadas condiciones los microorganismos filamentosos son seleccionados frente a los floculantes provocando bulking. Esta selección puede ser de dos tipos (Wanner, 1994):

1.- Selección cinética: donde los parámetros cinéticos del crecimiento serían determinantes en la cantidad relativa de cada tipo de bacteria.

2.- Selección metabólica: relacionada con tipos de sustratos, disponibilidad de oxígeno, presencia de agentes inhibidores o tóxicos, micronutrientes, etc.

El balance entre los microorganismos filamentosos y floculantes determina la estructura de los flóculos y por lo tanto su capacidad de sedimentación. Como el desempeño global del sistema de tratamiento de aguas residuales por barros activados depende del buen funcionamiento del sedimentador secundario (Jenkins, 1992), el balance entre los microorganismos filamentosos y floculantes determina en definitiva la eficiencia del tratamiento.

Es importante aclarar que aunque un exceso de microorganismos filamentosos produce un importante deterioro en la sedimentabilidad de los barros, la completa eliminación de los mismos tampoco es conveniente debido a que se forma un barro compuesto por flóculos pequeños, que se denomina “pin-point floc”. Estos flóculos son quebradizos (la turbulencia del tanque de aireación es suficiente para romperlos) produciendo efluentes turbios con gran cantidad de bacterias en suspensión.

1.1.8.2. Clasificación de los microorganismos filamentosos

El método convencional para identificar bacterias comprende una serie de etapas: su aislamiento de cultivos mixtos, la determinación de diferentes propiedades morfológicas, bioquímicas y fisiológicas y finalmente comparación de los resultados obtenidos con referencias estándar (por ejemplo, el Manual Bergey). Sin embargo, debido a que la mayoría de los microorganismos filamentosos observados en barros activados aún no tienen una posición taxonómica determinada o no han sido estudiados, toda la literatura relacionada con el tema se basa en la clasificación desarrollada por Eikelboom y van Buijsen (1981) la cual fue posteriormente ampliada por Jenkins y col. (1993) y Eikelboom y Geurkink (2001).

Las técnicas de identificación empleadas para la clasificación se basan en la observación microscópica de diferentes características morfológicas y propiedades de tinción de los microorganismos filamentosos presentes en una muestra de barros activados (una descripción detallada puede encontrarse en Jenkins y col., 1993 y Wanner, 1994); los diferentes microorganismos filamentosos son generalmente identificados como “Tipos” (Tipo 1701, 021N, etc.) aunque algunos tienen nombres en latín (*Microthrix parvicella*, *Nocardia*, etc.). La lista de microorganismos filamentosos incluye 15 Tipos y 13 bacterias referidas con nombre en latín (Jenkins y col., 1993); recientemente se han identificado 40 nuevos tipos presentes en plantas barros activados de diferentes industrias (Tipo Ind-1, Ind-2, etc.) en Dinamarca, Alemania, Italia y Holanda (Eikelboom y Geurkink, 2001).

La frecuencia de aparición de cada microorganismo filamentosos puede variar en forma notable entre los diferentes países (Tabla 1.6) debido a diferentes causas como por ejemplo configuración de la planta de tratamiento, características de las aguas residuales, factores meteorológicos, etc. Por otra parte, cuando aparece un problema de bulking generalmente se observa que hay un microorganismo filamentosos dominante y uno o varios en menor proporción. Aunque se asocie el microorganismo dominante con el problema de bulking, en algunas ocasiones los microorganismos presentes en menor proporción pueden ser los que más afecten la sedimentación (Wanner, 1994). Las diferencias observadas en la Tabla 1.6 también pueden deberse

a problemas de identificación de los microorganismos causantes del bulking, especialmente con microorganismos muy emparentados como por ejemplo *S. natans* y el Tipo 1701 (Hao y col., 1983; Richard y col., 1985).

Tabla 1.6. Microorganismos filamentosos dominantes en plantas de tratamiento de efluentes cloacales con problemas de bulking en diferentes países (Wanner, 1994)

Frecuencia	Checoslovaquia	Suiza	Alemania	Estados Unidos	Holanda
1	<i>S. natans</i>	<i>S. natans</i>	Tipo 0092	<i>Nocardia sp.</i>	<i>M. parvicella</i>
2	Tipo 021N	Tipo 021N	<i>M. parvicella</i>	Tipo 1701	Tipo 021N
3	<i>Thiothrix sp.</i>	Tipo 0961	Tipo 0041	Tipo 021N	<i>H. hidrossis</i>
4	Tipo 0041	--	<i>S. natans</i>	Tipo 0041	Tipo 0092
5	<i>H. hidrossis</i>	--	<i>Nocardia sp.</i>	<i>Thiothrix sp.</i>	Tipo 1701
6	<i>N. limicola</i>	--	<i>H. hidrossis</i>	<i>S. natans</i>	Tipo 0041
7	<i>M. parvicella</i>	--	<i>N. limicola</i>	<i>M. parvicella</i>	<i>S. natans</i>

van der Waarde y col. (2001) realizaron un relevamiento de 81 plantas de tratamiento de efluentes provenientes de diferentes industrias por barros activados con problemas de bulking filamentoso de Europa; entre los microorganismos filamentosos más frecuentemente observados se encontraban *Haliscomenobacter hydrossis* (en el 58% de los casos estudiados), *Thiothrix* (38%) y *Sphaerotilus natans* (25%). Adicionalmente, estos autores observaron *S. natans* en plantas de tratamiento de efluentes provenientes de la industria procesadora de papas (45%), industrias lácteas (30%), procesadoras de alimentos (27%) y carnes (20%).

Con relación a la frecuencia de aparición de microorganismos filamentosos en plantas de tratamiento de efluentes con problemas de bulking en la Provincia de Buenos Aires, Di Marzio (2001) encontró que *Sphaerotilus natans* y el Tipo 021N eran los microorganismos filamentosos dominantes en el 30% de los casos estudiados; también fueron observados los Tipos 1701, 0041, 0092, 1863, *Thiothrix* y *Microthrix* aunque en menor proporción.

1.1.8.3. Factores que determinan la aparición de bulking filamentoso causado por *Sphaerotilus natans*

Sphaerotilus natans es uno de los microorganismos filamentosos que más

frecuentemente genera bulking en plantas de barros activados que tratan aguas residuales provenientes de la industria alimenticia. Se han informado casos de bulking producido por *S. natans* en plantas de tratamiento de efluentes de las industrias procesadoras de papas (Eikelboom, 1977), de carnes y aves (Strom y Jenkins, 1984), de frutas y en cervecerías (ATV Working Group 2.6.1., 1989).

Los factores que determinan la aparición de bulking causado por *Sphaerotilus natans* pueden agruparse en generales y específicos (Jenkins y col., 1993). Los factores generales incluyen el tiempo de residencia hidráulico (θ_H), el tiempo de retención celular o edad de lodos (θ_X), la relación alimento/microorganismo (F/M) y la configuración del tanque de aireación. Entre los factores específicos que determinan la aparición de bulking causado por *Sphaerotilus natans* se encuentran la baja concentración de oxígeno disuelto (OD) en el tanque de aireación, aguas residuales con déficit de nutrientes (nitrógeno o fósforo) y presencia azúcares u otros sustratos fácilmente biodegradables.

Beccari y col. (1980) observaron que disminuyendo θ_H se mejoraba la floculación debido a que se favorecía el desarrollo de las bacterias adherentes respecto de las formas dispersas; mientras las primeras se aglutinaban en flóculos o se pegaban a las superficies del tanque, las formas dispersas se lavaban. Sin embargo en otros trabajos se encontraron resultados opuestos. Tanaka y col. (1985) observaron que el cultivo mixto tenía mejores propiedades de sedimentabilidad cuando el biorreactor era operado con un alto θ_H . Por el contrario, trabajando con valores bajos de θ_H aparecían serios problemas de bulking filamentoso.

Richard (1989) observó que θ_X y la relación F/M determinaban la aparición de ciertos tipos de microorganismos filamentosos; sin embargo, *S. natans* aparecía en un amplio rango de valores de θ_X (1.9 a 8 días) y F/M (0.2 a 0.8 gBOD gSSV⁻¹ d⁻¹).

Posteriormente, Barbusinski y Koscielniak (1995) vincularon la relación F/M con la función de distribución de tamaños de los flóculos. Con una alta relación F/M se encontró un aumento en el tamaño medio y una mayor dispersión en la función de distribución de tamaños. Sin embargo, cuando se trabajó con una relación F/M de 0.1 a 0.3 gDQO gSSV⁻¹ d⁻¹, los flóculos se tornaron quebradizos (debido a la falta de microorganismos filamentosos) determinando una disminución en su tamaño medio.

Algunos autores afirman que un tanque de aireación trabajando en condiciones de flujo pistón o compartimentalizado tiene mejor desempeño y es más estable a la aparición de bulking filamentoso que trabajando en régimen de mezclado completo; este efecto se conoce como efecto selector (Chudoba y col., 1973, 1985; Jenkins y col., 1993; Wanner, 1994). Cuando un barro activado esta sujeto a una secuencia de

condiciones en las cuales se alternan períodos con y sin alimentación, los microorganismos presentes deben adaptarse a esta situación desarrollando la habilidad de captar y almacenar rápidamente el sustrato soluble que se adiciona en los períodos de alimentación para ser utilizado posteriormente. Debido a que muchos microorganismos filamentosos parecen no poseer esta capacidad de rápida captación y almacenamiento de sustrato pero sí los microorganismos floculantes, el desarrollo de los primeros en un sistema de este tipo se vería desfavorecido en relación a los últimos (Jenkins y col., 1993).

Wu y col. (1984) observaron que a medida que aumentaba el número de compartimentos del tanque de aireación, el sistema más se aproximaba a un flujo pistón ideal, mejoraba la capacidad de reducir la DQO, disminuía la cantidad de microorganismos filamentosos, el sistema era aparentemente más resistente a la aparición de bulking filamentosos. Sin embargo, en algunos experimentos estos autores encontraron una mayor cantidad de bacterias en suspensión junto con un marcado descenso de filamentosos.

Con relación al efecto de la concentración de oxígeno disuelto (OD) existe la aceptación generalizada que un valor de OD menor a 1 mg/L en el tanque de aireación favorece el desarrollo de microorganismos filamentosos respecto de los floculantes (Strom y Jenkins, 1984; Richard y col., 1985; Jenkins y col., 1993). Estudios realizados por Tanaka y col. (1985) con cultivos puros de bacterias filamentosas (*Sphaerotilus sp.*) y floculantes (*Pseudomonas sp.*) indicaron que en condiciones de OD bajo ($OD < 1$ mg/L) los microorganismos floculantes crecían en forma dispersa mientras que los filamentosos daban formas filamentosas extendidas. Sin embargo, en condiciones de OD alto ($OD > 1$ mg/L) los microorganismos floculantes se agregaban formando flóculos mientras que los filamentosos formaban pellets de estructura relativamente compacto. Los autores determinaron además que los cambios de estructura observados eran reversibles en relación a la concentración de OD.

Di Marzio (2001) estudió 10 plantas de tratamiento de efluentes con problemas de bulking filamentosos en la Provincia de Buenos Aires y encontró que la abundancia *S. natans* disminuía a medida que aumentaba el OD en el tanque de aireación de tal forma que para una concentración de OD mayor a 3 mg/L no se observó bulking generado por este microorganismo.

Con relación al déficit de nutrientes (nitrógeno o fósforo), algunos autores sugieren que una relación $DQO:N > 20$ gDQO/gN o $DQO:P > 100$ gDQO/gP en el agua residual a tratar favorecería la aparición de bulking filamentosos por *S. natans* (Richard y col., 1985; Wanner, 1994). Sin embargo, se han encontrado casos de predominio de *S. natans* en sistemas que trataban efluentes con relaciones DQO:N o

DQO:P bastante más bajas (Burke y col., 1986; Still y col., 1986). Adicionalmente, Jenkins y col. (1993) asocian la deficiencia de nutrientes con la presencia de otros microorganismos filamentosos como por ejemplo los Tipos 021N, 0041, 0675 y *Thiothrix* spp.

Como se discutió previamente, las industrias procesadoras de vegetales generan grandes cantidades de agua residual con una alta carga orgánica dada principalmente por sustancias fácilmente biodegradables. Según Strom y Jenkins (1984) y Jenkins y col. (1993), la presencia altas concentraciones de azúcares (glucosa, fructosa), ácidos orgánicos de cadena corta (acetato) y otros sustratos fácilmente biodegradables determinaría el desarrollo excesivo de los microorganismos filamentosos *S. natans*, *Haliscomenobacter hydrossis*., *Nostocoida limicola*, Tipo 021N, *Thiothrix* spp y Tipo 1851.

A pesar de la gran cantidad de informes que indican que la aparición de bulking filamentoso por *S. natans* se favorece bajo ciertas circunstancias, en la actualidad muchos de ellos están siendo cuestionados. Aunque la mayoría de los estudios abarcan unos pocos parámetros a la vez, existe una estrecha relación entre éstos. Por ejemplo, la temperatura afecta a la solubilidad del oxígeno, el nivel de oxígeno disuelto afecta el balance de la población microbiana el cual determina una variación en la relación sustrato/biomasa; a su vez, este cambio podría afectar la producción de polímeros extracelulares, etc. Como se ve en el ejemplo, existe una estrecha relación de las variables y el intento de agruparlas es solamente para facilitar su estudio.

Por otra parte, es raro que un barro activado con problemas de bulking contenga un solo tipo de microorganismo filamentosos y usualmente aparece uno o más predominantes y varios en cantidades menores; sin embargo, la mayoría de los estudios asocian la causa del problema con el o los microorganismos filamentosos predominantes. Debido a esto, muchos factores asociados a la presencia de algún microorganismo filamentosos en particular que aparecen en la literatura resultan poco claros y hasta en ciertas ocasiones contradictorios.

S. natans presenta una marcada tendencia a crecer pegado a las paredes de los reactores y cañerías de los reactores formando un biofilm. De esta manera el sistema puede ser continuamente reinoculado con microorganismos provenientes de este biofilm lo cual puede ser un efecto muy importante en reactores de laboratorio (Jenkins y col., 1993). Por ejemplo, Gaab y col., (1989) observaron que *S. natans* era el causante de bulking en sistemas de remoción de nitrógeno por barros activados escala laboratorio; sin embargo, este microorganismo nunca fue visto en este tipo de configuración en sistemas reales. Los autores atribuyeron la diferencia de comportamiento observada al efecto de crecimiento de *S. natans* en las paredes del

reactor empleado en su estudio.

En la Tabla 1.7 se presentan las condiciones en las cuales *S. natans* fue encontrado como microorganismo dominante en plantas de barros activados escala laboratorio. Como puede observarse, no parecen existir condiciones claras que permitan predecir en qué situación prevalecerá *S. natans* desencadenando un problema de bulking filamentoso. Jenkins y col. (1993) sospechan que la gran variedad de condiciones en las cuales predominó *S. natans* se debe a dos factores; por un lado una incorrecta identificación del microorganismo filamentoso dominante pero principalmente al efecto de reinoculación desde las paredes previamente comentado.

1.1.9. Control del bulking filamentoso

El bulking filamentoso genera problemas tanto desde el punto de vista ambiental (se produce una fuga de sólidos del sedimentador afectando la calidad del efluente final) como económico (sanciones y multas debido a la falta de cumplimiento de los parámetros de descarga y costos asociados a la solución del bulking); por lo tanto, el objetivo primordial es evitar la aparición de un problema de este tipo o bien, una vez que se produce, resolverlo rápidamente.

En la actualidad existen dos estrategias o métodos de control del bulking filamentoso: métodos específicos (también llamados biológicos) y métodos no específicos. Los métodos específicos comprenden medidas preventivas a fin de obtener una adecuada composición microbiana de los barros. Estos métodos se centran en las causas del bulking filamentoso y se basan en controlar y/o suprimir selectivamente el desarrollo de microorganismos filamentosos sin alterar o favoreciendo el desarrollo de los microorganismos floculantes (Cech y col., 1985; Jenkins y col., 1993; Wanner, 1994).

Tabla 1.7. Condiciones de operación para las que *S. natans* fue encontrado como microorganismo dominante en plantas de barros activados escala laboratorio (Gabbs y col., 1989)

Autor	Condiciones de operación					
	DQO/N	DQO/P	OD (mg/L)	F/M (gDQO gSSV ⁻¹ d ⁻¹)	θ_H (h)	θ_x (d)
Houtmeyers y col. (1980)	--	--	6	0.4	1	7
Lee y col. (1982)	16.3	--	4.5 - 16	0.31 - 1.00	19	15
Rensink y col. (1982)	15.9	92.7	--	--	--	--
van den Eynde y col. (1982)	83	--	--	--	1	--
Wu y col. (1983)	95 y 28	--	7 - 8	0.2 - 0.4	24	--
Gabb y col. (1985)	--	--	5 - 8	--	2.5	12 - 14
Burke y col. (1986)	12.6	24	2 - 4	1.26	3.8	--
Still y col. (1986)	5.4	--	1 - 7	0.35	24	20

Una vez que se ha tomado algún tipo de medida con relación al control específico de los microorganismos filamentosos, pueden pasar varios meses hasta que el cambio en la población microbiana se vea reflejado en una mejora de la sedimentabilidad de los barros (Palm y col., 1980; Wheeler y col., 1984). Sin embargo, durante un episodio de bulking filamentosos la prioridad es proteger la calidad del efluente final y por lo tanto se deben aplicar medidas correctivas que sean de efecto inmediato. En este sentido, los métodos no específicos de control de bulking filamentosos tienen como objetivo tratar los síntomas del exceso de microorganismos filamentosos en el barro activado con el fin de proteger la calidad final del efluente. Sin embargo, debido a que no se cambian las condiciones que causaron el bulking filamentosos, los problemas reaparecerán cuando se suspenda el tratamiento. Por lo tanto, luego de la aplicación de un método no específico debe buscarse la causa del bulking aplicando algún método específico de control del bulking filamentosos.

Los métodos no específicos de control de bulking filamentoso pueden ser agrupados en tres categorías (Jenkins y col., 1993):

1.- Manejo del caudal de reciclo (Q_r) y de los puntos de alimentación al tanque de aireación.

2.- Adición de agentes químicos (floculantes o coagulantes) con el objeto de mejorar la velocidad de sedimentación y compactación de los barros.

3.- Agregado de agentes tóxicos (biocidas) los cuales inactivan selectivamente a los microorganismos filamentosos.

En la actualidad la cloración es el método más ampliamente utilizado para el control del bulking filamentoso. Uno de los principales problemas que presenta esta técnica es que la dosificación continúa siendo básicamente empírica y se corre el riesgo de eliminar toda la flora. Adicionalmente, se generan productos secundarios de la cloración muchos de los cuales se desconoce su toxicidad por lo que este método está siendo cuestionado (Switzenbaum y col., 1992).

Las especies activas son el hipoclorito (ClOH) y las cloraminas (principalmente ClNH_2), las cuales se forman por reacción del hipoclorito con el amonio del medio. Exceptuando los tanques con nitrificación total (en donde se elimina el amonio) todas las plantas tienen la cantidad de amonio necesaria para que se formen cloraminas. Las cloraminas reaccionan lentamente con el barro y puede penetrar dentro de los flocúlos, el hipoclorito reacciona rápidamente y su poder penetrante es menor. Ya que los filamentosos se extienden hacia afuera del flocúlo mientras que los floculantes parecen tener una ubicación más interna, es posible que esta ubicación interna les brinde cierta protección (aunque sea hacia el hipoclorito) que los filamentosos externos no poseen. Sin embargo, este tipo de protección hacia las cloraminas parece ser despreciable (Neethling y col., 1987).

Evidentemente, el éxito de cualquier estrategia de control del bulking filamentoso por métodos específicos depende del conocimiento profundo del desarrollo de ambos tipos bacterianos presentes en el sistema y de las relaciones existentes entre ellos. Lamentablemente, hasta ahora el conocimiento que se tiene de este complejo sistema (es decir, los barros activados considerados como un ecosistema artificial) no es suficiente como para alcanzar estos objetivos ya que solamente se conocen sus lineamientos generales (Wanner, 1994).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Realizar un estudio comparativo de los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan el desarrollo de un microorganismo filamentosos y uno floculante con el objeto de hallar las condiciones operativas que permitan controlar la aparición de bulking debido al desarrollo excesivo de microorganismos filamentosos en sistemas de tratamiento de efluentes de la industria procesadora de vegetales por barros activados. A tal efecto se utilizará *Sphaerotilus natans* como microorganismo filamentosos y un microorganismo floculante que se aislará e identificará de una planta de tratamiento de efluentes de la industria procesadora de vegetales por barros activados.

1.2.2. Objetivos específicos

1.- Analizar la composición de un sistema modelo de efluente proveniente de la industria procesadora de vegetales a efectos de determinar las principales fuentes de carbono disponibles para su utilización por parte de *S. natans* y de microorganismos floculantes presentes en barros activados.

2.- Aislar microorganismos floculantes provenientes de diferentes muestras de barros activados.

3.- Analizar el desarrollo en cultivo puro de microorganismos floculantes y de *S. natans* en medios sintéticos con diferentes fuentes de carbono, según los resultados encontrados en el punto 1.

4.- Evaluar diferentes técnicas de determinación de biomasa; desarrollar y evaluar una técnica mediante la cual los resultados se obtengan en términos de DQO.

5.- Estudiar el efecto de la relación entre la concentración de la fuente de nitrógeno y la de carbono en la alimentación (C:N) en el desarrollo de un microorganismo floculante.

6.- Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan el desarrollo del microorganismo floculante en sistemas continuos en un medio limitado en carbono.

7.- Estudiar el efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de *S. natans*; determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan el crecimiento de *S. natans* en un medio limitado en carbono en cultivo continuo.

8.- Estudiar el efecto del pH sobre *S. natans* en un medio limitado en carbono en sistemas batch mediante técnicas clásicas y respirométricas.

9.- Desarrollar una técnica basada en análisis de imágenes para determinar la composición de un cultivo mixto compuesto por *Sphaerotilus natans* y un microorganismo floculante; aplicar la técnica desarrollada en el estudio de cultivos mixtos de *Sphaerotilus natans* y de la cepa E932 en sistemas continuos y realizar el modelado matemático de los resultados obtenidos.

CARACTERIZACION DE UN SISTEMA MODELO DE EFLUENTE DE LA INDUSTRIA PROCESADORA DE VEGETALES

Las aguas residuales generadas por las industrias procesadoras de alimentos son un sistema complejo, cambiante y químicamente indefinido; por ello, los estudios cinéticos del desarrollo de microorganismos en este tipo de medio están sujetos a una gran variabilidad. Con el objeto de trabajar en un sistema más controlado, en el presente Capítulo se analiza la composición de un sistema modelo de efluente proveniente de la industria procesadora de vegetales. Los resultados obtenidos sirven de base para el posterior desarrollo de un medio de cultivo sintético con características similares al sistema modelo de efluente proveniente de la industria procesadora de vegetales.

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Obtención del sistema modelo efluente

El sistema modelo de efluente de la industria procesadora de productos vegetales se generó poniendo en contacto tubérculos de papas (*Solanum tuberosum*) cortados en cubos de 1 cm de lado en agua corriente a temperatura ambiente (Bertola y col., 1999). Se tomaron muestras del líquido resultante a distintos tiempos las cuales fueron filtradas utilizando membranas Millipore HA 45 μm . Las muestras fueron mantenidas a -20°C para ser posteriormente analizadas.

2.1.2. Análisis del efluente

El análisis del sistema modelo de efluente en una primera etapa incluyó las determinaciones más frecuentemente utilizadas en la caracterización de aguas residuales: pH, demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno total Kjeldhal (NTK) y fósforo total (P_T).

El pH fue determinado con un peachímetro Hach modelo EC30. La calibración del equipo se realizó periódicamente mediante el empleo de soluciones tampón de pH 4.0, 7.0 y 13.0, disponibles comercialmente (Hach).

Las determinaciones de la demanda química de oxígeno DQO se realizaron mediante un kit comercial (Hach, método 8000) que consistía en un reactor (DQO Reactor Model 456000) para el tratamiento térmico de las muestras a 150°C a reflujo

cerrado durante dos horas. Posteriormente los tubos conteniendo la mezcla de reacción se dejaban enfriar y se determinaba la absorbancia a 620nm con un espectrofotómetro Hach DR/2000. Mediante una curva de calibración que estaba incorporada en el equipo, las lecturas de absorbancia eran convertidas automáticamente en valores de DQO.

El nitrógeno total (NTK) fue medido según la técnica de Kjeldhal en un equipo Büchi (Büchi Laboratoriums-Technik, Flawil, Switzerland).

Las determinaciones de fósforo total (P_T) se realizaron mediante un kit comercial (Hach, método 8190). El procedimiento consistía en una hidrólisis ácida en presencia de persulfato de potasio a 105 °C durante 30 minutos con el objeto de transformar todas las especies presentes de fósforo a ortofosfato. Posteriormente se neutralizaba con hidróxido de sodio y se agregaba molibdato de amonio. El ortofosfato reacciona con molibdato formando un complejo el cual es reducido mediante el agregado de ácido ascórbico generando un intenso color azul que se determinaba espectrofotométricamente a 890 nm.

Los datos bibliográficos disponibles indicaban que la papa es una importante fuente de ácidos orgánicos así como sacarosa, glucosa, fructosa y polisacáridos diversos (Talbert y Smith, 1987). En base a esto, en una segunda etapa del análisis del sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales se realizaron estudios con el objeto de identificar y cuantificar algunas de las sustancias presentes.

La determinación de ácidos orgánicos se realizó según la técnica desarrollada por Picha (1985). Las muestras fueron filtradas utilizando membranas Millipore HA de 0.45 μ m y el filtrado se analizó con un equipo de HPLC Shimadzu con columna Aminex HPX-87H de Biorad. Como fase móvil se utilizó H_2SO_4 0.009N, con un flujo de 0.7 ml/min, presión 580-600 psi, modo isocrático y temperatura 58-62°C. Como detector se utilizó un arreglo de fotodiodos mediante el cual se realizaba un espectro de absorción ultravioleta entre 195 y 300nm del líquido de salida del HPLC. La cuantificación de los ácidos identificados se realizó a partir de patrones de ácidos orgánicos (Merck). Para cada patrón se obtuvo el tiempo de elución, el espectro de absorción correspondiente y la curva de calibración que vincula el área del pico con la concentración del patrón para 10 μ L de volumen de muestra.

La medida de concentración de glucosa se realizó utilizando un kit comercial (Wiener Lab., línea líquida). Este método se basa en que la glucosa es oxidada enzimáticamente por glucosa oxidasa (GOD) dando como resultado agua oxigenada y ácido glucónico. El agua oxigenada, en presencia de peroxidasa (POD), produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona (4-AF) dando lugar a la formación de un cromógeno color rojo-cereza con una absorbancia máxima a 505nm.

Las determinaciones se efectuaron sobre muestras filtradas por membranas de 0.45 μ m (Millipore HA) a fin de eliminar la interferencia debida a los microorganismos presentes.

La determinación de la concentración de azúcares totales solubles (ATS) se realizó mediante la reacción del ácido fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados producen un color amarillo-anaranjado cuando reaccionan con una mezcla de fenol (8 gr de fenol en 2 ml de agua destilada) y ácido sulfúrico concentrado. El procedimiento consiste en mezclar 2 ml de muestra con 50 μ l de la solución de fenol. Luego se agrega 5 ml de ácido sulfúrico concentrado de tal forma que se obtenga un buen efecto de mezclado. Se deja reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente, se agita y se espera el desarrollo de color por otros 10 - 20 minutos a 25 - 30 °C. El color obtenido es estable por varias horas y se cuantifica espectrofotométricamente a 485nm; la absorbancia es lineal con la concentración hasta aproximadamente 100 mg/L. Los blancos se preparan sustituyendo la muestra con agua destilada. La cantidad de azúcares se determina por referencia a una curva patrón; en el presente trabajo estas curvas se realizaron con glucosa y por lo tanto, los resultados se expresan en mgGlucosa/L.

2.2. Resultados y Discusión

2.2.1. Análisis del sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales

Las determinaciones de pH, demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno total Kjeldhal (NTK) y fósforo total (P_T) correspondientes al sistema modelo de efluente fueron realizadas en función del tiempo de contacto agua-papa. Se observó que los valores de DQO, NTK y P_T aumentaban cuanto mayor era el tiempo de contacto papa-agua (Tabla 2.1); sin embargo, el pH se mantuvo aproximadamente constante en 6.5 durante el primer día mientras que al segundo día descendió a 5.5.

La papa es una fuente importante de micronutrientes como por ejemplo Ca, Mg, Fe, S, Zn, Cu, Mn, Co, Ni y Mo. Adicionalmente, todos los aminoácidos están presentes, los cuales en ciertos casos pueden ser factores de crecimiento para diversas especies microbianas (Talbert y Smith, 1987). Por lo tanto, la limitación del desarrollo microbiano queda determinada por la cantidad relativa de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, la cual es aproximadamente igual a la relación DQO:N:P.

Según diversos autores (Jenkins y col., 1993; Orhon y Artan, 1994; Wanner, 1994; Winkler, 1996), la relación DQO:N:P adecuada para la remoción de carbono en

aguas residuales debe ser aproximadamente de 100:5:1. Esto implica que una relación DQO:N menor a 20:1 corresponde a un exceso de fuente de nitrógeno mientras que si el cociente DQO:P es menor a 100:1 hay un exceso de fósforo en relación a la fuente de carbono. Cabe aclarar que estas relaciones son aproximadas pudiendo variar según el tipo de sustrato y microorganismos presentes en el sistema; por lo tanto, deben ser consideradas solamente como valores guía.

Como puede observarse en la Tabla 2.1, en el caso del sistema modelo de agua residual, cuando el tiempo de contacto papa-agua estaba comprendido entre 2.5 y 20.5 horas la relación DQO:N era aproximadamente 10:1 mientras que la relación DQO:P estaba comprendida entre 65:1 y 114:1; estos resultados indicaron que en las condiciones estudiadas el agua residual contenía un exceso de nitrógeno y fósforo en relación a la fuente de carbono siendo este último el sustrato limitante del desarrollo microbiano.

Los resultados obtenidos concuerdan con los hallados por Wijbenga y col. (1984). Estos autores encontraron una relación DQO:N:P de 110:9:1 y 71:6:1 para aguas residuales provenientes de la industria del almidón de papa sin desproteinizar y desproteinizadas respectivamente; asimismo, el pH estaba comprendido entre 6.0 y 6.2.

Tabla 2.1. Caracterización del sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales en función del tiempo de contacto papa-agua

t(h)	pH	DQO (mg/L)	NTK (mgN/L)	P _T (mgP/L)	DQO:N:P	DQO:N	DQO:P
0.2	6.5	1170	25.2	12.6	93:2:1	46:1	93:1
2.5	6.4	2288	260.4	34.4	67:8:1	9:1	67:1
6.5	6.6	2840	291.8	44.0	65:7:1	10:1	65:1
20.5	6.5	5412	574.7	47.7	114:12:1	9:1	114:1
48.0	5.5	6580	589.7	85.3	77:7:1	11:1	77:1

2.2.2. Determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC

Los resultados de la determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC se ejemplifican en la Figura 2.1 donde se muestra un cromatograma típico de las sustancias encontradas en el agua residual analizada. El primer pico (5.27 min.) corresponde al agua, fosfatos y otros compuestos no identificados. Posteriormente se observó un pico a los 5.65 minutos correspondiente al ácido oxálico, coincidente con lo encontrado por Picha (1985) para el análisis de batatas. En la Figura 2.2a se puede observar el espectro de absorción correspondiente a un patrón de ácido oxálico y el correspondiente al pico de 5.67 minutos para el efluente analizado, observándose una muy buena concordancia entre ambos lo cual confirma la identificación del compuesto.

El siguiente pico (5.98 min.) no fue identificado; sin embargo, Picha (1985) ha informado que entre el ácido oxálico y el ácido cítrico aparece un pico correspondiente al ácido oxalacético.

A los 6.45 minutos aparecía el pico correspondiente al ácido cítrico. Como se puede observar en la Figura 2.2b, el espectro de absorción correspondiente a este pico y a un patrón de ácido cítrico son similares.

Se observó que para las muestras correspondientes a tiempos de contacto menores a 6.5 horas, aparecía un único pico a los 7.6 minutos. Sin embargo, para las muestras de agua residual obtenidas a tiempos de contacto mayores, este pico se dividía en dos de 7.53 y 7.77 minutos, siendo este último muy cercano al tiempo de retención del ácido málico (7.72) (Fig. 2.1). Esta zona corresponde a una mezcla de ácido málico y glucosa debido a que las condiciones experimentales no permiten la separación de ambas sustancias (Picha, 1985).

Los picos correspondientes a los ácidos láctico y acético aparecían a los 10.14 y 12.14 minutos respectivamente. En las Figuras 2.2c y 2.2d se puede observar que los espectros de absorción obtenidos para estos picos son similares a sus respectivos patrones.

Se verificó que si bien el ácido propiónico tiene un tiempo de retención de 14.32 minutos, el pico de los 14.42 minutos no corresponde a este ácido debido a que el espectro de absorción UV del pico hallado no coincidía con el espectro del patrón.

El análisis cromatográfico se continuó hasta los 25 min. sin que aparecieran otros picos cuantitativamente importantes. Los cromatogramas correspondientes a las muestras del sistema modelo de agua residual obtenidas a diferentes tiempos de contacto mostraron resultados cualitativamente similares.

Una vez que se identificaron algunos de los ácidos orgánicos presentes en el sistema modelo de efluente, se realizaron curvas de calibración para los ácidos oxálico, cítrico, láctico y acético relacionando el área del pico correspondiente a cada ácido con su concentración (Fig. 2.3); en la Tabla 2.2 se presentan los resultados obtenidos.

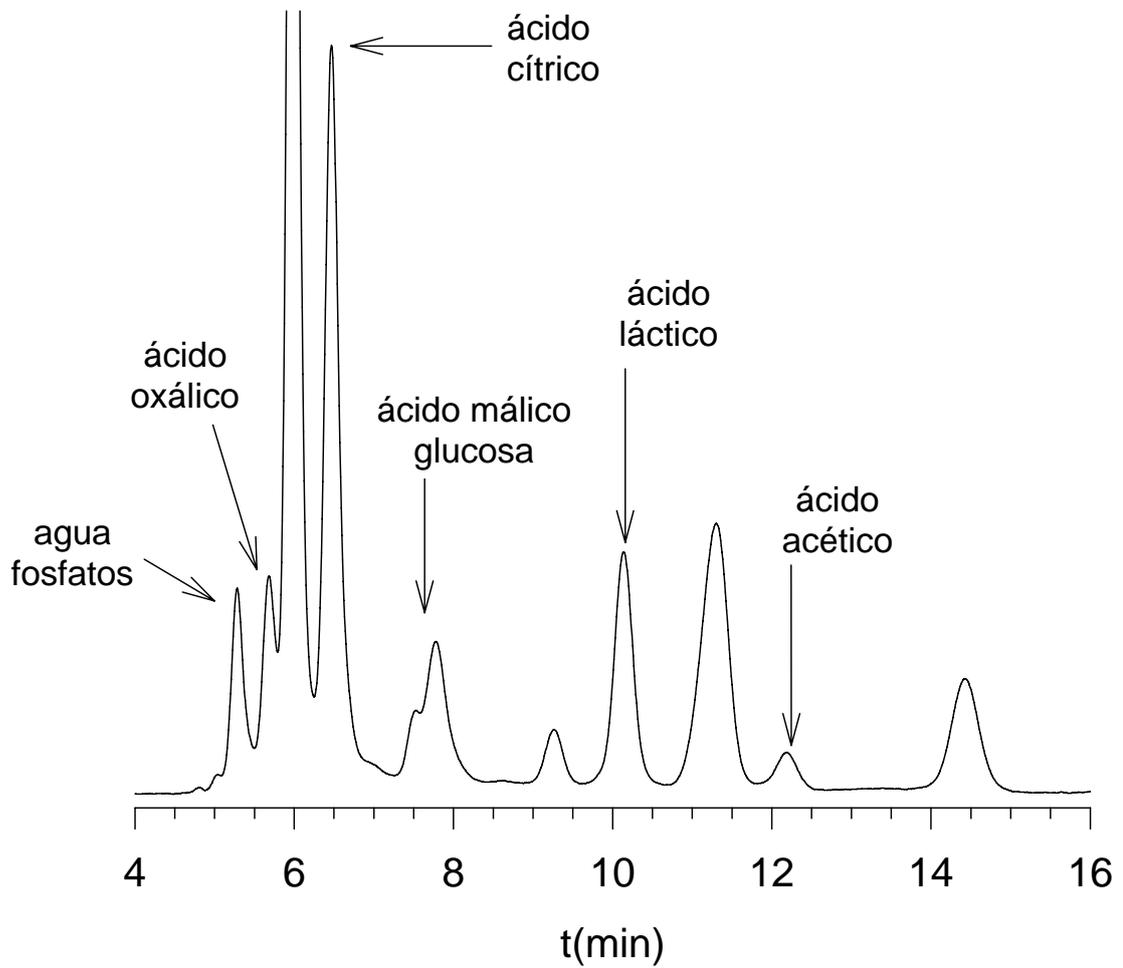


Figura 2.1. Cromatograma correspondiente a la determinación de ácidos orgánicos en el sistema modelo de efluente de la industria procesadora de papas

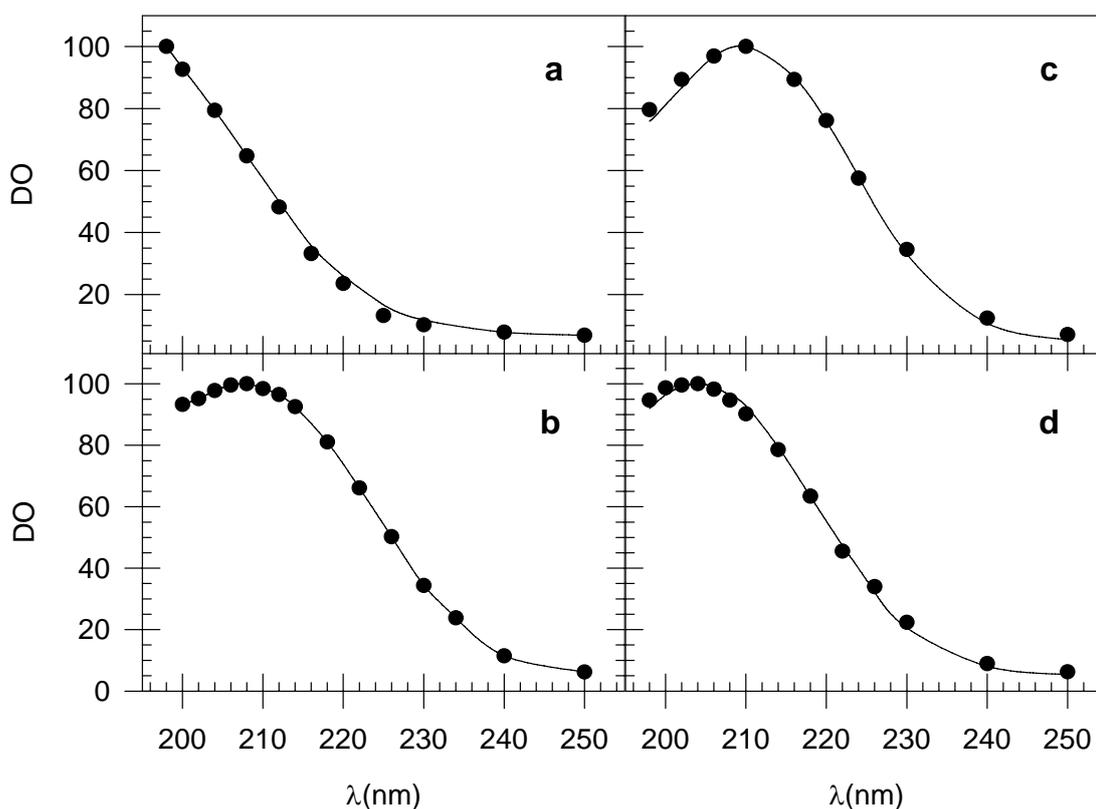


Figura 2.2. Comparación entre los espectros de absorción UV para los ácidos orgánicos identificados: (a) Oxálico, (b) Cítrico, (c) Láctico, (d) Acético.

(I) Sistema modelo de efluente. (—) Curva correspondiente al patrón respectivo

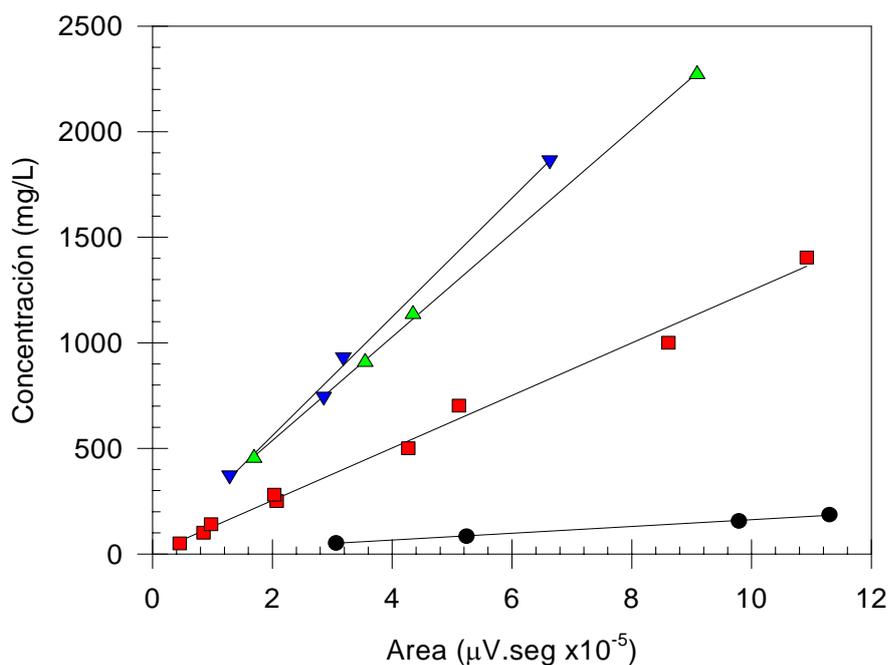


Figura 2.3. Curvas de calibración para la determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC: (l) Oxálico, (n) Cítrico, (s) Láctico, (t) Acético.

Tabla 2.2. Parámetros correspondientes a las curvas de calibración para la determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC.

Acido orgánico	Pendiente (x10 ⁶)	DE (x10 ⁶)	CV (%)	r ²	n
Oxálico	162.4	1.653	1.02	0.9982	4
Cítrico	1250	26.18	2.10	0.9921	9
Láctico	2529	28.39	1.12	0.9996	4
Acético	2808	49.71	1.77	0.9961	4

DE: Desvío estándar

CV: Coeficiente de Variación

r²: Coeficiente de correlación

n: número de datos

2.2.3. Composición del agua residual en función del tiempo de contacto

Como puede observarse en la Tabla 2.3, se encontraron grandes diferencias cuali-cuantitativas en la composición del agua residual en función del tiempo de contacto papa-agua. Hasta aproximadamente las 6.5 hs de contacto, la composición del sistema modelo de efluente fue el resultado de la difusión de las diferentes sustancias que naturalmente están presentes en el vegetal como por ejemplo glucosa, dextrinas y ácidos orgánicos tales como oxálico y cítrico (Talbert y Smith, 1987). En este caso, el ácido cítrico fue el compuesto identificado que se encontraba en mayor proporción. También se encontró ácido láctico, posiblemente como producto de la actividad microbiana ya que no es un ácido orgánico que se encuentre naturalmente en la papa.

A las 20.5 hs, la glucosa y los azúcares totales solubles descendieron; a su vez, comenzó a aparecer ácido acético. Finalmente, hacia las 48 hs de tiempo de contacto, el agua residual estaba compuesta principalmente por ácidos láctico y acético (producidos por la actividad microbiana) mientras que quedaba algo de azúcares una pequeña cantidad de solubles.

Con el objeto de realizar una comparación entre los resultados obtenidos y datos bibliográficos disponibles, se calcularon las relaciones ácido cítrico/DQO, ácido oxálico/DQO y azúcares solubles totales (ATS) /DQO. En el caso del sistema modelo de efluente analizado en el presente trabajo se utilizaron los datos presentados en la Tabla 2.3 para tiempos de contacto menores a 20.5 horas; en estas condiciones la relación cítrico/DQO se hallaba comprendida entre 0.15 - 0.16; la relación oxálico/DQO era de 0.005 - 0.009 mientras que el cociente ATS/DQO varió entre 0.11 - 0.23. Asimismo, a partir de los datos informados por Wijbenga y col. (1984) para aguas residuales provenientes de la industria del almidón de papa la relación cítrico/DQO varió entre 0.09 - 0.18, el cociente oxálico/DQO se hallaba comprendido entre 0.04 - 0.08 y la relación ATS/DQO se hallaba comprendida entre 0.14 - 0.27. Como puede observarse, salvo una discrepancia en relación al oxálico, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los hallados por Wijbenga y col. (1984).

Tabla 2.3. Composición del sistema modelo de efluente en función del tiempo de contacto papa-agua

t(h)	Glucosa*	ATS*	Oxálico*	Cítrico*	Láctico*	Acético*
0.2	74	250	10	176	n.d.	n.d.
2.5	149	500	19	350	n.d.	n.d.
6.5	197	640	19	436	136	n.d.
20.5	6	600	27	890	753	157
48	3	340	65	n.d.	1579	468

* Las concentraciones se expresan en mg/L

ATS: azúcares totales solubles

n.d.: no detectado

2.3. Conclusiones del Capítulo

A partir de los resultados obtenidos en relación al análisis de la composición del sistema modelo efluente, pueden enunciarse las siguientes conclusiones generales:

* El sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales es un medio limitado en fuente de carbono.

* Se observaron importantes diferencias en la composición para efluentes obtenidos a tiempos de contacto papa - agua, cortos o largos. Las sustancias presentes a tiempos de contacto cortos provienen principalmente de la papa y por lo tanto, la composición del efluente es más característica de las industrias que procesan este tipo de vegetal. En este caso se identificaron dos fuentes de carbono mayoritarias: ácidos orgánicos (principalmente ácido cítrico) y carbohidratos (glucosa y otros azúcares).

* Para el efluente que resulta de tiempos de contacto más largos, la composición es resultado de la actividad fermentativa microbiana (aparecen los ácidos acético y láctico); esto determina que la composición en este tipo de muestras sea más variable e indefinida.

CARACTERIZACION DE LAS CEPAS BAJO ESTUDIO

En el presente Capítulo se describen las experiencias realizadas con el objeto de aislar y caracterizar microorganismos floculantes provenientes de barros activados y de productos comerciales utilizados como mejoradores de floculación en plantas de barros activados. Asimismo se realiza una caracterización de la cepa filamentosa *Sphaerotilus natans* ATCC #29329. A partir de los resultados obtenidos en el presente Capítulo se desarrolla un medio de cultivo sintético con características similares al sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales descrito en el Capítulo anterior el cual permite el crecimiento de los microorganismos estudiados.

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Planta de barros activados escala laboratorio

Las muestras de barros activados fueron extraídas de dos reactores escala laboratorio que se encontraban en funcionamiento en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Los reactores consistían en un recipiente de acrílico de 4.8 l el cual estaba dividido en dos secciones mediante un panel regulable, una de ellas era la cámara de aireación mientras que la otra sección era el sedimentador. Mediante la altura del panel se podía regular el espacio que conectaba ambas secciones. El reactor era alimentado mediante bombas peristálticas las cuales descargaban en la cámara de aireación. El oxígeno era provisto mediante burbujeadores los cuales además proveían la agitación.

3.1.2. Microorganismos estudiados

La cepa floculante E932 fue aislada a partir de una muestra proveniente de la planta de barros activados escala laboratorio. En el momento del aislamiento, dicha planta era alimentada con el sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales (papas) cuyas características fueron descritas en el Capítulo 2.

Las cepas floculantes JB, B y C fueron aisladas de productos comerciales (mejoradores biológicos de la floculación para tanques de sedimentación de plantas de barros activados) provistos por la empresa Winor S.A.

El microorganismo filamentoso *Sphaerotilus natans* ATCC #29329 fue adquirido en la American Type Culture Collection.

3.1.3. Medios de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de las cepas floculantes

* Caldo arginina (Crabtree y McCoy, 1967): expresados en g/l, salvo aclaración

Arginina	0.5
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2
Vit. B12	2 µg/l
Biotina	2 µg/l
Penicilina G	5 unidades/ml

Las vitaminas y la penicilina G fueron esterilizadas por filtración y agregadas al resto del medio en forma estéril.

* Caldo test de floculación (Crabtree y McCoy, 1967): Caldo arginina + glucosa 50 g/l
Las sales, arginina y glucosa fueron autoclavadas a 120 °C durante 15 min. Las vitaminas y la penicilina G fueron esterilizadas por filtración y agregadas al resto del medio en forma estéril.

* Caldo CGY (Okrend y Dondero, 1964): los valores están expresados en g/l.

Caseína	5
Extracto de levadura	1
Glicerol	5

* Agar CGY: caldo CGY + 1.5% de agar.

3.1.4. Procedimiento de aislamiento de bacterias floculantes

El aislamiento de las bacterias floculantes se realizó a partir muestras de barros activados. Dichas muestras provenían de la planta escala laboratorio que se encontraba en funcionamiento en el CIDCA. El aislamiento se realizó mediante una modificación de la técnica de Crabtree y McCoy (1967):

a.- Se dejó decantar la muestra durante una hora. Se retiró el sobrenadante y se lavó con un volumen similar de buffer fosfato estéril (pH 7.2). Se repitió el lavado otras dos veces. Este procedimiento permitió eliminar gran parte de las células libres y los restos celulares.

b.- El sedimento lavado se homogeneizó en un equipo Onmi Mixer estéril. Se hicieron 7 a 10 pulsos de agitación de 30 segundos cada uno a la mitad de la velocidad máxima, con intervalos de 30 segundos por vez.

c. 5 ml de homogenato fueron inoculados en 50 ml de caldo arginina. Se incubó a 30 °C durante 24 hs con una agitación de 200 rpm.

d.- El caldo se homogeneizó nuevamente según el punto (b).

e.- Se realizaron diluciones apropiadas del homogenato en agua estéril (10⁻⁴ a 10⁻⁸). Posteriormente se sembró 0.1 ml en triptona soja agar (TSA) (Merck) en superficie y se incubó a 30 °C durante 24 a 48 hs.

f.- Las colonias aisladas fueron sometidas a observaciones microscópicas (tinción de Gram) para verificar su pureza. De cada colonia aparentemente pura se realizó una siembra en caldo arginina y en caldo test de floculación. Se incubó a 30 °C durante 24 a 48 hs. Cuando no se observó floculación en el primero de los medios pero sí en el segundo se repitió el procedimiento desde el punto (e) otras dos veces.

g.- Las cepas aisladas fueron mantenidas en agar CGY mediante repiques periódicos.

3.1.5. Caracterización de los microorganismos en estudio

Los microorganismos empleados en el presente estudio fueron caracterizados según su morfología, coloraciones (Gram, Neisser y gránulos de poli-β-hidroxibutirato), utilización de diferentes fuentes de carbono y pruebas bioquímicas específicas para su identificación.

3.1.6. Observaciones microscópicas

Las observaciones de microscopía óptica se realizaron con un microscopio Leitz Ortholux II, con cámara fotográfica incorporada y utilizando el sistema óptico de contraste de fases y por iluminación directa. Las observaciones de microscopía

electrónica se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión que se encuentra en funcionamiento en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

3.1.7. Coloraciones

3.1.7.1. Coloración de Gram, método modificado por Hücker (Jenkins y col., 1993)

Permite diferenciar las bacterias Gram negativas de las Gram positivas mediante la capacidad de retener el colorante cristal violeta.

Reactivos (se deben preparar cada 3 - 6 meses):

Solución 1: se prepara a partir de la mezcla de las soluciones A y B.

Solución A: 2 gr cristal violeta + 20 ml etanol (95%)

Solución B: 0.8 gr oxalato de amonio + 80 ml agua destilada (AD)

Solución 2: 1 gr yodo + 2 gr yoduro de potasio + 300 ml AD

Decolorante: etanol 95%

Solución 3: 10 ml solución de safranina al 2.5% p/v en etanol + 100 ml AD

Procedimiento:

La muestra se coloca en un portaobjetos y se deja secar a temperatura ambiente (no fijar por calor).

	(seg)
Solución 1	60
Solución 2	30
Enjuagar con agua	variable
Decolorar	25
Enjuagar con agua	variable
Solución 3	180
Enjuagar con agua y dejar secar	

Los preparados se observan por inmersión a 1000X con iluminación directa. Se consideran bacterias Gram positivas aquellas que aparecen azul-violáceas, mientras que las bacterias Gram negativas aparecen rosas.

3.1.7.2. Coloración de Neisser (Jenkins y col., 1993)

Permite diferenciar diferentes tipos de bacterias mediante la capacidad de retener el colorante marrón de Bismark.

Reactivos (se deben preparar cada 3 - 6 meses):

Solución 1: se prepara a partir de la mezcla de 2 volúmenes de A y uno de B.

Solución A: 0.1 gr azul de metileno + 5 ml etanol (95%) + 5 ml ácido acético glacial + 100 ml AD

Solución B: 3.3 ml cristal violeta (10%p/v en etanol 95%) + 6.7 ml etanol (95%) + 100 ml AD

Solución 2: 33.3 ml marrón de Bismark (1%p/v) + 66.7 ml AD

Procedimiento:

La muestra se coloca en un portaobjetos y se deja secar a temperatura ambiente (no fijar por calor).

	(seg)
Solución 1	30
Enjuagar con agua	1 - 5
Solución 2	60
Enjuagar con agua y dejar secar	

Los preparados se observan por inmersión a 1000X con iluminación directa. Se considera positivo la aparición un color azul-violáceo en forma de gránulos o en toda la célula, mientras que las bacterias negativas se observan marrón-amarillo.

3.1.7.3. Gránulos de poli- β -hidroxibutirato (Jenkins y col., 1993)

Permite caracterizar las bacterias por las inclusiones citoplasmáticas de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB).

Reactivos:

Solución 1: Sudan Black B (IV), 0.3%p/v en etanol al 60%

Solución 2: Safranina O, 0.5%p/v en solución acuosa

Procedimiento:

La muestra se coloca en un portaobjetos, se deja secar a temperatura ambiente y se sigue el siguiente protocolo:

Solución 1	10 minutos
Enjuagar con agua	1 - 5 seg
Solución 2	10 seg
Enjuagar con agua y dejar secar	

Los preparados se observan por inmersión a 1000X con iluminación directa. Las inclusiones de PHB aparecen como puntos intracelulares negro-azulados y el citoplasma rosa claro.

3.1.8. Utilización de diferentes fuentes de carbono

Los resultados obtenidos en el análisis de la composición del sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales indicaron que las principales fuentes de carbono presentes eran ácidos orgánicos y carbohidratos (Capítulo 2). En base a esto, se seleccionaron ácido cítrico, ácido acético y glucosa como los compuestos más representativos de este tipo de efluente y se estudió la capacidad de desarrollo de las diferentes cepas aisladas en medios sintéticos con éstos compuestos como única fuente de carbono.

Los estudios de desarrollo en medios sólidos se realizaron utilizando placas de Petri en un medio salino mínimo con diferentes fuentes de carbono adicionado con 1.5% de agar. A continuación se detalla la composición del medio empleado:

Fuente de carbono*	2400 mgDQO/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2000 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	400 mg/L
CaCl ₂	50 mg/L
KH ₂ PO ₄	500 mg/L
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	2000 mg/L
Vitamina B12	100 µg/L
Solución M1	1 mL/L
Solución M2	1 mL/L

* ácido cítrico, ácido acético o glucosa

Solución M1 (g/100mL): FeSO₄.7H₂O, 1.5; ZnSO₄.7H₂O, 0.5; MnSO₄.H₂O, 0.3; CuSO₄.5H₂O, 0.075; CoCl₂.6H₂O, 0.015; ácido cítrico, 0.6.

Solución M2 (g/100mL): (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0.05; BO₃H₃, 0.01; IK, 0.01.

Se ajustó el pH a 7 ± 0.1 con NaOH 1M. La esterilización se realizó mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos. La vitamina B12 se esterilizó por filtración y se agregó al medio previamente esterilizado.

3.1.9. Pruebas bioquímicas

3.1.9.1. Oxidasa

La enzima Citocromo Oxidasa es responsable de la oxidación del Citocromo C (forma reducida), transformándose ella misma en una forma reducida e inactiva. Durante la transferencia de electrones hacia el oxígeno molecular, la especie reducida de Citocromo Oxidasa es nuevamente oxidada regenerándose la especie activa. En presencia de oxígeno molecular el sistema Citocromo Oxidasa/Citocromo C es capaz de reducir gran cantidad de sustancias orgánicas.

En este test se usó el kit comercial Bactident® Oxidasa de Merck. El test utiliza una mezcla de 1-Naftol y cloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio embebidos en una tira reactiva. En presencia de oxígeno molecular y el complejo citocromo oxidasa/citocromo C se forma un compuesto de condensación (azul de indofenol).

Procedimiento: tomar con ansa una colonia aislada y esparcirla sobre la tira con los reactivos. Entre los 20 y 60 segundos se compara con una escala de azules. La aparición de un color azul revela la presencia del sistema citocromo oxidasa/citocromo C.

3.1.9.2. Identificación de las cepas aisladas

La identificación de alguna de las cepas aisladas se realizó mediante la utilización del kit comercial SensIdent EM-Ident E (Merck). Este test es específico para bacterias Gram negativo - Oxidasa negativo y consta de 22 pruebas bioquímicas (Tabla 3.1). A continuación se detalla el procedimiento empleado:

1.- Preparación del inóculo: se toma una colonia bien aislada de un cultivo puro Gram-negativo, oxidasa negativo, en agar nutritivo y se la suspende en 3 - 5 ml de solución salina fisiológica estéril (0.85 - 0.90%). La turbidez se ajusta a un patrón de Mc Farland de 0.5 ($10^6 - 10^8$ UFC/ml).

2.- Inoculación: se agregan en cada pozo de reacción 100 μ l de la suspensión anterior. En los pozos en que se necesita anaerobiosis se agregan 50 μ l de aceite mineral estéril.

3.- Incubación: una vez inoculada la placa, se sella con una tira adhesiva provista por el fabricante se incuba durante 18 - 24 horas a 35 - 37 °C. Si no hay crecimiento en el pozo control, se incuba por otras 18 - 24 horas.

4.- Interpretación: a partir de los resultados se obtiene un código de 7 dígitos. El código resultante se busca en el libro de códigos de referencia del kit, el cual indica género y especie de la bacteria investigada con un nivel de confiabilidad de la identificación que depende del resultado de las pruebas.

Tabla 3.1. Pruebas bioquímicas empleadas en la caracterización de las cepas estudiadas

Triptofano desaminasa	Producción de ácido sulfhídrico
Esculina	Indol
Ureasa	Lisina decarboxilasa
Ornitina decarboxilasa	Arginina dehidrolasa
Glucosa	Citrato
Malonato	Voges-Proskauer
Ramnosa	Sacarosa
Adonitol	Inositol
Xilosa	Sorbitol
ONPG (o-Nitrofenil- β -galactósido)	ONPX (o-Nitrofenil- β -xylopiranósido)
PGUR (p-Nitrofenil- β -glucurónido)	Reducción de nitratos

3.2. Resultados y Discusión

3.2.1. Aislamiento de cepas floculantes

A partir del procedimiento descrito previamente se aislaron cuatro cepas con características floculantes que se denominaron E932, JB, B y C. En la Tabla 3.2 se presentan algunas características generales de las cepas aisladas.

Tabla 3.2. Características generales de las cepas floculantes aisladas

Cepa	Morfología	Agrupación	Gram	Oxidasa
E932	cocobacilo	aislado o formando pares	-	-
JB	cocobacilo	aislado o formando pares	-	-
B	bacilo	Aislado	+	-
C	bacilo corto	Aislado	+	-

3.2.2. Utilización de diferentes fuentes de carbono por las cepas floculantes aisladas y por *Sphaerotilus natans*

En la Figura 3.1 se presentan los resultados obtenidos en relación a la utilización de las diferentes fuentes de carbono por las diferentes cepas estudiadas. Como puede verse, la cepa B presentó pobre desarrollo en general, siendo el acetato la fuente de carbono más favorable para su crecimiento. La cepa C fue la única que no desarrolló en acetato y el crecimiento en citrato fue bueno aunque lento. El aspecto más notorio de la cepa C fue el rápido y abundante desarrollo en glucosa.

El comportamiento de las cepas E932 y JB resultó similar; ambas cepas mostraron desarrollo abundante tanto en citrato como en acetato pero el desarrollo en glucosa resultó muy escaso. Debido a que las cepas E932 y JB eran muy similares tanto morfológica y fisiológicamente, se realizó su tipificación mediante una serie de 22 pruebas bioquímicas (Tabla 3.3). Se encontró que los microorganismos aislados pertenecían al género *Acinetobacter* especie *anitratus* con un 99.83% de certeza para la cepa E932 y un 99.49% para la cepa JB.

En la Figura 3.2 se presentan micrografías correspondientes a la cepa E932 la cual fue cultivada en el medio con citrato como única fuente de carbono descrito

previamente. Se observó una buena concordancia entre las características citadas por Juni (1984) para el género *Acinetobacter* y las encontradas en el presente trabajo. Las bacterias del género *Acinetobacter* son bacilos cortos de 0.9 a 1.6 μm de diámetro y 1.5 a 2.5 μm de largo pero se tornan esféricas en fase estacionaria y aparecen normalmente aisladas o formando pares. Su temperatura óptima de desarrollo esta comprendida entre 20 y 30 °C, presentan buen crecimiento en medios complejos, la mayoría puede crecer en medios sintéticos con una única fuente de carbono y energía, amonio como fuente de nitrógeno y no requieren de factores de crecimiento. Sin embargo, algunas cepas son capaces de oxidar glucosa a ácido glucónico para la obtención de energía pero no pueden utilizarla como fuente de carbono (Juni, 1984). Es posible que debido a esto, la prueba de glucosa resultó positiva para las cepas E932 y JB (Tabla 3.3) mientras que no se observó desarrollo en las placas de Petri con glucosa como única fuente de carbono (Fig. 3.1).

Como se explicó en la sección de Materiales y Métodos del presente Capítulo, el aislamiento de las cepas floculantes se realizó utilizando caldo arginina el cual contenía 5 U/ml de penicilina-G sódica; por lo tanto, las cepas aisladas deben ser resistentes a dicho antibiótico, al menos hasta la concentración utilizada. En este sentido, Juni (1984) informó que todas las cepas pertenecientes al género *Acinetobacter* aisladas en hospitales son resistentes a la penicilina-G y que el crecimiento de algunas cepas salvajes no es inhibido con concentraciones de penicilina-G de hasta 100 U/ml.

Las bacterias del género *Acinetobacter* están presentes normalmente en suelo y aguas (Juni, 1984) así como también en sistemas de tratamiento de aguas residuales por barros activados (Converti y col., 1995). Mediante técnicas de identificación similares a las empleadas en el presente estudio, diferentes autores informan que el género *Acinetobacter* comprende entre el 48% al 73% del total de la población bacteriana presente en barros activados (Buchan, 1983; Lotter, 1985; Kerdachi y Healey, 1987); por lo tanto, es altamente probable el aislamiento de bacterias del género *Acinetobacter* a partir de muestras de barros activados o de productos comerciales mejoradores de la floculación ya que éstos últimos son fabricados a partir de barros activados.

Fig 3.1 fotos-fc.doc

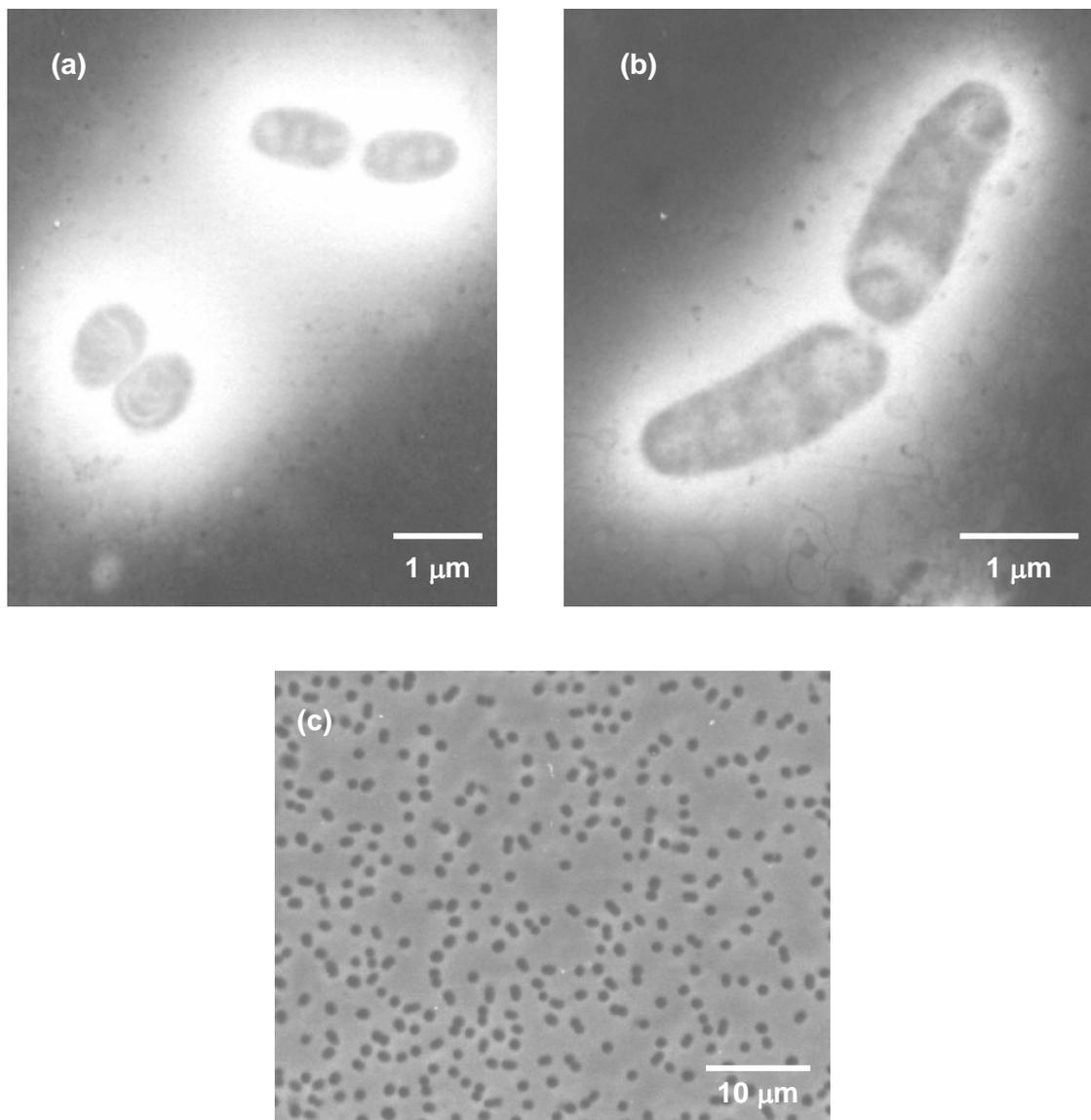


Figura 3.2. Micrografías correspondientes a cepa E932. Cultivo en agua peptona al 0.1% durante 24 horas a 30 °C. (a) 10000X, (b) 15000X (microscopio electrónico de transmisión), (c) 1000X (contraste de fases).

Tabla 3.3. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de las cepas E932 y JB

Prueba	E932	JB	Prueba	E932	JB
Triptofano desaminasa	(-)	(-)	Producción de H₂S	(-)	(-)
Esculina	(-)	(-)	Indol	(-)	(-)
Ureasa	(+)	(-)	Lisina decarboxilasa	(-)	(-)
Ornitina decarboxilasa	(+)	(-)	Arginina dehidrolasa	(+)	(-)
Glucosa	(+)	(+)	Citrato	(+)	(+)
Malonato	(+)	(-)	Voges-Proskauer	(+)	(+)
Ramnosa	(-)	(-)	Sacarosa	(-)	(-)
Adonitol	(-)	(-)	Inositol	(-)	(-)
Xilosa	(+)	(+)	Sorbitol	(-)	(-)
ONPG	(-)	(-)	ONPX	(-)	(-)
PGUR	(-)	(-)	Reducción de nitratos	(-)	(-)

3.2.3. Caracterización de la cepa filamentosa *Sphaerotilus natans* ATCC #29329

El aspecto típico de *Sphaerotilus natans* ATCC #29329 se muestra en la Figura 3.3. *S. natans* es un microorganismo que forma filamentos relativamente largos; dentro de los filamentos se observan bacilos Gram y Neisser negativos, de extremos redondeados, formando cadenas (Fig. 3.3.a), contenidos en una vaina ajustada y fácilmente visible (Fig. 3.3.b, c). El tamaño de las células varía entre 1 a 3.5 μm de ancho y 2.5 a 16 μm de largo (Dondero, 1975). En ciertas ocasiones, aparecen filamentos con espacios vacíos donde faltan las células y la continuidad del filamento está determinada por la vaina (Fig. 3.3.c); también pueden aparecer ramificaciones falsas. La vaina es un complejo formado por proteínas, lípidos y polisacáridos química y anatómicamente diferente de la pared celular; la producción de vaina esta asociada a la presencia de calcio en el medio. Las células contienen gránulos sudanifílicos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) pudiendo acumular hasta un 30 - 40% de su peso. Se ha

visto que el Mg^{+2} estimula la utilización de este polímero pero el Mn^{+2} inhibe su utilización (Dondero, 1975).

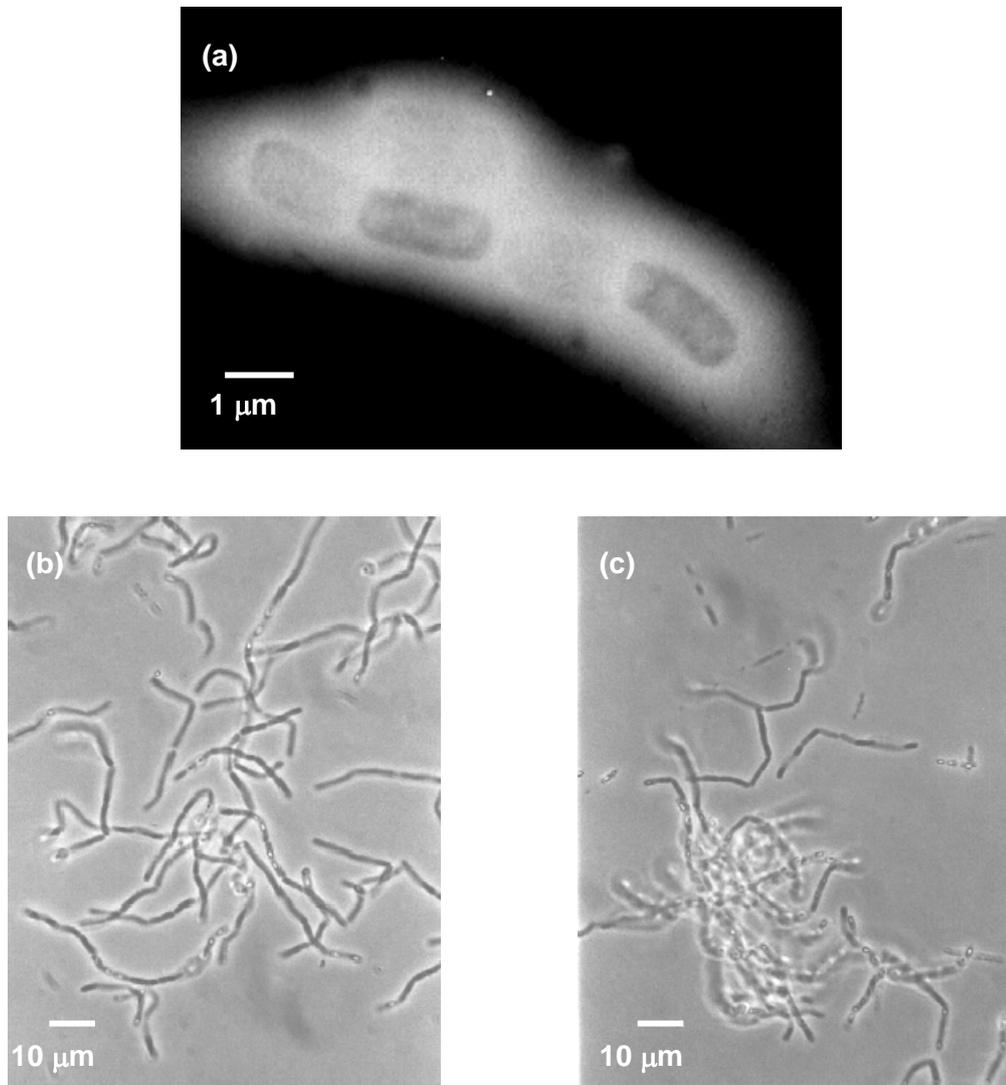


Figura 3.3. Micrografías de *Sphaerotilus natans* ATCC #29329 obtenido en medio CGY a 30 °C y 48 hs. (a) 8000X, microscopio electrónico de transmisión, (b) y (c) 1000x, contraste de fases

3.2.4. Fuentes de carbono utilizadas por *Sphaerotilus natans* ATCC #29329

Con fines comparativos, se realizaron ensayos de utilización de diferentes fuentes de carbono similares a los realizados para las cepas floculantes. Como se puede observar en la Figura 3.1, la cepa *S. natans* ATCC #29329 pudo crecer en todos los medios ensayados aunque se desarrollaba más rápida y abundantemente en un medio con acetato o citrato que con glucosa.

Kämpfer y col. (1995) estudiaron cualitativa y cuantitativamente los requerimientos nutricionales de *S. natans* en sistemas batch sin agitación observando buen desarrollo en un medio con concentraciones de acetato entre 0.2 y 0.5 g/L como única fuente de carbono. Sin embargo, encontraron que el desarrollo fue pobre con menores concentraciones de acetato o con glucosa entre 0.2 a 2 g/L.

Con respecto a la posibilidad del *S. natans* de crecer en un medio con citrato como única fuente de carbono, la bibliografía resulta contradictoria. Según datos de Mulder (1989) el citrato puede ser utilizado por el microorganismo como fuente de carbono; sin embargo, en el trabajo de Richard y col. (1985) el citrato aparece dentro de una lista de compuestos que no son usados por *S. natans* como fuente de carbono. Es posible que esta discrepancia se deba al estudio de diferentes cepas.

En este sentido, Pellegrini y col. (1999) aislaron cuatro cepas de *Sphaerotilus* sp. a partir de diferentes muestras de barros activados de plantas de tratamiento de aguas provenientes de industrias productoras de pasta de papel. Estos autores encontraron profundas diferencias fisiológicas las cepas que ellos aislaron y las cepas tipificadas *S. natans* DSM 6575(T), DSM 565 y DSM 566 en relación a la metabolización de polisacáridos complejos, azúcares, polialcoholes y ácidos orgánicos.

3.2.5. Desarrollo de *S. natans* y de la cepa E932 en cultivos puros en medio líquido utilizando diferentes fuentes de carbono

Como se observa en la Figura 3.1, la cepa E932 no puede crecer en un medio con glucosa como única fuente de carbono; sin embargo, la prueba de la glucosa para la cepa E932 resultó positiva (Tabla 3.3). Estos resultados sugieren que la glucosa es oxidada dando ácido glucónico para la obtención de energía pero no puede ser utilizada como fuente de carbono. En este sentido, se estudió el efecto del tipo de fuente de carbono en el desarrollo de *S. natans* y de la cepa E932 en cultivos puros en medio líquido. La utilización de un medio líquido permitió cuantificar tanto el crecimiento de los microorganismos como el consumo de las diferentes fuentes de carbono estudiadas.

El medio de cultivo utilizado en los ensayos de desarrollo en medio líquido fue una modificación del medio descrito en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo para el estudio de utilización de las fuentes de carbono en medio sólido. Se formularon dos medios de cultivo denominados Medio GC y Medio C con diferente composición de la fuente de carbono.

La fuente de carbono del Medio GC consistía en una mezcla de 2300 mg/L de glucosa y 700 mg/L de ácido cítrico; por otra parte, el Medio C tenía 3000 mg/L de ácido cítrico como única fuente de carbono. Este medio de cultivo se empleó como experimento control del crecimiento ya que como se discutió previamente, ambos microorganismos pueden utilizar citrato como única fuente de carbono.

En cada experiencia se determinó DQO soluble, glucosa o ácido cítrico como medidas de sustrato tal como se explicó en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 2. El desarrollo microbiano se monitoreó mediante densidad óptica (DO) a 620nm contra agua destilada como cero ya que a esta longitud de onda el medio de cultivo utilizado no interfería en la determinación. Para las muestras que presentaban una DO mayor a 0.4 se realizaron diluciones apropiadas.

En la Figura 3.4 se presentan los resultados de los experimentos de cultivos puros de *S. natans* y la cepa E932 en sistema batch en los dos medios ensayados. Para el caso de *S. natans* se observó un aumento en la DO de los cultivos en función del tiempo (Fig. 3.4.a,d) indicando que *S. natans* puede crecer bien en los medios estudiados. Adicionalmente se observó un consumo completo de DQO soluble (Fig. 3.4.b,e), glucosa (Fig. 3.4.c) y citrato (Fig. 3.4.f) indicando que no se formaba ningún tipo de producto. Estos resultados coinciden con los encontrados en relación a la utilización de fuentes de carbono en medio sólido (Fig. 3.1).

Como puede observarse en la Figura 3.4, el valor de la DO del cultivo de la cepa E932 desarrollada en el Medio GC (Fig. 3.4.a) resultó muy bajo y prácticamente constante durante el experimento; sin embargo, se observó desarrollo de esta cepa en el Medio C (Fig. 3.4.d). Adicionalmente, el consumo de DQO soluble resultó mucho mayor en el Medio C que en el Medio GC (Fig. 3.4.b,e). Estos resultados confirman que la cepa E932 puede utilizar citrato pero no glucosa como única fuente de carbono para su crecimiento tal como se observó en los experimentos en medio sólido (Fig. 3.1).

Si se comparan las Figuras 3.4.b y 3.4.c para la cepa E932 se observa que la glucosa se consume completamente pero no se produce un descenso significativo en la DQO soluble. Esto indicaría que la glucosa se transforma en otro producto que no es detectado por el método enzimático de determinación de glucosa pero que aporta DQO soluble.

Según Juni (1984) algunas cepas de *Acinetobacter anitratus* pueden oxidar glucosa a ácido glucónico (AG) para la obtención de energía. La ecuación de oxidación parcial de glucosa (G) a ácido glucónico es:



es decir que por cada gramo de G transformado en AG se consumen 88.9 mg de oxígeno (DQO) y se forman 1.09 gramos de AG. Por lo tanto, en el caso del Medio GC (2.3gGlc/L), se consumirán 204 mgDQO/L y se generarán 1.09 g/L de AG. Para transformar los gramos de AG generados a unidades DQO se debe plantear la ecuación de oxidación completa:



por lo tanto, el AG generado por la oxidación parcial de G del Medio GC (1.09 gAG/L) corresponde a una DQO soluble de 2257 mgDQO/L.

Por otra parte, el Medio GC contenía ácido cítrico cuya reacción de oxidación completa es:



es decir que se consumen 750 mgDQO/g cítrico. Si todo el citrato del Medio GC (0.7 g/L) es consumido por la cepa E932, se observará un consumo de 525 mgDQO/L. Por lo tanto, el consumo total de DQO soluble en el Medio GC para la cepa E932 será la suma del consumo de DQO debido a la oxidación parcial de glucosa a AG (204 mgDQO/L) y el consumo de DQO debido a la utilización del ácido cítrico (525 mgDQO/L) resultando 729 mgDQO/L. Adicionalmente, la DQO soluble final calculada teniendo en cuenta una oxidación parcial de la glucosa a ácido glucónico y una utilización completa del citrato será 2275 mgDQO/L.

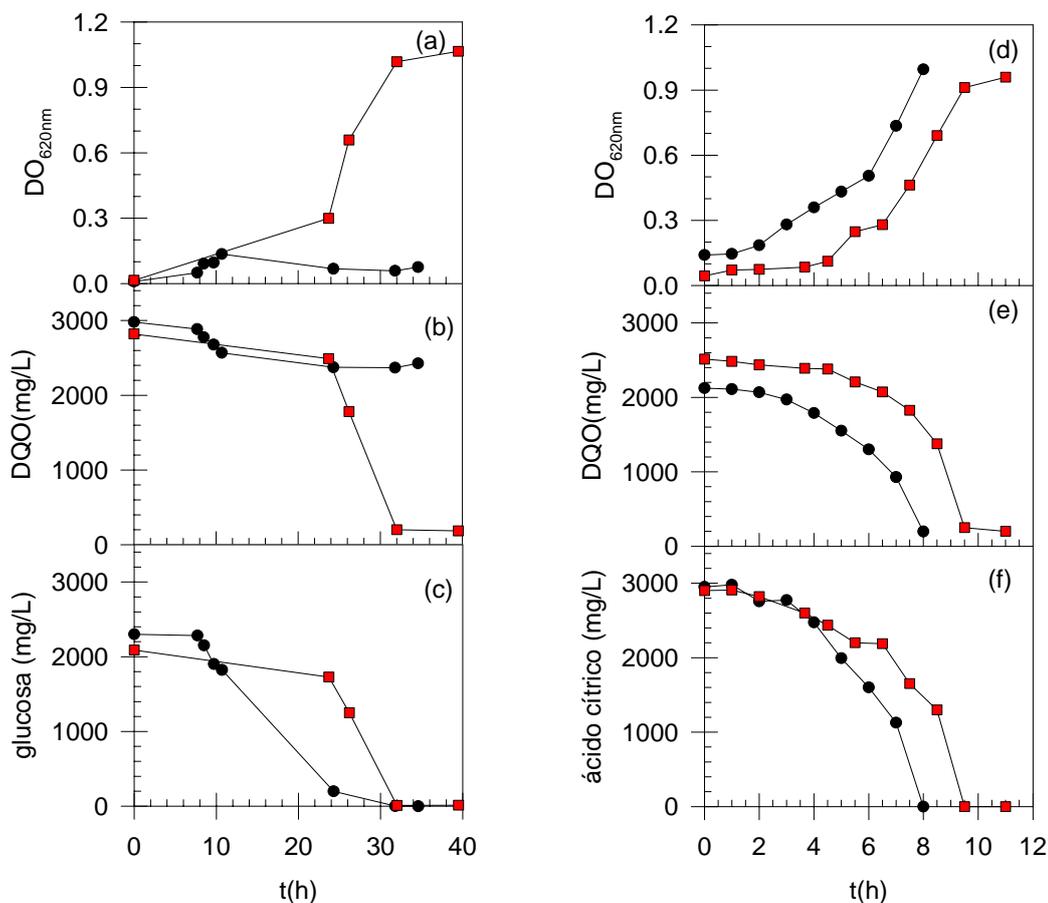


Figura 3.4. Desarrollo de las cepas E932 (λ) y *S. natans* (ν) en cultivos puros en el Medio GC (glucosa+cítrico) (a, b, c) y en el Medio C (cítrico) (d, e, f)

Como puede observarse en la Figura 3.4.b, la concentración de DQO inicial para el experimento de desarrollo de la cepa E932 era de 3000 mgDQO/L mientras que aproximadamente a las 30 hs. (tiempo en el cual se consumió toda la glucosa) la concentración final fue de 2300 mgDQO/L que representa un consumo total de aproximadamente 700 mgDQO/L. Por otra parte, los valores calculados teóricamente fueron 2275 mgDQO/L y 729 mgDQO/L respectivamente; esto demuestra que los resultados experimentales obtenidos coinciden con los cálculos teóricos y avalarían la hipótesis propuesta.

3.2.6. Diseño de un medio de cultivo sintético para realizar estudios cinéticos

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que todas las cepas podían crecer en un medio con citrato como única fuente de carbono; sin embargo, algunas cepas no desarrollaron (o lo hicieron pobremente) en medios con glucosa o acetato. Por otra parte, se demostró que el citrato es una fuente de carbono cuantitativamente importante en efluentes de la industria procesadora de vegetales (Capítulo 2). En base a estos resultados, se diseñó un medio de cultivo sintético con citrato como única fuente de carbono para ser empleado en posteriores estudios de la cinética de crecimiento de *Sphaerotilus natans* y la cepa E932 en cultivos puros y mixtos. En la Tabla 3.4 se detalla su composición.

Tabla 3.4. Composición del medio de cultivo desarrollado durante el presente trabajo.

Salvo aclaración, las cantidades se expresan en mg/L.

Acido Cítrico	3200
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 - 2000
MgSO ₄ .7H ₂ O	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	50
KH ₂ PO ₄	250
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1000
vitamina B ₁₂	100 µg/L
Solución M1	1 ml/L
Solución M2	1 ml/L
Antiespumante (10%v/v)	1 ml/L

Solución M1 (g/100mL): FeSO₄.7H₂O, 1.5; ZnSO₄.7H₂O, 0.5; MnSO₄.H₂O, 0.3; CuSO₄.5H₂O, 0.075; CoCl₂.6H₂O, 0.015; ácido cítrico, 0.6.

Solución M2 (g/100mL): (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4 H₂O, 0.05; BO₃H₃, 0.01; IK, 0.01.

Como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio en lugar de cloruro de amonio debido a que los cloruros interfieren en la determinación de la DQO. Por otra parte, Dias y Heukelekian (1967) informan que la velocidad de crecimiento de *S. natans* en un medio con amonio como fuente de carbono es similar a la observada con glutamato o Casitone. Se descartó el citrato de amonio como fuente de nitrógeno ya que era conveniente que la fuente de carbono y la de nitrógeno fueran independientes a fin de poder cambiar su relación. La relación entre la fuente de carbono y nitrógeno se varió entre 3.2 y 32 mg de ácido cítrico por mg de sulfato de amonio que corresponde a una relación de 6 a 48 mgDQO/mgN.

Las soluciones M1 y M2 se agregaron para el aporte de los micronutrientes necesarios para el normal desarrollo de *S. natans*, principalmente Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} y Fe^{+3} (Dondero, 1975). Por otra parte, la vitamina B12 es un factor de crecimiento necesario para *S. natans* (Okrend y Dondero, 1964).

Debido a que se realizaron experimentos con valores de pH del medio comprendidos entre 6 y 9, éste se ajustó al valor deseado con una solución de NaOH 1M. Para valores de pH mayores a 7, el pH del medio se ajustó posteriormente a la etapa de esterilización. Para un volumen de 10 litros de medio de cultivo, la esterilización se realizó mediante autoclave a 121°C durante 45 - 50 minutos. La vitamina B₁₂ se esterilizó por filtración con membranas Millipore HA de 0.45 µm y se agregó al medio previamente esterilizado.

3.3. Conclusiones del Capítulo

* Se aislaron y caracterizaron cuatro cepas con características floculantes procedentes de diferentes fuentes que se denominaron E932, JB, B y C.

* Con relación a la utilización de diferentes fuentes de carbono, la cepa B presentó pobre desarrollo en general, siendo el acetato la fuente de carbono más favorable para su crecimiento. La cepa C fue la única que no desarrolló en acetato, el crecimiento en citrato fue bueno aunque lento mientras que en glucosa fue rápido y abundante. El comportamiento de las cepas E932 y JB resultó similar; ambas cepas mostraron desarrollo abundante tanto en citrato como en acetato pero el desarrollo en glucosa resultó muy escaso. Mediante una serie de pruebas bioquímicas se demostró que ambas cepas pertenecían al género *Acinetobacter* especie *anitratu*s.

* Con fines comparativos, se realizaron ensayos de utilización de diferentes fuentes de carbono para la cepa filamentosa *S. natans* ATCC #29329; este

microorganismo creció en todos los medios ensayados aunque se desarrollaba más rápida y abundantemente en un medio con acetato o citrato que con glucosa.

* Los estudios del desarrollo de la cepa E932 en medio líquido demostraron que el microorganismo pudo desarrollar en un medio con citrato; sin embargo, en una mezcla glucosa/citrato el crecimiento era muy pobre; adicionalmente se demostró que la cepa E932 transformaba la glucosa del medio de cultivo en algún producto, posiblemente ácido glucónico.

* A partir de los resultados obtenidos se diseñó un medio de cultivo sintético con citrato como única fuente de carbono y sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno para ser empleado en posteriores estudios de la cinética de crecimiento de *Sphaerotilus natans* y la cepa E932 en cultivos puros y mixtos. La cepa E932 fue seleccionada para estudios posteriores como representante de los microorganismos floculantes debido a dos factores. Por un lado, esta cepa fue aislada a partir de muestras de barros activados de una planta que trataba un efluente modelo de la industria procesadora de vegetales. Por otra parte, la cepa E932 fue identificada (*Acinetobacter anitratus*) y esto facilita su comparación con los datos de bibliografía.

DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DEL BIORREACTOR EMPLEADO

En el presente Capítulo se describe el biorreactor empleado durante el trabajo experimental para el cultivo de microorganismos en sistema continuo o en batch y se realiza un análisis del efecto de las condiciones de aireación y agitación en el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La).

La solubilidad del oxígeno en un medio acuoso es de unos pocos miligramos por litro y si los microorganismos presentes en un cultivo respiran activamente lo consume completamente en pocos minutos; si el descenso en la concentración de oxígeno disuelto es grande, puede convertirse en un sustrato limitante. Para que esto no ocurra, el oxígeno consumido debe ser repuesto constantemente desde la fase gaseosa hacia la solución mediante la adición de aire y/o agitación del sistema. Un parámetro ampliamente utilizado para evaluar la eficiencia de los equipos para transferir oxígeno a un biorreactor es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La).

4.1. Descripción del biorreactor

El biorreactor utilizado durante el cultivo de microorganismos (Fig. 4.1) estaba constituido por un vaso cilíndrico de vidrio borosilicato de 1.5 L con 1.0 L de volumen de trabajo y dos tapas de acero que se sujetaban mediante cuatro varillas externas con tornillos tipo mariposa. Cada tapa tenía un surco donde estaba inserta una junta de caucho de siliconas y sobre esta junta se apoyaba el vaso de vidrio.

La tapa superior poseía dos orificios de 12 mm de diámetro para la colocación de electrodos de pH y oxígeno disuelto, un orificio con tuerca y sellos para ubicar un electrodo de nivel/espuma y cinco estradas/salidas para mangueras que eran utilizadas para el agregado de medio de cultivo, reactivos, salida de gases, etc. Por el centro de la tapa pasaba un vástago con rulemanes sellados; la parte superior del vástago tenía una conexión hacia un motor que impulsaba cuatro paletas de agitación situadas en la parte inferior del vástago de acero. La agitación podía regularse en forma continua de 100 a 1000 rpm mediante un potenciómetro que controlaba el motor. En el interior del vaso de vidrio se acomodaban cuatro baffles para aumentar la turbulencia y el mezclado por agitación mecánica.

La tapa inferior tenía una entrada central para aire, una entrada/salida para la camisa de refrigeración, una entrada para el sensor de temperatura, una resistencia para la calefacción y una salida interna de altura regulable que permitía trabajar con diferentes volúmenes del reactor en el caso de sistemas continuos. La temperatura se ajustaba en forma continua desde 10 a 70 °C mediante un sistema electrónico que controlaba el calentamiento de una resistencia la cual mantenía la temperatura en el valor deseado. El equipo estaba provisto de un rotámetro graduado para aire (calibrado en L/min en condiciones normales), con una válvula aguja para fijar el caudal de aire al valor deseado.



Figura 4.1. Biorreactor utilizado durante las experiencias de cultivo continuo y batch

El sistema de toma de muestra consistía en un tubo interno que llegaba hasta unos 5 cm del fondo; en la parte externa al biorreactor el tubo estaba cerrado con una pinza. Para tomar una muestra se cerraban todas las salidas con el objeto de aumentar la presión interna, se abría la pinza situada en el tubo externo y el líquido ascendía impulsado por la diferencia de presión. Debido a que siempre se trabajaba con una presión interna levemente mayor que la presión atmosférica, se minimizaron los riesgos de contaminación. Cuando el sistema era operado en flujo continuo, la salida de gases coincidía con la salida del medio de cultivo agotado con el objeto de evitar obturaciones y barrer los posibles contaminantes.

El pH se determinó con un electrodo esterilizable Ingold 465 el cual estaba conectado a un controlador electrónico de pH. El sistema de control del pH era de tipo "on/off" con proporcionalidad de tiempo de acción mediante contactos normal abierto que hacía funcionar una bomba peristáltica la cual permitía el agregado de álcali o ácido según fuera necesario.

El oxígeno disuelto fue medido con un electrodo de oxígeno de tipo polarográfico, esterilizable, no compensado por temperatura. El control de oxígeno disuelto era de tipo proporcional por ajuste de ángulo de fase, los aireadores se conectaron directamente al controlador el cual regulaba la frecuencia de oscilación del fuelle.

4.2. Determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno (K_La) mediante el método dinámico

Existen varios factores que afectan el valor del coeficiente global de transferencia de oxígeno (K_La), entre los que se pueden citar la composición del medio de cultivo (presencia de surfactantes, electrolitos, pH), la temperatura, la geometría del sistema de aireación y del biorreactor, el caudal de aire y la agitación (Winkler, 1996; Ros, 1993). En el presente trabajo de Tesis se estudió el efecto de la velocidad de agitación (200 a 800 rpm) y el caudal de aireación (1 a 2.5 L/min) en el valor de K_La ; todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado manteniendo la misma configuración del biorreactor descrita previamente, a 30 °C, pH = 7.0, en agua destilada y con un volumen de trabajo de 1 L.

Aunque existen diferentes métodos para estimar la eficiencia de los equipos para transferir oxígeno a un biorreactor (Cooper y col., 1944; Tsao y Kempe, 1960; Taguchi y Humphrey, 1966; Hisieh y col., 1969; Corrieu y col., 1975), el método en estado no estacionario utilizando un electrodo para la medición continua de la

concentración de oxígeno disuelto ha sido adoptado como el procedimiento estándar (Ros, 1993). La determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se realizó aplicando un procedimiento de este tipo.

Como puede observarse en la Figura 4.2, el procedimiento consta de varias etapas. La primera consiste en cortar el suministro de aire y remover el oxígeno disuelto mediante el agregado de sulfito de sodio (8 mg/mgO₂ disuelto) y cloruro de cobalto (0.05 mg/L) como catalizador. El sulfito reacciona con el oxígeno disuelto de acuerdo a la siguiente ecuación:

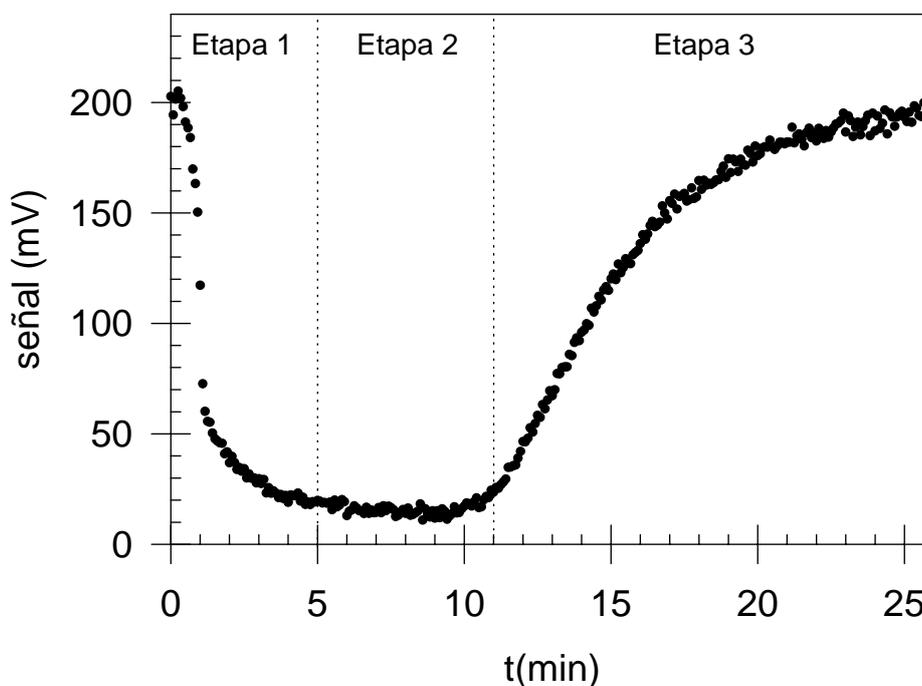
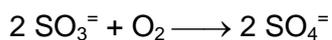


Figura 4.2. Método dinámico para la determinación del $K_L a$: curva típica
Condiciones experimentales: agitación 200 rpm; aireación 1.5 L/min

Una vez que disminuye la concentración de oxígeno disuelto, se restablece la aireación. Debido a que es conveniente agregar un pequeño exceso de sulfito, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene en un valor muy bajo aún en condiciones de aireación debido a que la reacción con el sulfito es mucho más rápida que la capacidad de transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa al líquido (Etapa 2). Finalmente cuando el sulfito se agota, la concentración de oxígeno disuelto (C) aumenta hasta alcanzar el valor de saturación (Etapa 3).

Durante la Etapa 3, la concentración de oxígeno disuelto aumenta según la siguiente expresión:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C_S - C) \quad (4.1)$$

donde C_S es la concentración de saturación. Si se mantienen las condiciones de aireación y agitación constantes durante todo el experimento, $K_L a$ será una constante y la Ec. (4.1) puede ser integrada para obtener la siguiente expresión:

$$C = C_S + (C_O - C_S) e^{-K_L a (t - t_0)} \quad (4.2)$$

donde t_0 es el tiempo de inicio de la Etapa 3 (Fig. 4.2) y C_O es la concentración de oxígeno disuelto a t_0 .

La señal del electrodo de oxígeno (S) es proporcional a la concentración de oxígeno disuelto (C) y ambas se relacionan mediante la siguiente expresión:

$$S = S_S \frac{C}{C_S} \quad (4.3)$$

donde S_S es la señal del electrodo correspondiente a la saturación de oxígeno. Combinando las Ecs. (4.2) y (4.3) se obtiene la siguiente expresión:

$$S = S_S + (S_O - S_S) e^{-K_L a (t - t_0)} \quad (4.4)$$

donde S_O es el valor de saturación cuando $t = t_0$ y S_S es el valor de S al cual se tiende asintóticamente. La Ec. (4.4) es conveniente debido a que está expresada en las mismas unidades que proporciona el electrodo de oxígeno disuelto. Adicionalmente, mediante el ajuste por regresión no lineal de la Ec. (4.4) a los datos experimentales

para $t > t_0$ (Etapa 3) se puede calcular el valor de K_{La} . Según Ros (1993) mediante este procedimiento se consigue la mejor estimación de los parámetros S_0 , S_s y K_{La} para minimizar el error cuadrático medio entre los valores predichos y los experimentales. En el presente trabajo los ajustes fueron realizados mediante el programa de regresión no lineal Sigma Plot Version 2.0.

Aunque la Ec. (4.4) se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales (Fig. 4.3), el valor obtenido de K_{La} dependía de la elección de t_0 . Como puede observarse en la Figura 4.4, a medida que se incrementaba el valor elegido de t_0 , el valor estimado de K_{La} aumentaba y tendía a un valor máximo. Adicionalmente el desvío estándar de la estimación de K_{La} también aumentaba con el incremento de t_0 . Estos efectos pueden deberse a diferentes factores entre los cuales se encuentran la presencia de restos de sulfito, el tiempo que tarda el sistema para entrar en régimen y el tiempo de respuesta del electrodo (Ducros y col., 1998); todos estos factores contribuyen a que el valor del K_{La} calculado mediante la Ec. (4.4) sea menor al valor real.

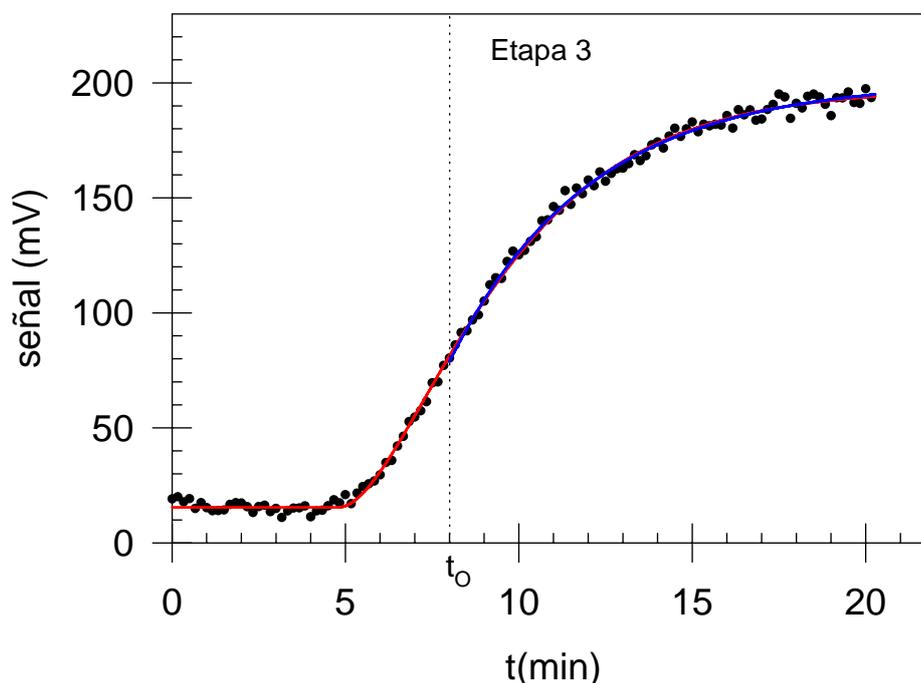


Figura 4.3. Determinación del K_{La} mediante el método del sulfito. Condiciones experimentales: agitación = 200 rpm; caudal de aireación = 1 l/min. (λ) datos experimentales; (—) Ec. (4.4) ($t_0 = 8$ min, $K_{La} = 14.9$ h $^{-1}$); (—) Ec. (4.6) ($K_{La} = 18.4$ h $^{-1}$)

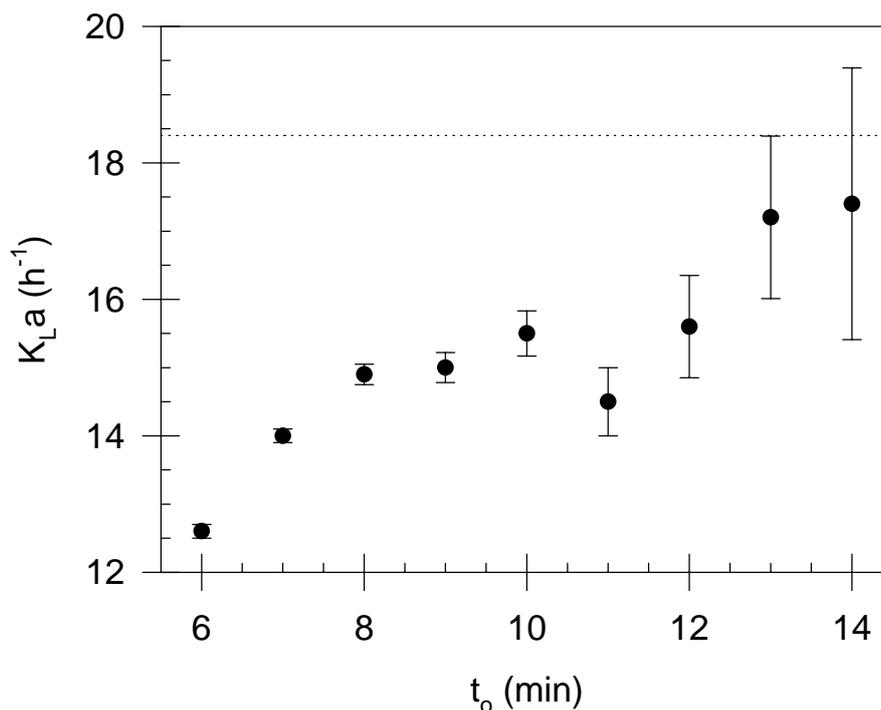


Figura 4.4. Efecto de la elección de t_0 en el valor de K_{La} estimado por regresión lineal de la Ec. (4.4) a partir de los datos experimentales presentados en la Figura 4.3.

(-----) Valor de K_{La} obtenido mediante la Ec. (4.6).

Las barras indican el desvío estándar.

Con el objeto de corregir las desviaciones descritas, los datos experimentales fueron evaluados mediante la técnica de Ducrós y col. (1998). La dinámica del electrodo puede representarse mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{C - S}{\tau} \tag{4.5}$$

donde τ es el tiempo de respuesta global del sistema. La solución analítica del sistema formado por las ecuaciones (4.1), (4.3) y (4.5) es:

$$S = \begin{cases} S_0 & t < t_0 \\ S_S + \left(\frac{S_S - S_0}{1 - \tau K_{La}} \right) \left(\tau K_{La} e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau}} - e^{-K_{La}(t-t_0)} \right) & t \geq t_0 \end{cases} \tag{4.6}$$

Como puede observarse en la Figura 4.3, la Ec. (4.6) se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales especialmente en la zona de transición entre las Etapas (2) y (3). Por otra parte, el valor de K_{La} estimado mediante la Ec. (4.6) resultó mayor que los calculados mediante la Ec. (4.4) para diferentes valores de t_0 (Fig. 4.4).

Mediante el ajuste no lineal de la Ec. (4.6) a los datos experimentales pueden calcularse los valores de S_0 , S_S , K_{La} , t_0 y τ ; esto representa una ventaja respecto de la Ec. (4.4) ya que los resultados no dependen del operador (el cual debe realizar la elección de t_0) y por lo tanto, en todos los experimentos posteriores la estimación del valor del K_{La} se realizó mediante la Ec. (4.6).

4.2.1. Efecto de la velocidad de agitación y el caudal de aireación en K_{La}

Se evaluó el efecto del caudal de aireación (Q_A) y la velocidad de agitación (N) en el valor del K_{La} . Como puede observarse en la Figura 4.5, para una velocidad de agitación (N) constante el valor de K_{La} aumentó a medida que se incrementaba el caudal de aireación (Q_A).

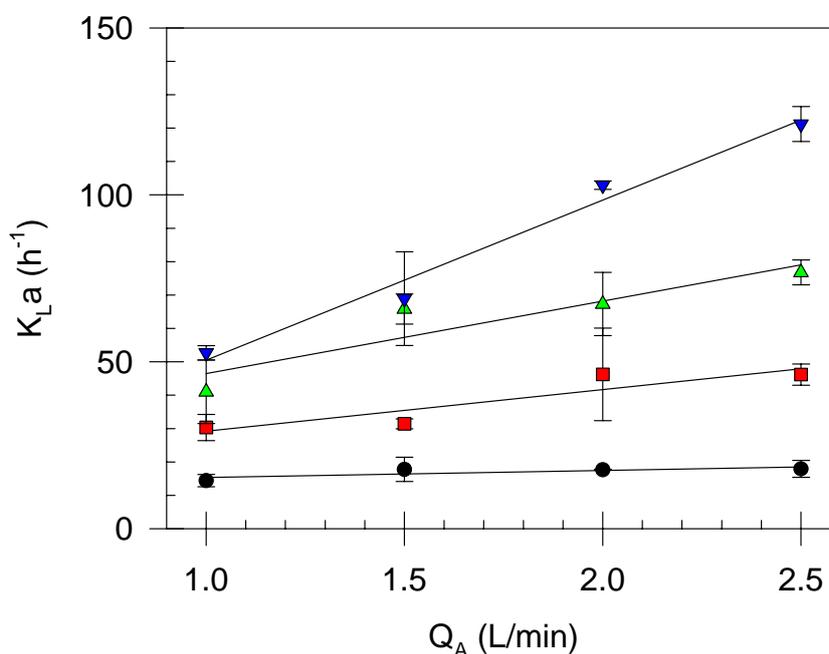


Figura 4.5. Efecto del caudal de aireación (Q_A) en el valor del K_{La} para diferentes condiciones de agitación: (λ) 200 rpm, (ν) 400 rpm, (σ) 600 rpm, (τ) 800 rpm.

(Las barras indican el desvío estándar)

Se observó que a medida que N aumentaba, las pendientes de las rectas eran cada vez mayores; esto indicaba que el efecto de Q_A en el valor de K_La resultaba mayor cuanto mayor era la agitación. Por ejemplo, para una velocidad de agitación de 200 rpm, el valor de K_La se incrementaba de 14 h^{-1} a 18 h^{-1} para 2.5 L/min para una aireación de 1.0 L/min que correspondía a un aumento del 28%; sin embargo, cuando la agitación era 800 rpm el K_La aumentó de 53 a 121 h^{-1} (incremento del 128%) para el mismo intervalo de caudal de aireación.

El incremento de K_La con el aumento del caudal de aireación fue observado por otros autores para diferentes sistemas de aireación (Aiba, 1973; Aberley y col., 1974; Figueredo y Calderbank, 1979; Ahmad y col., 1994). Eckenfelder (1970) estudió la eficiencia de la transferencia de oxígeno en unidades de aireación por turbinas y encontró que el valor de K_La era proporcional a Q_A^x donde x era una constante cuyos valores típicos estaban en el rango 0.4 a 0.9. Sin embargo, Bjurstrom y col. (1985) encontraron que K_La dependía del caudal de aireación solamente para sistemas a escala real pero era prácticamente independiente en reactores a escala laboratorio.

En la Figura 4.6 se presenta el efecto de la velocidad de agitación (N) en el valor de K_La determinado para diferentes caudales de aireación (Q_A); como puede observarse, el aumento en N produjo un aumento en el valor de K_La . Por ejemplo, para un caudal de aireación de 1.0 L/min, el valor de K_La se incrementaba de 14 h^{-1} para una agitación de 200 rpm hasta 53 h^{-1} para 800 rpm que corresponde a un aumento del 278%; con un caudal de aireación de 2.5 L/min, el valor de K_La se incrementaba de 18 h^{-1} a 121 h^{-1} (incremento del 572%) para el mismo intervalo de agitación. Comparando estos incrementos con los correspondientes al cambio en el caudal de aireación se deduce que la velocidad agitación es el factor que más influye en el valor del K_La . Resultados similares fueron informados por otros autores (Koestier y col., 1975; Ahmad y col., 1994).

El efecto combinado del caudal de aireación (Q_A) y la velocidad de agitación (N) en el valor del K_La puede ser descrito mediante la siguiente ecuación (Ducrós y col., 1998):

$$K_La = \alpha N^\beta Q_A^\gamma \quad (4.7)$$

donde α , β y γ son constantes que deben ser determinadas experimentalmente. La Ec. (4.7) fue ajustada al conjunto de los datos experimentales mediante regresión no lineal, los parámetros obtenidos se presentan en la Tabla 4.1.

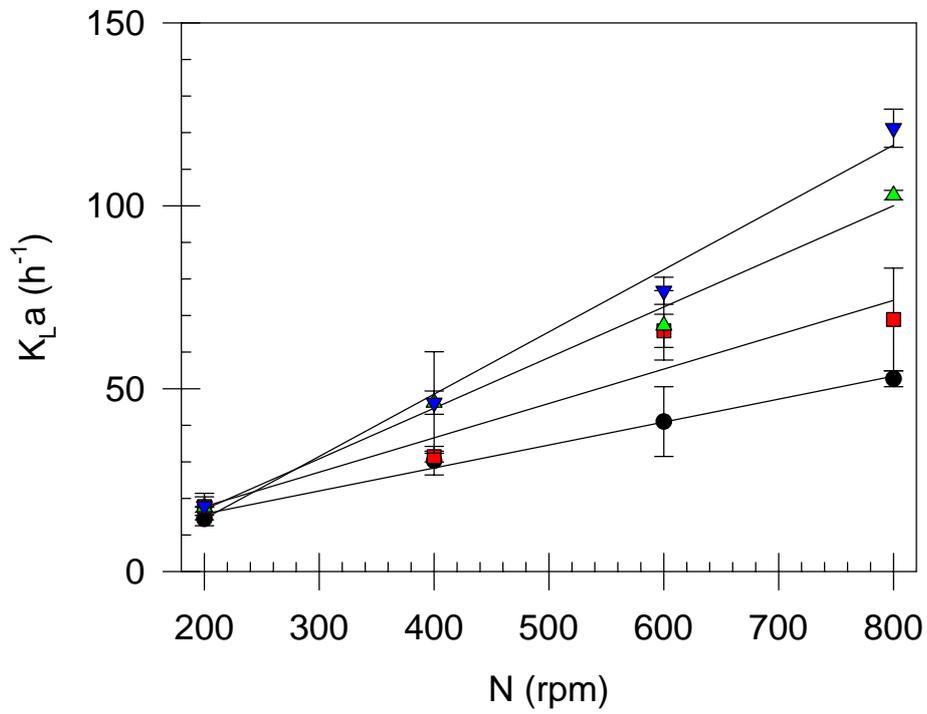


Figura 4.6. Efecto de la velocidad de agitación (N) en el valor del K_La.
 Caudal de aireación: (λ) 1 L/min, (v) 1.5 L/min, (σ) 2.0 L/min, (τ) 2.5 L/min.
 (Las barras indican el desvío estándar)

Tabla 4.1. Coeficientes correspondientes a la Ec. (4.7): $K_L a = \alpha N^\beta Q_A^\gamma$

Parámetro	Valor	Desvío Estándar	CV(%)
α	0.023	0.0089	38.7
β	1.174	0.0602	5.1
γ	0.747	0.0493	6.6

Si se toma una condición experimental de referencia (N_{ref} , Q_{Aref}) y se determina el valor del K_La para esa condición ($K_{La_{ref}}$), la Ec. (4.7) puede ser reordenada de la siguiente manera:

$$K_La = K_{La_{ref}} \left(\frac{N}{N_{ref}} \right)^\beta \left(\frac{Q_A}{Q_{A_{ref}}} \right)^\gamma \quad (4.8)$$

La Ec. (4.8) permite un análisis más sencillo del efecto del cambio en las condiciones operativas en el valor de K_La . Por ejemplo, si se mantiene constante la velocidad de agitación ($N = N_{ref}$) y se duplica el caudal de aireación en relación a Q_{Aref} ($Q_A = 2 Q_{A_{ref}}$) el valor del K_La será 2^γ ($= 1.7$) veces el valor de referencia; sin embargo, si se mantiene la aireación constante ($Q_A = Q_{Aref}$) y se duplica la agitación ($N = 2 N_{ref}$) el valor del K_La será 2^β ($= 2.3$) veces el valor de referencia. Este cálculo demuestra que la velocidad de agitación (N) tiene una mayor influencia en el valor de K_La que el caudal de aireación (Q_A) tal como se mencionó previamente.

En la Figura 4.7 se presentan los datos experimentales promediados de K_La y los valores calculados mediante la Ec. (4.7) con las constantes que aparecen en la Tabla 4.1 en función del caudal de aireación (Q_A) y de la velocidad de agitación (N) en el rango experimental estudiado. Como puede observarse, la Ec. (4.7) se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales ($r^2 = 0.9726$).

En la Figura 4.8 se graficaron los valores de K_La calculados mediante la Ec. (4.7) en función de los datos experimentales promedio, así como los límites inferior y superior considerando un error relativo de $\pm 15\%$. Puede observarse que en los casos en que K_La es mayor a 20 h^{-1} , los valores calculados mediante la Ec. (4.7) quedan comprendidos dentro de estos límites. Debido a que en condiciones de cultivo de microorganismos la velocidad de agitación usada fue siempre mayor a 400 rpm con un caudal de aireación mayor a 1.5 L/min, el K_La fue siempre mayor a 35 h^{-1} . Como se observa en la Figura 4.8, en estas condiciones la Ec. (4.7) puede ser utilizada para calcular los valores de K_La con un error menor al 15%.

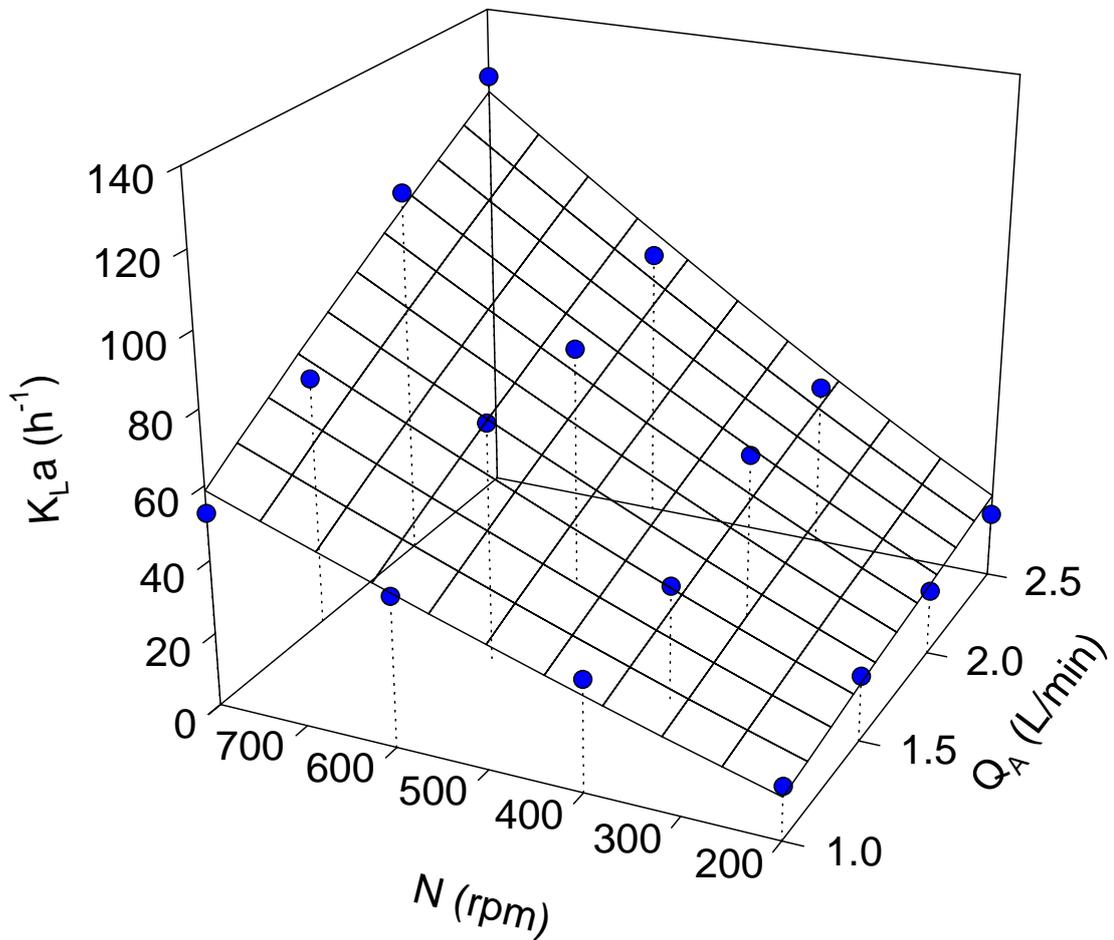


Figura 4.7. Efecto combinado del caudal de aireación (Q_A) y de la velocidad de agitación (N) en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}).
 (•) Datos experimentales promedio, (—) Valores calculados mediante la Ec. (4.7)

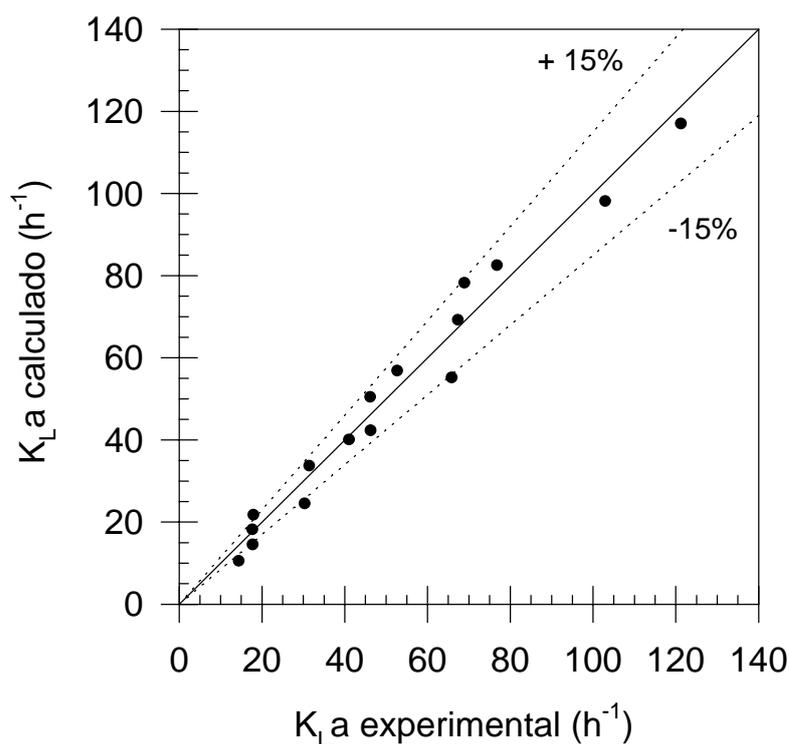


Figura 4.8. Valores de $K_L a$ calculados mediante la Ec. (4.7) en función de los datos experimentales de $K_L a$. (—) Línea a 45° , (- - -) Líneas de error de $\pm 15\%$.

4.2.2. Determinación del $K_L a$ en condiciones de operación

El valor de $K_L a$ también es función de la composición del medio líquido; con el fin de tener en cuenta este efecto, se definió el coeficiente Φ como el cociente entre el valor de $K_L a$ determinado en el medio líquido en condiciones de operación en relación al obtenido en agua:

$$\Phi = \frac{K_L a_{\text{medio}}}{K_L a_{\text{agua}}} \quad (4.9)$$

El valor de Φ puede ser mayor o menor a 1 dependiendo de las sustancias presentes en el medio de cultivo, siendo los factores más relevantes la presencia de tensioactivos y de microorganismos (Ramalho, 1993; Ros, 1993).

El valor de $K_L a$ en condiciones de operación se determinó mediante un método similar al descrito previamente en el cual los microorganismos (y no el agregado de

sulfito de sodio) consumen el oxígeno disuelto (Ros, 1993). En este método, la aireación se interrumpe a fin de determinar la velocidad de respiración de los microorganismos presentes. A un cierto tiempo t_0 se inicia la aireación y se registra el aumento de la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo (Figura 4.9).

Teniendo en cuenta la velocidad de respiración de los microorganismos presentes (r), la ecuación (4.6) resulta:

$$S = \begin{cases} S_i - rt & t < t_0 \\ S_e + \left(\frac{S_e - S_0}{1 - \tau K_L a} \right) \left(\tau K_L a e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau}} - e^{-K_L a (t-t_0)} \right) & t \geq t_0 \end{cases} \quad (4.10)$$

donde S_i es la ordenada al origen de la recta obtenida al interrumpir la aireación, S_0 es el valor de la señal en el momento de iniciar la aireación y S_e es la lectura del electrodo en estado estacionario. Adicionalmente, para $t = t_0$, la Ec. (4.10) debe dar un único valor de S y por lo tanto:

$$S_0 = S_i - r t_0 \quad (4.11)$$

La determinación de $K_L a$ en condiciones de funcionamiento del reactor fue realizada sobre un cultivo de la cepa E932 operado en alimentación continua con una velocidad de dilución (caudal de alimentación/volumen del reactor) de 0.04 h^{-1} ; el medio de cultivo utilizado fue descrito en la Tabla 3.4 del Capítulo 3. Las condiciones de aireación eran las siguientes: caudal de aireación = 1L/min, velocidad de agitación = 400 rpm.

La Ec. (4.10) fue ajustada a los datos experimentales utilizando regresión no lineal; teniendo en cuenta la condición impuesta por la ecuación (4.11) se obtuvo un valor promedio de $K_L a = 25.5 \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.9). Asimismo, mediante la Ec. (4.7) se calculó un valor de $K_L a = 26.1 \text{ h}^{-1}$ para las condiciones operativas utilizadas ($N = 400 \text{ rpm}$, $Q_A = 1 \text{ L/min}$) en agua destilada; por lo tanto, el valor de la constante Φ calculado mediante la Ec. (4.9) resultó 1.02; por lo tanto la transferencia de oxígeno en el medio de cultivo fue similar al valor estimado en agua destilada.

El valor de la constante Φ determinado en el presente estudio es similar a los datos disponibles en bibliografía; para aireadores de turbina, Eckenfelder (1989) informa valores de Φ que se incrementaban de 0.6 a 1.2 a medida que se aumentaba la agitación en sistemas de aguas residuales con bajas concentraciones de tensioactivos. Los valores de $\Phi > 1$ se asocian a la presencia de tensioactivos que

disminuyen el tamaño medio de las burbujas y consecuentemente aumentan el área total de intercambio de gases. Sin embargo, ciertos tensioactivos se acumularían en la interfase aire – líquido produciendo un aumento en la resistencia al pasaje de gases. Por lo tanto, es muy difícil hacer una generalización y el efecto neto de un tensioactivo en el valor de K_La debe determinarse experimentalmente (Ramalho, 1993). En el caso particular analizado, el medio de cultivo contiene un agente tensioactivo a base de siliconas que se agrega para evitar la formación de espumas el cual no tendría efecto significativo en el valor de K_La .

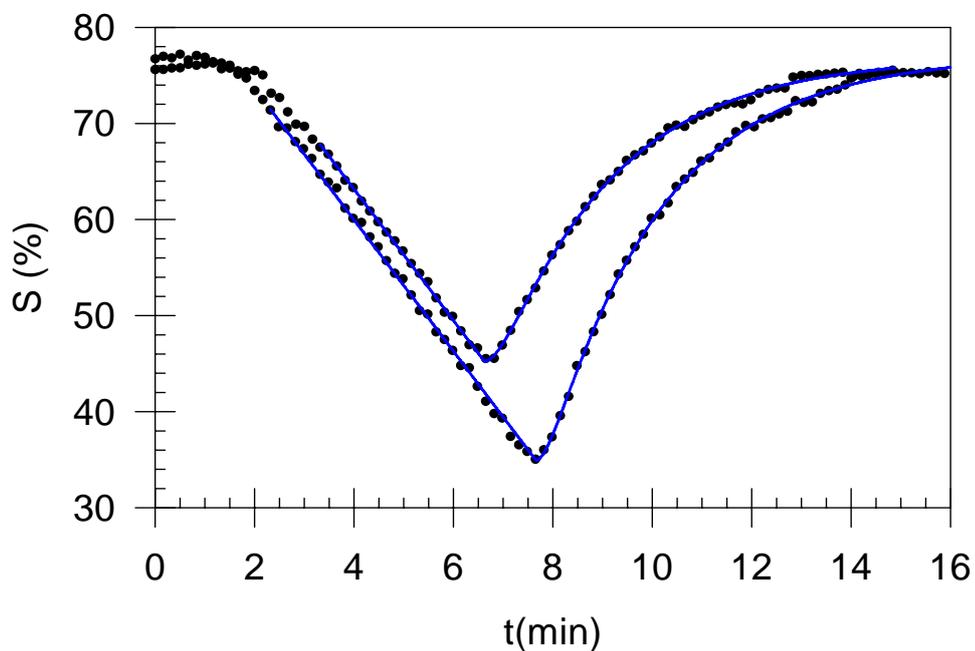


Figura 4.9. Determinación de K_La en presencia de microorganismos por el método dinámico. (λ) datos experimentales, (—) Ec. (4.10)

4.3. Conclusiones del Capítulo

* En el presente Capítulo se estudió el efecto de la velocidad de agitación, caudal de aireación y medio de cultivo en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La) mediante un método dinámico que tiene en cuenta la dinámica del electrodo.

* El valor de K_La aumentó con el incremento de la velocidad de agitación (N) y en menor medida del caudal de aireación (Q_A) en agua destilada. El efecto combinado de ambas variables en el valor de K_La fue modelado matemáticamente mediante la siguiente ecuación: $K_La = \alpha N^\beta Q_A^\gamma$. Esta ecuación se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales obteniéndose las constantes $\alpha = 0.023 (\pm 0.0089)$, $\beta = 1.174 (\pm 0.0602)$, $\gamma = 0.747 (\pm 0.0493)$.

* Asimismo se obtuvieron valores similares de K_La en agua destilada y en condiciones de operación con medio de cultivo y microorganismos. Por lo tanto, la ecuación propuesta puede ser utilizada para calcular los valores de K_La en condiciones de operación.

EVALUACION DE DIFERENTES METODOS PARA LA DETERMINACION DE BIOMASA EN CULTIVOS PUROS Y EN SISTEMAS DE BARROS ACTIVADOS

Uno de los parámetros clave en el modelado y monitoreo del funcionamiento de plantas de tratamiento de efluentes es la concentración de biomasa. Biomasa es un término general que se refiere a los microorganismos presentes en un sistema. Existen muchas maneras de medir la concentración de biomasa como por ejemplo masa, volumen, extensión lineal de filamentos, dispersión de luz, conteo de células u organelas (Pirt, 1975).

La introducción de la determinación de biomasa mediante la luz dispersada por una suspensión de bacterias permitió la medición de la cantidad de bacterias en forma instantánea. Las suspensiones de microorganismos dispersan luz generando turbiedad la cual puede ser estimada indistintamente a partir de la determinación de la cantidad de luz transmitida (fotometría) o dispersada (nefelometría) (Pirt, 1975). La técnica fotométrica se basa en que la densidad óptica de un cultivo es proporcional a la turbidez la cual, a su vez, es proporcional a la concentración de partículas y a su sección eficaz de dispersión de luz (también conocida como scattering cross-section) (van Hamersveld y col., 1997). Aunque esta técnica es ampliamente utilizada en el estudio de cultivos puros, su aplicación en barros activados es limitada y solamente se emplea como una estimación aproximada de la biomasa presente en este tipo de sistemas.

La determinación de biomasa como sólidos suspendidos volátiles (SSV) se ha generalizado en diferentes áreas de la ingeniería sanitaria (Metcalf y Eddy, 1987). A pesar de la simplicidad de esta técnica, en ocasiones pueden presentarse algunos problemas durante su aplicación. Por ejemplo, algunos barros presentan problemas en la etapa de filtración haciendo que este proceso sea muy lento. Por otra parte, se necesitan alrededor de 24 horas adicionales para el secado y posterior combustión de las muestras.

En la mayoría de los modelos matemáticos de sistemas de barros activados las ecuaciones son expresadas en unidades demanda química de oxígeno (Henze y col., 1987; 1995; Kappeler y Gujer, 1992; Keesman y col., 1998). En estos modelos, la variable que representa a la biomasa está expresada en unidades DQO; sin embargo, la determinación experimental de la biomasa se realiza a través de los SSV y por lo tanto, es necesario un factor de conversión de unidades de SSV a DQO. Este factor de conversión (f_x) representa la DQO que es aportada por unidad de SSV y depende de

la composición de los sólidos retenidos en la etapa de filtración, es decir, de la biomasa presente en la muestra.

Se han propuesto diferentes fórmulas que caracterizan la composición microbiana (Hoover y Porges, 1952; Sawyer, 1956; Stanier y col., 1970; Daigger y Grady, 1982; Roels, 1983; Pitter y Chudoba, 1990; Shimizu y col., 1993). Sin embargo, la asignación de una única fórmula que describe la composición microbiana promedio puede ser en determinadas ocasiones, una mala aproximación. Existe una gran variedad de microorganismos que pueden desarrollar en el amplio espectro de sustratos presentes en las aguas residuales, principalmente bacterias floculantes, sin embargo puede haber condiciones de cultivo donde se favorece la presencia de hongos y bacterias filamentosas (Jenkins y col., 1993; Wanner, 1994). Una parte de los barros activados está compuesta por una comunidad de diferentes tipos de predadores, principalmente protozoarios. Además, en torno a los microorganismos que forman los barros se genera una matriz gelatinosa que incluye material coloidal tanto biodegradable como no biodegradable (Urbain y col., 1993; Dignac y col., 1998). Por lo tanto, la utilización de un determinado valor de f_x conduce, en algunos casos, a un importante error en la determinación de la biomasa expresada como DQO y en la evaluación de los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan la biodegradación de los compuestos orgánicos presentes en el agua residual.

En el presente Capítulo se realiza una evaluación de diferentes técnicas de determinación de biomasa y se describe el desarrollo y la evaluación de una técnica de determinación de la concentración de biomasa mediante la cual los resultados se obtienen directamente en términos de DQO. Asimismo, se analiza el efecto del pH, velocidad de dilución y tipo de microorganismo en el valor del coeficiente f_x (DQO aportada por unidad de SSV) aplicando las técnicas desarrolladas.

5.1. Materiales y Métodos

5.1.1. Microorganismos empleados

Los estudios se llevaron a cabo utilizando sobre dos tipos de muestras: i) cultivos puros de *Sphaerotilus natans* y de la cepa E932 (estos microorganismos fueron descritos previamente en el Capítulo 3) y ii) barros activados. Los barros fueron obtenidos de la planta de barros activados escala laboratorio descrita en el Capítulo 3, alimentada con un sistema modelo de efluente de una industria láctea con una relación DQO:NTK:P de 100:7:0.6.

5.1.2. Medio de cultivo

La composición del medio utilizado durante los experimentos con cultivos puros se detalla en la Tabla 3.4 del Capítulo 3.

5.1.3. Reactores utilizados y condiciones experimentales

Durante los estudios de *S. natans* y la cepa E932 se realizaron experimentos en sistema batch y cultivos continuos. El reactor utilizado en estos experimentos fue similar al descrito previamente en el Capítulo 4. Como inóculo se utilizaron 2 a 3 ansadas de cada microorganismo previamente desarrollado en agar CGY (ver Capítulo 3) en pico de flauta durante 24 - 48 hs a 30 °C.

Las plantas de barros activados escala laboratorio tenían un volumen de 1.5 y 4.8 litros. El tiempo de residencia hidráulico se varió entre 15 y 83 horas. La temperatura de operación fue de 20 ± 1 °C y la concentración de oxígeno disuelto varió entre 0.5 y 6.5 mgO₂/l.

5.1.4. Determinación de biomasa mediante Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)

La determinación de SSV se realizó según la técnica estándar (APHA, 1992) la cual consiste de los siguientes pasos:

- 1.- Calcinar un filtro de fibra de vidrio de 1.5 μm a 600 °C y dejar enfriar en desecador. Esta etapa debe realizarse a fin de eliminar toda la materia orgánica que puede estar presente en el filtro. Se utilizaron filtros Millipore AP40 de 47 mm de diámetro. Estos filtros están hechos de microfibras de vidrio borosilicato sin resina ligante; la ausencia de ligante significa que el filtro mantiene su integridad estructural sin pérdida de peso al calcinarlo. Este tipo de filtros es el recomendado para la determinación de sustancias volátiles en suspensión en aguas residuales o en efluentes industriales (Catálogo Millipore).
- 2.- Filtrar un volumen conocido de efluente (V).
- 3.- El filtro con los sólidos suspendidos retenidos se seca en estufa a 105 °C hasta peso constante (m_1).
- 4.- Se calcina a 600 °C y se pesa el filtro nuevamente (m_2). Si el volumen filtrado se expresa en ml y los pesos en mg, los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se calculan mediante la siguiente expresión:

$$\text{SSV (mg/l)} = 1000 \frac{(m_1 - m_2)}{V} \quad (5.1)$$

5.1.5. Modificación de la técnica de SSV para la determinación de la biomasa de bacterias con tamaño menor a 1-2 μm

Se observó que las células de la cepa E932 no eran retenidas por los filtros recomendados en el método estándar (filtros de fibra de vidrio) debido al pequeño tamaño de las células (1 a 2 μm de diámetro); por lo tanto, a fin de determinar la biomasa correspondiente a los cultivos de la cepa E932 como SSV se propuso una modificación de la técnica estándar. La modificación consistió en la utilización simultánea de dos membranas en el aparato de filtración; un filtro de fibra de vidrio (Millipore AP40) que actuaba como prefiltro y una membrana de policarbonato (Millipore HTTP, 0.4 μm de poro) que retenía las células. Este tipo de membranas es muy adecuado ya que son muy poco higroscópicas, tienen muy poca retención de proteínas y se volatilizan completamente a 600 °C. A continuación se detalla el procedimiento aplicado:

- 1.- Calcinar el filtro de fibra de vidrio a 600 °C, 5 min. a fin de volatilizar la materia orgánica presente
- 2.- Pesar la membrana de policarbonato (m_1)
- 3.- Filtrar un volumen (V) de cultivo por ambas membranas colocadas en forma conjunta
- 4.- Secar a 105 °C hasta peso constante (m_2)
- 5.- Calcinar a 600 °C, 5 min. y pesar nuevamente (m_3). En esta etapa se volatiliza la materia orgánica y la membrana de policarbonato.

Los pesos fueron expresados en mg y el volumen filtrado en ml, los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{SSV (mg/l)} = 1000 \frac{m_2 - m_3 - m_1}{V} \quad (5.2)$$

5.1.6. Determinación de biomasa mediante densidad óptica (DO)

Las determinaciones de densidad óptica de las muestras fueron realizadas en un espectrofotómetro Hach DR/2000 a 620nm contra agua destilada como cero ya que a esta longitud de onda el medio de cultivo utilizado no interfiere en la determinación. Para las muestras que presentaban una DO mayor a 0.4 se realizaron diluciones apropiadas con medio de cultivo.

5.1.7. Determinación de biomasa como DQO

5.1.7.1. Método propuesto

El método propuesto de cuantificación de la concentración de biomasa como demanda química de oxígeno (DQO_B) consiste en determinar la demanda de oxígeno total (DQO_T) sobre la muestra que contiene la biomasa previamente homogeneizada y la demanda química de oxígeno soluble (DQO_S) en el filtrado. La determinación de DQO_S se realizó filtrando una alícuota de cada muestra por una membrana Milipore HA de 0.45 μm de poro que retenía las células. En los casos en que la filtración era difícil, se realizó una centrifugación previa de las muestras a 14000 g durante 5 minutos con el objeto de eliminar la mayor parte de la biomasa. La demanda química de oxígeno de los sólidos suspendidos correspondiente a la biomasa (DQO_B) se calculó de la siguiente forma:

$$DQO_B = DQO_T - DQO_S \quad (5.3)$$

Es importante destacar que el valor de DQO_B incluye diversos aportes: i) la biomasa viable, ii) los sólidos particulados lentamente biodegradables, iii) sustancias particuladas no biodegradables provenientes del agua residual a tratar, iv) materia orgánica particulada generada por la actividad metabólica de los microorganismos en fase endógena (Orhon y Artan, 1994). De igual manera, la determinación de SSV realizada según el método estándar cuantifica este espectro de sustancias. En la literatura se asocia la medida de SSV a la cantidad de microorganismos presentes (Metcalf y Eddy, 1977) y también se vinculan los SSV con la medida de DQO_B (Bullock y col., 1996).

5.1.7.2. Método de Bullock y col. (1996)

Con fines comparativos, se utilizó una técnica de determinación de la DQO correspondiente a los sólidos suspendidos retenidos informada en la literatura

(Bullock y col., 1996). La técnica de Bullock consiste en calcinar una membrana de fibra de vidrio (la misma membrana que se utiliza en la determinación de SSV por el método estándar) a fin de eliminar los restos de materia orgánica presente, filtrar un volumen conocido de muestra y determinar la DQO correspondiente al filtro conjuntamente con los sólidos retenidos. Paralelamente se debe determinar la DQO aportada por el filtro y por diferencia se calcula la DQO correspondiente a los sólidos retenidos (DQO_B).

Las muestras provenientes de los diferentes cultivos fueron divididas en dos alícuotas. Una alícuota se reservó para la medida de SSV, DQO_T y DO mientras que otra porción fue filtrada inmediatamente por una membrana de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore HA) con el objeto de separar las células; sobre el filtrado se determinó DQO_S . A menos que se indique lo contrario, todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado y los resultados se expresan como los valores medios.

5.2. Resultados y Discusión

5.2.1. Determinación de concentración de biomasa mediante SSV

Se realizó una comparación entre la técnica estándar de determinación de SSV y el método modificado. Debido a que mediante el método estándar no se puede determinar la biomasa de cultivos de bacterias con diámetro menor a $1\text{-}2 \mu\text{m}$ como es la cepa E932, para dicha comparación se utilizaron cultivos puros de *S. natans*.

Los resultados obtenidos demostraron que la determinación de los SSV para las diferentes muestras analizadas mediante ambos métodos resultó similar. Por ejemplo, para una muestra de un cultivo puro de *S. natans*, la determinación de SSV por el método estándar presentó un valor de 805 mg/L con un desvío estándar de 33 mg/L y un coeficiente de variación (CV) del 4%; por otra parte, mediante la aplicación de la técnica modificada propuesta en el presente trabajo se obtuvo un valor de 793 mg/L con un desvío estándar de 13 mg/L y un CV del 3%.

Adicionalmente, se estudió el efecto del valor de SSV en el coeficiente de variación. Como puede verse en la Figura 5.1, el valor del coeficiente de variación porcentual (CV%) para ambas técnicas resultó similar, siendo el valor promedio menor al 3%. Por lo tanto, el método propuesto en el presente trabajo de Tesis para la determinación de SSV presentó un grado de precisión comparable al método estándar. Los resultados obtenidos indicaron que no se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos de determinación de SSV para cultivos de para *S. natans*.

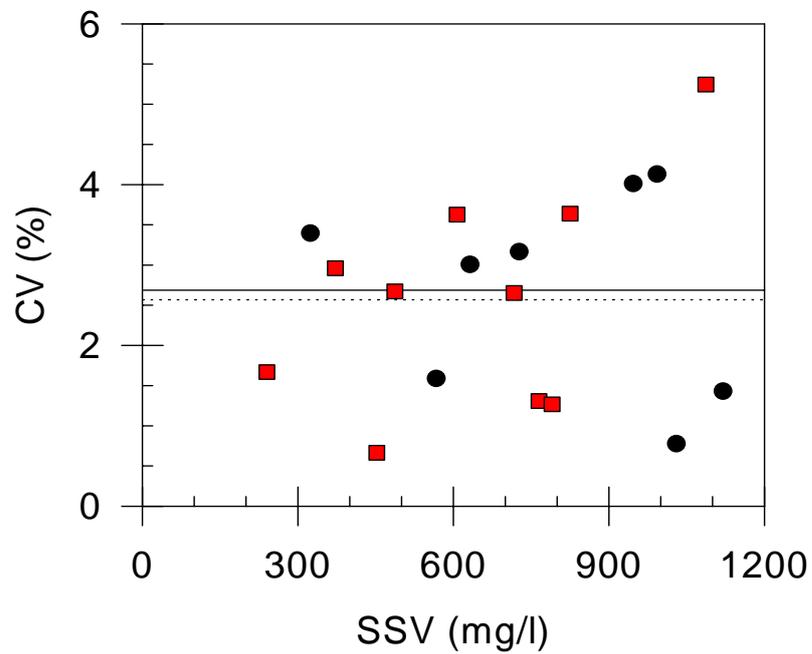


Figura 5.1. Efecto del valor de SSV en el coeficiente de variación (CV). Método modificado (●). Método estándar (■). (—) Promedio del CV para el método modificado y para el método estándar (---) en el rango estudiado.

5.2.2. Determinación de biomasa mediante densidad óptica (DO)

La proporción de luz incidente que no logra atravesar la suspensión es la suma de la luz absorbida y la luz dispersada. Para el caso de bacterias que carecen de pigmentos, la cantidad de luz absorbida es muy baja en relación a la cantidad dispersada. La cantidad de luz dispersada es proporcional al cociente entre el tamaño de las partículas en suspensión y la longitud de onda utilizada y es también proporcional a la diferencia entre el índice de refracción de los microorganismos y del medio (Powell, 1963). Otros factores menos conocidos, como por ejemplo, la forma de las partículas, también afectan la medida de DO, por lo tanto, la curva estándar que relaciona la DO con la concentración de biomasa debe realizarse para cada especie así como para cada tipo de experimento (Meynell y Meynell, 1969).

Con el fin de utilizar la DO de los cultivos como una medida rápida y sencilla de la concentración de biomasa, se realizaron curvas de calibración en función de los correspondientes valores de SSV. En la Figura 5.2 puede observarse que se encontró una muy buena correlación entre la DO (tanto para los cultivos de *S. natans* como de la cepa E932) y la concentración de sólidos suspendidos volátiles (Tabla 5.1); sin embargo, no se logró una correlación lineal para las muestras de barros activados. La falta de correlación entre SSV y la DO para barros activados se debe a que en estas muestras los microorganismos presentes no son siempre los mismos y el tamaño y densidad de los flóculos es variable. Por ello, no es recomendable la determinación de biomasa a partir de medidas de DO para muestras de barros activados.

La inversa de la pendiente de las rectas obtenidas, que es la DO de un cultivo por unidad de biomasa (DO/SSV), resultó 1.25 y 1.63 L/gSSV para *S. natans* y E932 respectivamente. Esto indica que para la misma concentración de SSV, la cepa E932 produce una DO un 30% mayor que para cultivos de *S. natans*. Por otra parte, para muestras de barros activados, los valores encontrados de absorbancia por unidad de biomasa fueron 0.38 a 1.29 L/gSSV, aunque la mayoría eran menores que el valor hallado para *S. natans*. Por lo tanto, se pueden ordenar los tres tipos de cultivos analizados en orden decreciente de valores del cociente DO/SSV del siguiente modo: cepa E932 > *S. natans* ≥ barros activados.

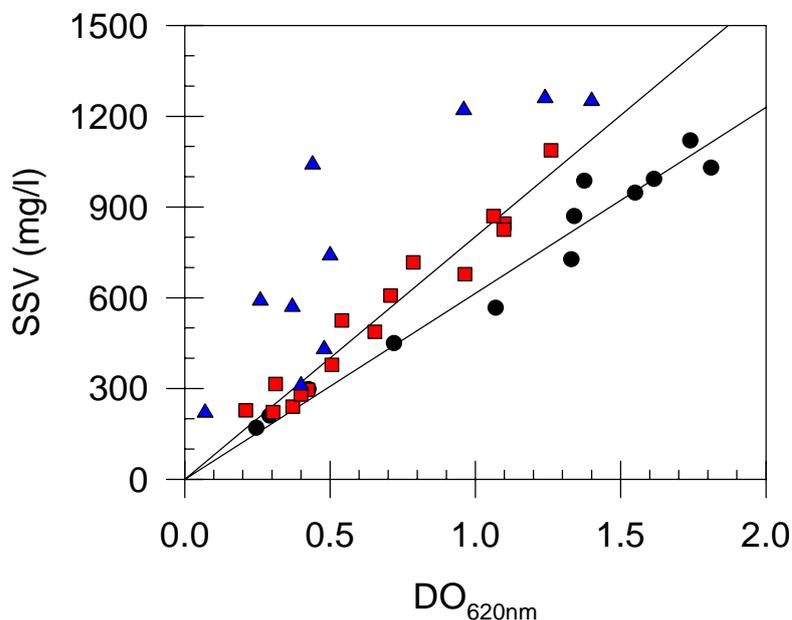


Figura 5.2. Relación entre la concentración de SSV y la DO (DO_{620nm}) para los diferentes cultivos estudiados: (l) E932, (n) *S. natans*, (s) Barros activados.

Tabla 5.1. Parámetros de las rectas obtenidas por la regresión entre SSV y DO a 620 nm para *S. natans* y la cepa E932

Microorganismo	Pendiente (mg/l)	σ_n (mg/l)	r^2	n
<i>S. natans</i>	802	20	0.9521	16
E932	615	16	0.9623	12

σ_n = desvío estándar

r^2 = coeficiente de correlación

n = número de datos

Es interesante observar que los cultivos quedan ordenados en forma inversa al tamaño de sus partículas; las células de la cepa E932 tienen un diámetro aproximado de 1 a 2 μm , *S. natans* es un microorganismo que forma filamentos de 1 μm de ancho que pueden llegar a cientos de μm de longitud mientras que algunos barros activados contienen flóculos que pueden llegar a varios milímetros de longitud. Estos resultados sugieren que la DO producida por unidad de SSV es inversamente proporcional al tamaño de las partículas presentes.

Varios autores proponen una relación directa entre la densidad óptica de una suspensión microbiana y el tamaño de las partículas presentes. Según Powell (1963), para una longitud de onda determinada la luz total dispersada por una suspensión bacteriana se incrementa con el aumento del tamaño de las partículas. En este sentido, van Hamersveld y col. (1997) propusieron una relación entre la densidad óptica de una suspensión de levaduras (DO), la concentración de partículas (N) y el cuadrado de su tamaño (d) según:

$$DO \propto N \times d^2 \quad (5.4)$$

Esta relación parecería contradecir los resultados hallados en el presente trabajo; sin embargo debe tenerse en cuenta que en la Ec. (5.4) la concentración se expresa como número de partículas por unidad de volumen (N) y no como masa de partículas por unidad de volumen (M) tal como se expresa en el presente trabajo (por ejemplo mgSSV/L). Si m es la masa de una partícula promedio, entonces: $N = M/m$. Si δ y v son la densidad y el volumen de la partícula media, entonces: $N = M / (\delta v)$. A su vez, puede asumirse que $v \propto d^3$, donde d es la longitud característica de la partícula media y por lo tanto: $N \propto M / (\delta d^3)$. Haciendo los reemplazos adecuados se demuestra que:

$$DO/M \propto 1 / (\delta d) \quad (5.5)$$

Según esta ecuación, la relación DO producida por una suspensión bacteriana por unidad de SSV (DO/SSV) debe ser inversamente proporcional al tamaño medio de las partículas presentes, tal como se analizó en forma cualitativa en el presente trabajo de Tesis.

5.2.3. Determinación de biomasa como DQO (método propuesto)

Con el objeto de evaluar la exactitud y precisión del método propuesto en el presente trabajo de Tesis para la medida de biomasa como DQO se determinó la DQO_B de diferentes muestras según: i) el método propuesto en el presente trabajo a través de la diferencia entre DQO_T y DQO_S y ii) el método desarrollado por Bullock y col. (1996). Se realizaron determinaciones de DQO_B en dos muestras diferentes de barros activados y en una muestra de un cultivo de *S. natans* (Tabla 5.2), observándose una muy buena concordancia entre los dos métodos de medida de la DQO asociada a los sólidos en suspensión.

En la práctica el método de Bullock presentaba varias desventajas en relación al método propuesto en el presente trabajo de Tesis. En primer lugar, en el método de Bullock se debe realizar una calcinación previa de los filtros a fin de eliminar todo resto de materia orgánica que pudiera interferir en la medida de la DQO retenida, este paso agregaba al menos una hora más al ensayo respecto al método propuesto. Por otra parte, debido a que en el método de Bullock se determina la DQO retenida por la membrana, la etapa de filtración no puede ser realizada más rápidamente mediante una centrifugación previa de las muestras como en el método propuesto. Adicionalmente se determinó que para el método propuesto la etapa de filtración podía ser eliminada sin observarse diferencias significativas debido a que la centrifugación era suficiente para realizar la separación de la biomasa. Estudios posteriores demostraron que para algunas muestras de barros activados que presentaban buenas propiedades de sedimentabilidad, incluso la etapa de centrifugación podía eliminarse debido a que la DQO correspondiente al sobrenadante del centrifugado era similar a la DQO del sobrenadante de la muestra sedimentada.

Aunque el método propuesto en el presente trabajo requiere dos determinaciones de DQO, brinda sin embargo una mayor información ya que las medidas de DQO_T y DQO_S , necesarias para calcular DQO_B , pueden ser utilizadas también en el cálculo del consumo de oxígeno por el cultivo, en el cálculo de parámetros cinéticos o en el control del desempeño de la planta de tratamiento (Dang y col., 1989; Aichinger y col., 1992).

Por otra parte, la técnica de determinación de la concentración de biomasa como DQO resultó mucho más rápida y sencilla que el método estándar de SSV; las determinaciones de DQO se realizaron con un kit comercial que requiere menores volúmenes de muestra, los resultados se obtenían en aproximadamente dos horas y se facilitaba el manejo de gran cantidad de muestras.

Tabla 5.2. Comparación entre los diferentes métodos aplicados para la estimación de biomasa como DQO

Tipo de Muestra	Concentración de biomasa (mgDQO/l)	
	Método propuesto (este trabajo)	Método de Bullock y col. (1996)
Barro activado 1	1309 (197)*	1463 (44)
Barro activado 2	1104 (48)	1200 (147)
<i>Sphaerotilus natans</i>	1499 (72)	1315 (30)

* El desvío estándar se indica entre paréntesis.

5.2.4. Estimación del factor de conversión f_x en diferentes sistemas

Como se discutió previamente en la introducción del presente Capítulo, el factor de conversión (f_x) que representa la DQO que es aportada por unidad de SSV es un parámetro clave en la aplicación de la mayoría de los modelos matemáticos de sistemas de barros activados. El valor de este factor de conversión depende de la composición microbiana de los barros activados y debido a que ésta composición puede ser muy variable, es conveniente determinar el valor de f_x en cada caso en particular.

Una vez determinada la validez de los diferentes métodos de medida de biomasa, éstos fueron empleados en la estimación del factor f_x . Se estudió el efecto del pH, condiciones de cultivo y tipo de microorganismo (*Sphaerotilus natans*, cepa E932 y barros activados) en el valor de f_x en sistemas batch y cultivos continuos.

Con el fin de determinar si el coeficiente f_x para *S. natans* era afectado por el pH del medio de cultivo, se realizaron experimentos tipo batch a pH controlado. El rango de pH estudiado fue de 6.0 a 8.5, que corresponde al rango de operación normal de una planta de tratamiento de efluentes líquidos por barros activados. El desarrollo de la biomasa en estos experimentos fue monitoreado a través de DQO_B y DO; los SSV se calcularon a partir de los valores de DO utilizando el factor de conversión para *S. natans* mostrado en la Tabla 5.1. Para cada experimento a un pH determinado, se graficaron los valores de DQO_B en función de SSV y de la pendiente se estimó el valor de f_x (Fig. 5.3).

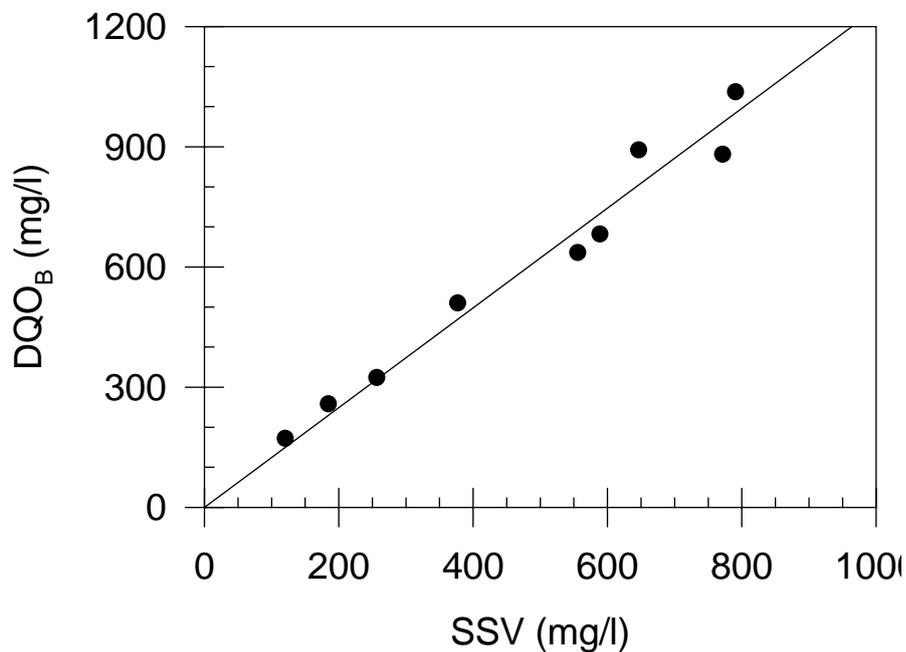


Figura 5.3. Determinación del coeficiente f_x para *Sphaerotilus natans*.

En este caso: pH = 7.0, $f_x = 1.25$ mgDQO_B/mgSSV, $r^2 = 0.9679$

Como puede observarse en la Figura 5.4, los valores de f_x para *S. natans* no se vieron influenciados por el pH del cultivo. Debido que no se observaron diferencias con el pH, se correlacionó el conjunto de todos los datos obtenidos durante los diferentes experimentos en cultivos batch (Fig. 5.5) obteniéndose un factor f_x de 1.28 mgDQO_B/mgSSV con $\sigma_n = 0.04$ mg DQO_B/mgSSV ($r^2 = 0.9401$, $n = 62$).

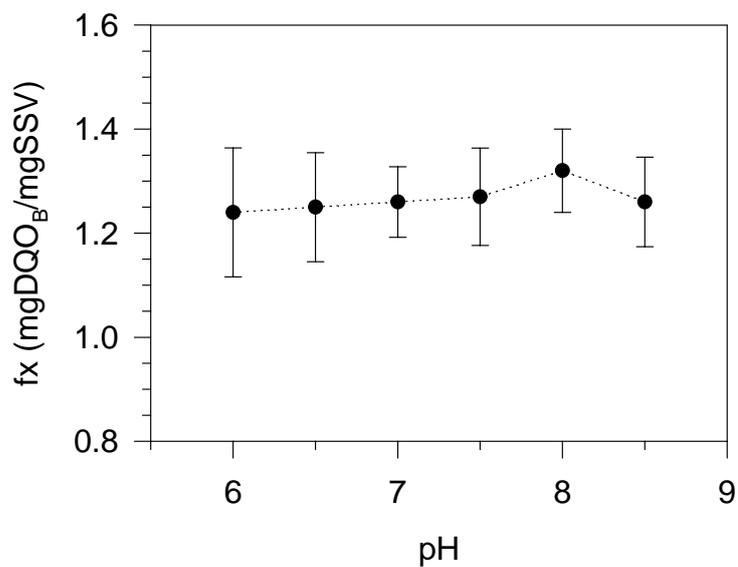


Figura 5.4. Efecto del pH en el valor de f_x para *Sphaerotilus natans* en cultivos batch. Las barras indican el desvío estándar.

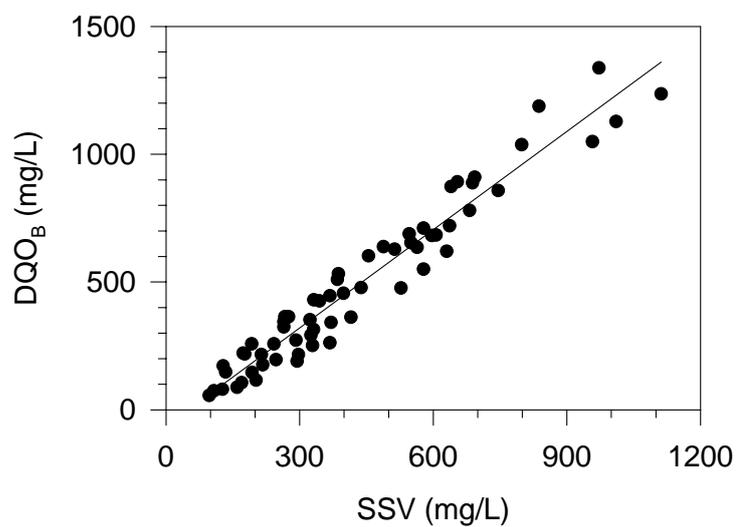


Figura 5.5. Correlación entre DQO_B y SSV para *S. natans* en sistema batch en el rango de pH estudiado (6.0 - 8.5).

En una segunda serie de experimentos se realizó una correlación de la DQO_B en función de SSV para *S. natans* y para la cepa E932 desarrollados en un sistema continuo. Para *S. natans*, los valores de SSV fueron determinados mediante la técnica estándar. En el caso de la cepa E932, la determinación de SSV se realizó mediante la técnica modificada desarrollada en el presente trabajo tal como se explicó anteriormente. El factor f_x se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida al graficar DQO_B en función de los SSV.

Como puede observarse en las Figuras 5.6.a y 5.6.b, se obtuvo una correlación satisfactoria entre los valores de DQO_B y los de SSV encontrándose un factor f_x de 1.25 mg DQO_B /mgSSV con $\sigma_n = 0.03$ mg DQO_B /mgSSV ($r^2 = 0.9278$, $n = 12$) para el caso de *S. natans* y 1.16 mg DQO_B /mgSSV con $\sigma_n = 0.03$ mg DQO_B /mgSSV ($r^2 = 0.9657$, $n = 12$) para la cepa E932. Los resultados obtenidos para *S. natans* concuerdan con los hallados previamente durante los experimentos en batch.

Asimismo, se realizaron estudios con el objeto de determinar el factor f_x para muestras de barros activados. Para ello, se correlacionaron los valores de SSV en función de la DQO_B para diferentes muestras obtenidas de una planta escala laboratorio de tratamiento de efluentes de la industria láctea. Como puede observarse en la Figura 5.6.c, se encontró correlación satisfactoria entre los datos obteniéndose un valor de f_x de 1.29 mg DQO_B /mgSSV con $\sigma_n = 0.03$ mg DQO_B /mgSSV ($r^2 = 0.9541$, $n = 27$).

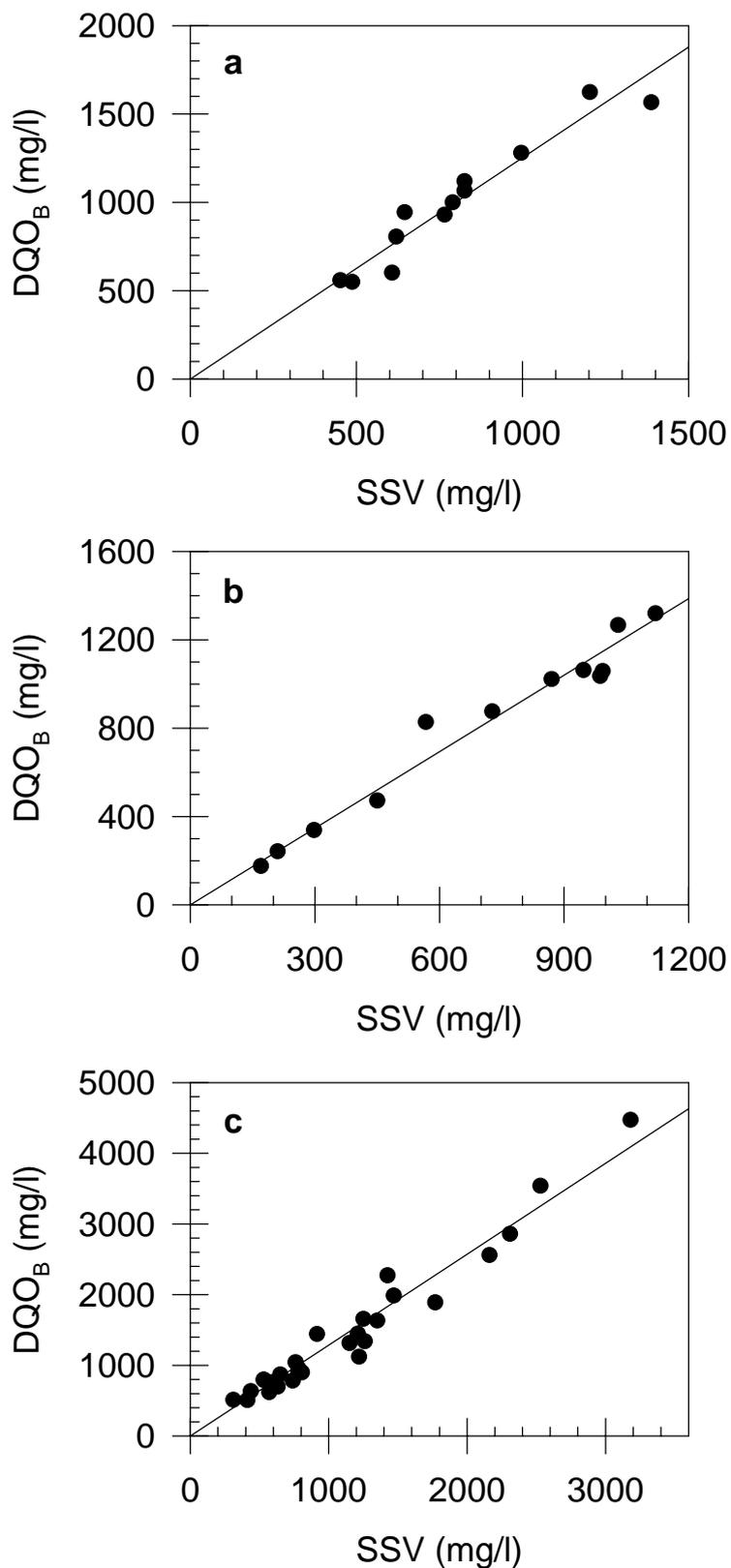


Figura 5.6. Relación entre DQO_B (método propuesto) y SSV para la determinación del valor de f_x en cultivo continuo: (a) *S. natans*, (b) cepa E932, (c) barros activados

5.2.5. Comparación entre los valores de f_x obtenidos en el presente trabajo con datos bibliográficos

En la Tabla 5.3 se comparan los valores del factor f_x determinados en el presente trabajo con algunos datos existentes en la bibliografía. Debido a que el fósforo representa solamente entre 1% al 3% de la biomasa total en barros activados, en muchos casos puede no ser tenido en cuenta sin cometer grandes errores. En estos casos, la ecuación de combustión completa de una biomasa de fórmula $C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$ resulta:



donde $x = \frac{1}{2} [2\alpha + \frac{1}{2} (\beta - 3\delta) - \gamma]$ son los moles de oxígeno necesarios para oxidar completamente un mol de biomasa. El valor de f_x correspondiente a una determinada fórmula de biomasa ($C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$) puede calcularse como los gramos de oxígeno necesarios para la combustión completa por gramo de biomasa, es decir:

$$f_x = \frac{32 x}{PF}$$

donde $PF = 12\alpha + \beta + 16\gamma + 14\delta$ es el peso correspondiente a la fórmula de la biomasa.

Los valores de f_x informados por diversos autores para cultivos puros y barros activados están comprendidos entre 1.14 y 1.66 gDQO_B/gSSV y como puede observarse en la Tabla 5.3, los resultados obtenidos en el presente trabajo se hallan dentro de este rango. La gran disparidad de valores de f_x en la literatura puede ser atribuida a diversos factores tales como: i) diferentes técnicas aplicadas en la estimación de la fórmula correspondiente a la biomasa, ii) diferencias propias entre los microorganismos estudiados y/o condiciones de cultivo.

El valor del coeficiente f_x más comunmente adoptado en la literatura es 1.42 gDQO_B/gSSV; en la Tabla 5.3 se presenta el error en la estimación de la biomasa en términos de DQO_B que se cometerá al asumir este valor de f_x . Cuando el valor experimental de f_x es mayor al valor estándar asumido (1.42 gDQO_B/gSSV) se hará una estimación por defecto de la biomasa que, según los datos bibliográficos presentados en la Tabla 5.3, puede llegar a -14.5%. Por el contrario, si f_x experimental es menor al valor estándar se calculará una concentración de biomasa que puede llegar a ser 24.6% mayor que el valor real. Por esta razón, es muy importante determinar un correcto valor de f_x para cada sistema en particular o bien medir la

biomasa directamente en términos de DQO_B con lo que se evita la necesidad de contar con el valor de f_X .

Tabla 5.3. Valores del coeficiente f_X para cultivos puros y barros activados

Tipo de cultivo	Fórmula	f_X (gDQO _B /gSSV)	Error (%)***	Referencia
Cultivos puros	C ₄₄ H ₈₀ O ₁₃ N ₁₁ P	1.61 [*]	-11.8	Stanier y col., 1970
Cultivos puros	variable	1.14 - 1.49 [*]	+24.6; -4.7	Roels, 1983
Cultivos puros	C ₆ H ₁₀ O ₃ N	1.39 [*]	+2.5	Pitter y Chudoba, 1990
Barro Activado	C ₆₀ H ₈₇ O ₂₃ N ₁₂ P	1.45 [*]	-2.1	Hoover y Porges, 1952
Barro Activado	C ₁₁₈ H ₁₇₀ O ₅₇ N ₁₇ P	1.39 [*]	+2.5	Sawyer, 1956
Barro Activado	C ₅ H ₇ O ₂ N	1.42 [*]	0	Irvine y Bryers, 1985
Barro Activado	C ₈ H ₁₄ O ₄ N	1.49 [*]	-4.7	Pitter y Chudoba, 1990
Barro Activado	n.d.	1.20 - 1.66 ^{**}	+18.3; -14.5	Bullock y col., 1996
<i>S. natans</i>	n.d.	1.25 - 1.28 ^{**}	+13.6; +10.9	Presente trabajo
Cepa E932	n.d.	1.16 ^{**}	+22.4	Presente trabajo
Barro Activado	n.d.	1.29 ^{**}	+10.1	Presente trabajo

* Calculado a partir de la ecuación de oxidación de la biomasa informada.

** Determinado experimentalmente.

*** Calculado mediante la siguiente expresión: $\text{Error} = 100 \frac{(1.42 - f_X)}{f_X}$

5.3. Conclusiones del Capítulo

* La modificación propuesta de la técnica para determinar SSV permitió cuantificar la biomasa para cultivos de bacterias del orden de $1 \mu\text{m}$ (como es la cepa E932) que el método estándar no puede detectar, debido a que las células no son retenidas por el tipo de filtro utilizada (APHA, 1992). Los valores de SSV obtenidos por la técnica estándar y la modificada no mostraron diferencias significativas. El coeficiente de variación de la técnica modificada resultó similar al de la técnica estándar, siendo menor al 3% para triplicados en el rango estudiado.

* La estimación de biomasa mediante DO resultó aplicable solamente para los cultivos puros estudiados; sin embargo, en sistemas de barros activados no se logró una buena correlación debido principalmente a la heterogeneidad de las muestras y a la variabilidad en el tamaño de los flóculos.

* Se encontró una muy buena concordancia entre la técnica propuesta de determinación de biomasa como DQO (calculada por diferencia entre DQO_T y DQO_S) y el método desarrollado por Bullock y col. (1996).

* El método propuesto de determinación de biomasa como DQO resultó más rápido y sencillo que el método clásico de determinación de SSV, requiere bajo volumen de muestra y utiliza un kit comercial para la determinación de DQO. Esto facilita el manejo de gran número de muestras y acorta el tiempo del ensayo a 2 hs.

* Mediante la aplicación de las diferentes técnicas desarrolladas en el presente trabajo se determinó el factor de conversión f_x ($\text{mgDQO}_B/\text{mgSSV}$) para diferentes tipos de cultivos; los valores hallados se encuentran comprendidos dentro del rango informado por otros autores.

* De acuerdo a los resultados obtenidos, el método propuesto para cuantificar en términos de DQO, la biomasa asociada a los sólidos suspendidos resulta aplicable tanto a estudios de laboratorio como a determinaciones en plantas de tratamiento de efluentes.

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE LA CEPA FLOCULANTE E932 EN CULTIVO CONTINUO

En el Capítulo 3 se describió el aislamiento y caracterización de la cepa floculante E932. El presente Capítulo está dividido en dos secciones: en la primera sección se estudia el efecto de la relación entre la concentración de la fuente de nitrógeno y la de carbono en la alimentación en el desarrollo del microorganismo; en la segunda sección se determinan los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan el desarrollo de la cepa E932 en sistemas continuos.

6.1. Efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de la cepa E932

Con el objeto de estudiar el efecto de la relación C:N en el desarrollo del microorganismo se realizaron experimentos de cultivo continuo en los cuales se modificó la concentración de sulfato de amonio (fuente de N) en la alimentación entre 20 a 420 mgN/L manteniendo constante la concentración de ácido cítrico (fuente de C) en 2400 mgDQO/L. El biorreactor utilizado, las condiciones de operación y el medio de cultivo fueron descritos en los Capítulos 3 y 4. En todos los casos el caudal de alimentación (Q) fue de 200 mL/h que corresponde a una velocidad de dilución ($D = Q / V$, donde V es el volumen del biorreactor) de 0.20 h^{-1} . El pH de trabajo fue 7 y la temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Se operó con una velocidad de aireación de 1.5 - 2.5 L/min y con una agitación de 400 - 800 rpm. Una vez alcanzado el estado estacionario se determinaron las concentraciones de la fuente de carbono (S) y biomasa (X) como DQO, tal como fue explicado en los Capítulos 2 y 5.

6.1.1. Resultados y Discusión

En la Figura 6.1 se grafica la concentración de la fuente de C (S) y biomasa (X) en el biorreactor en función de la concentración de fuente de N en la alimentación (N_0) determinadas para un valor constante de fuente de carbono en la alimentación: $S_0 = 2400 \text{ mgDQO}_5/\text{L}$.

Para concentraciones de la fuente de N entre 20 y 100 mgN/L (Fig. 6.1) la DQO soluble decrecía a medida que se agregaba más nitrógeno al medio de cultivo mientras que la biomasa aumentó; esto indicó que en estas condiciones el cultivo estaba limitado en la fuente de N. Por otra parte, cuando la concentración de fuente de

N variaba entre 100 y 500 mgN/L la utilización de DQO soluble era prácticamente total y la concentración de biomasa era constante, indicando una limitación en la fuente de C. Como puede verse, el consumo de S y la producción de X fueron proporcionales a N_0 hasta un cierto valor crítico (N_c) a partir del cual se mantuvieron constantes.

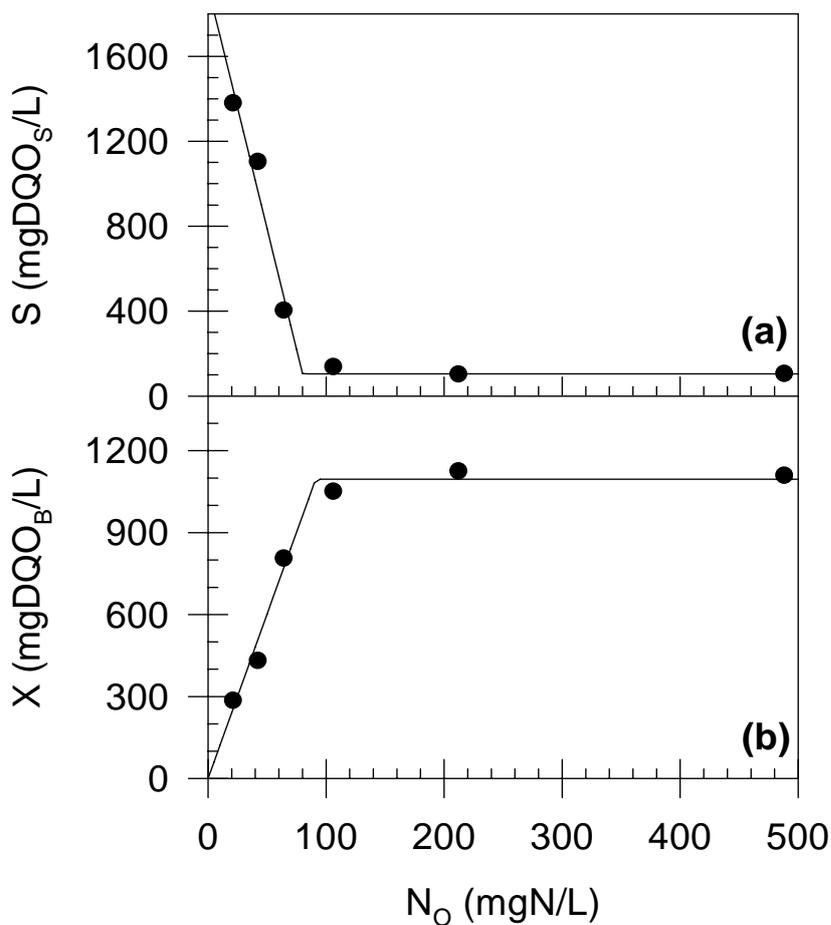


Figura 6.1. Efecto de la concentración de fuente de nitrógeno en la alimentación (N_0) en: (a) concentración de fuente de C (S); (b) concentración de biomasa (X).

(l) Datos experimentales, (—) Valores calculados mediante las Ecs. (6.4) y (6.5).

Se definió el coeficiente $Y_{S/N}$ como la cantidad de fuente de C removida por unidad de fuente de N consumida:

$$Y_{S/N} = \frac{S_0 - S}{N_0 - N} \quad (6.1)$$

donde: S_0 , S son las concentraciones de la fuente de C en la alimentación y en el biorreactor respectivamente y N_0 , N las concentraciones de la fuente de N en la alimentación y en el biorreactor respectivamente.

Análogamente, se definió el coeficiente $Y_{X/N}$ como la cantidad de biomasa producida por unidad de fuente de N consumida:

$$Y_{X/N} = \frac{X}{N_0 - N} \quad (6.2)$$

donde X es la concentración de biomasa en el biorreactor.

Cuando las fuentes de C y N se agregan en cantidades estequiométricas, éstas se consumen completamente: $N = 0$ y $S = 0$. Para un valor constante de S_0 , la concentración estequiométrica o crítica de fuente de N (N_C) es:

$$N_C = \frac{S_0}{Y_{S/N}} \quad (6.3)$$

Como puede observarse en la Figura 6.1, para valores de $N_0 < N_C$, el sustrato limitante es la fuente de N; a su vez, si $N_0 > N_C$ el sustrato limitante es la fuente de C.

Las concentraciones de fuente de C (S) y biomasa (X) en el biorreactor en estado estacionario pueden ser representadas mediante las siguientes ecuaciones:

$$S = \begin{cases} S_0(1 - N_0/N_C) & N_0 \leq N_C \\ 0 & N_0 > N_C \end{cases} \quad (6.4)$$

$$X = \begin{cases} Y_{X/N} N_0 & N_0 \leq N_C \\ Y_{X/N} N_C & N_0 > N_C \end{cases} \quad (6.5)$$

Las Ecs. (6.4) y (6.5) fueron ajustadas a los datos experimentales con el objeto de obtener los parámetros N_C e $Y_{X/N}$ encontrándose una correlación satisfactoria; en la Tabla 6.1 se presenta el resultado de los ajustes.

El término $Y_{S/N}$ se calculó mediante la Ec. (6.3) a partir de los datos mostrados en la Tabla 6.1 para N_C (80 – 91 mgN/L) resultando: $Y_{S/N} = 26 - 30$ mgDQO_S/mgN. Asimismo, la concentración de biomasa correspondiente al estado estacionario en condiciones de limitación en C se calculó como: $X = N_C Y_{X/N} = 1093 (\pm 120)$ mgDQO_B/L (Fig. 6.1).

Tabla 6.1. Parámetros estequiométricos de utilización de N obtenidos mediante el ajuste de las Ecs. (6.4) y (6.5) correspondientes a la cepa E932

Ecuación	N_C (mgN/L)	$Y_{X/N}$ (mgDQO _B /mgN)
(6.4)	80 (± 5)	--
(6.5)	91 (± 6)	12.0 (± 0.6)

Entre paréntesis se indica el desvío estándar

6.2. Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes a la cepa E932 en un medio limitado en fuente de carbono en cultivo continuo

A partir de los resultados encontrados, se realizó un estudio del desarrollo en un sistema de cultivo continuo de la cepa E932 en un medio con citrato como única fuente de C (2400 mgDQO/L) y amonio como fuente de N (200 mgN/L). La relación C:N seleccionada fue 12 mgDQO/mgN la cual aseguraba un exceso de fuente de N. El biorreactor utilizado, las condiciones de operación y el medio de cultivo fueron descritos en los Capítulos 3 y 4. Se trabajó con velocidades de dilución entre 0.20 y 1.00 h⁻¹. La velocidad de aireación era de 1.5 - 2.5 L/min con una agitación de 400 - 800 rpm. El pH de trabajo fue 7 y la temperatura de 30°C. Una vez alcanzado el estado estacionario para cada velocidad de dilución se determinaron las

concentraciones de la fuente de carbono (S) y biomasa (X) como DQO tal como fue explicado en los Capítulos 2 y 5.

6.2.1. Resultados y Discusión

En la Figura 6.2 se presentan los valores en estado estacionario de DQO soluble (DQO_S), biomasa (X) y DQO_T ($X+DQO_S$) obtenidos para diferentes velocidades de dilución (D). Se encontró que aún a valores de D menores a 0.40 h^{-1} , la DQO_S era siempre mayor a 80 mg/L debido posiblemente a restos celulares (Orhon y col., 1993) y/o productos de lisis bacteriana. Por lo tanto, para todos los cálculos siguientes se asumió un valor de DQO residual (DQO_R) de 80 mg/L ; la concentración de sustrato biodegradable (S) se calculó como la diferencia entre la DQO soluble y la DQO residual.

Para valores de D entre 0.20 y 0.80 h^{-1} la biomasa se mantuvo constante en aproximadamente $1200 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$ mientras que para D mayores a 0.50 h^{-1} se observó un aumento del sustrato. Para valores de D cercanos a 0.95 h^{-1} , la concentración de sustrato en el reactor aumentó hasta acercarse a su concentración en la entrada mientras que la biomasa disminuyó. En esta condición, la DQO_T estaba determinada principalmente por el sustrato. No se logró obtener un estado estacionario a valores de D mayores a 0.95 h^{-1} ya que el cultivo se lavaba (Fig. 6.2).

Con el objeto de obtener los parámetros cinéticos y el rendimiento en biomasa en condiciones de limitación en fuente de C se plantearon los balances de masa en el quimiostato para la concentración de microorganismos (X) y el sustrato limitante del desarrollo (S):

* Balance de masa para los microorganismos:

$$V \frac{dX}{dt} = V \mu X - V k_d X - Q X \quad (6.6)$$

donde Q = caudal de alimentación, V = volumen del cultivo, X = concentración de biomasa, μ = velocidad específica de crecimiento y k_d = constante de decaimiento de la biomasa. En estado estacionario:

$$\mu - k_d - D = 0 \quad (6.7)$$

donde $D = Q/V$ = velocidad de dilución.

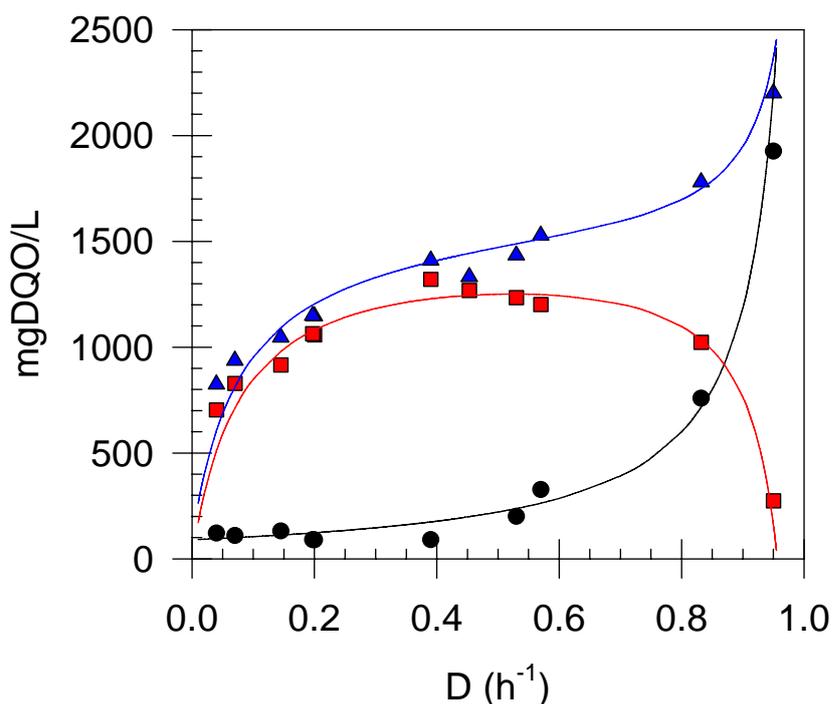


Figura 6.2. Efecto de la velocidad de dilución (D) sobre la cocentración de sustrato (DQO_S)(l), biomasa (X) (n) y DQO_T (s) correspondientes a la cepa E932.
 (—) Ec. (6.14) + DQO_R, (—) Ec. (6.16), (—) Ec. (6.14) + Ec. (6.16) + DQO_R

* Balance de masa para el sustrato limitante del desarrollo (citrate):

$$V \frac{dS}{dt} = Q S_0 - Q S - V q_s X \tag{6.8}$$

donde S₀ y S = concentración de sustrato a la entrada y a la salida del reactor respectivamente y q_s = velocidad específica de consumo de sustrato. En estado estacionario:

$$D(S_0 - S) - q_s X = 0 \tag{6.9}$$

El rendimiento verdadero en biomasa ($Y_{x/s}^V$) se define como:

$$Y_{x/s}^V = \frac{\mu}{q_s} \quad (6.10)$$

y combinando las Ecs. (6.7), (6.9) y (6.10) se obtiene la siguiente expresión:

$$q_s = \frac{D(S_o - S)}{X} = \frac{D}{Y_{x/s}^V} + \frac{k_d}{Y_{x/s}^V} \quad (6.11)$$

El cociente $k_d/Y_{x/s}^V$ también es conocido como coeficiente de mantenimiento (m_s) (Pirt, 1975). A partir del gráfico de q_s en función de D se estimaron los parámetros $Y_{x/s}^V$ y k_d mediante la Ec. (6.11); como puede observarse en la Figura 6.3 se encontró una muy buena correlación entre los valores de q_s y D . En la Tabla 6.2 se presentan los resultados obtenidos.

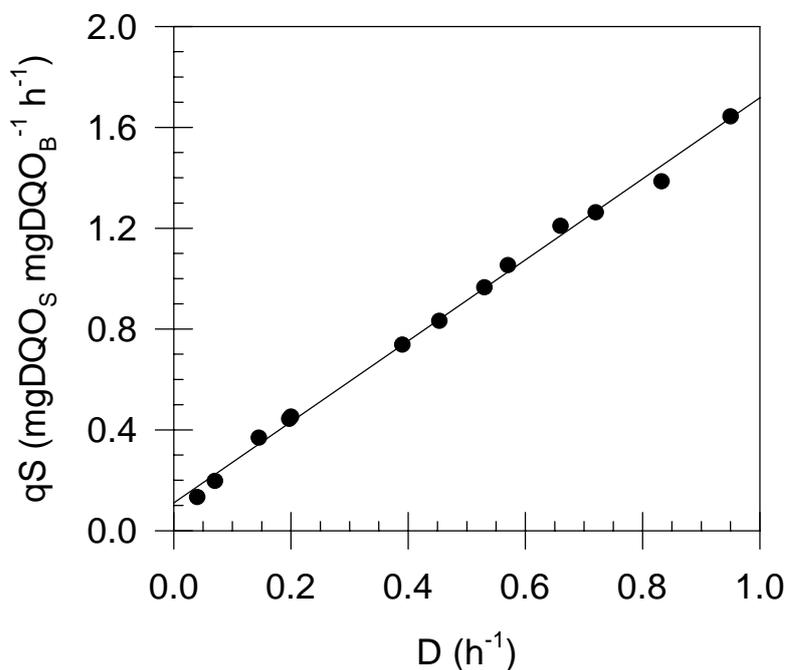


Figura 6.3. Efecto de la velocidad de dilución (D) en la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) para la cepa E932

De acuerdo con la ecuación de Monod (1949):

$$q_S = q_{S_{\max}} \frac{S}{K_S + S} \quad (6.12)$$

donde $q_{S_{\max}}$ = velocidad específica máxima de consumo de sustrato, K_S = constante de Monod. La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\mu_{\max} = \frac{Y_{x/s}^v}{q_{S_{\max}}} \quad (6.13)$$

En la Figura 6.4 se graficó q_S en función de S ; puede notarse claramente que la curva de Monod no pasa por el origen debido a la presencia de una DQO residual de aproximadamente 80 mg/L correspondiente a restos celulares y/o productos de lisis bacteriana. Asumiendo una DQO residual de 80 mg/L, los parámetros $q_{S_{\max}}$ y K_S fueron calculados mediante regresión no lineal por ajuste de la Ec. (6.12) a los datos experimentales; el valor de μ_{\max} se calculó mediante la Ec. (6.13). En la Tabla 6.2 se presentan los resultados obtenidos.

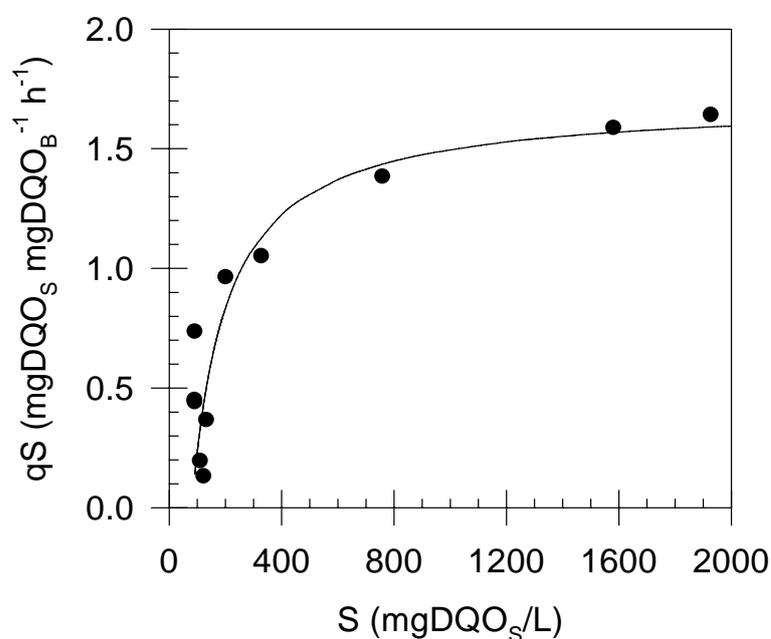


Figura 6.4. Efecto de la concentración de sustrato (S) en la velocidad específica de consumo de sustrato (q_S) para la cepa E932: (●) Datos experimentales, (—) Ec. (6.12)

Tabla 6.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes la cepa E932

Parámetro	Valor	DS	CV(%)
$Y_{x/s}^v$ (mgDQO _B mgDQO _S ⁻¹)	0.626	0.013	2
k_d (h ⁻¹)	0.069	0.011	16
q_{smax} (mgDQO _B mgDQO _S ⁻¹ h ⁻¹)	1.703	0.209	12
K_S (mgDQO _S /L)	130	55	42
μ_{max} (h ⁻¹)	1.066	0.133	12
m_s (mgDQO _B mgDQO _S ⁻¹ h ⁻¹)	0.110	0.018	16

DS: Desvío estándar

CV: Coeficiente de variación porcentual (= DS / Valor)

Una vez determinados los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan el desarrollo de la cepa E932, éstos pueden ser utilizados para calcular las concentraciones de sustrato (S), biomasa (X) y DQO_T (S+X) en función de la velocidad de dilución D. Mediante la combinación de las Ecs. (6.7), (6.10) y (6.12) se obtiene la siguiente expresión:

$$S = \frac{(D + k_d) K_S}{\mu_{max} - D - k_d} \quad (6.14)$$

Combinando las Ecs. (6.11) y (6.14) se obtiene una expresión para la variación de X en función de D:

$$X = Y_{x/s}^v D \left(\frac{S_o}{D + k_d} - \frac{K_S}{\mu_{max} - D - k_d} \right) \quad (6.15)$$

Mediante las Ecs. (6.14) y (6.16) y a partir de los parámetros presentados en la Tabla 6.2 se calcularon los valores de S y X en función de D considerando $S_o = 2400$ mgDQO/L. Como puede verse en la Figura 6.2, las ecuaciones empleadas predicen

satisfactoriamente el comportamiento de las variables del sistema en función de la velocidad de dilución.

Adicionalmente, los resultados obtenidos concuerdan satisfactoriamente con el estudio del efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de la cepa E932 comentado en la sección anterior del presente Capítulo. Las condiciones de operación utilizadas en esos experimentos eran: $D = 0.20 \text{ h}^{-1}$ y $S_0 = 2400 \text{ mgDQO}_S/\text{L}$; mediante la aplicación de la Ec. (6.15) se obtuvo un valor de $X = 1097 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$. Este valor es similar al valor calculado en la sección anterior a partir de los coeficientes presentados en la Tabla 6.1 ($X = N_C Y_{X/N} = 1093 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$).

Debido a que la concentración de sustrato en el biorreactor (S) puede ser como máximo igual a su concentración en la alimentación (S_0), esto impone una restricción en relación a la velocidad de dilución máxima (D_{\max}) que puede ser operado el biorreactor para que el microorganismo no se lave. Reordenando la Ec.(6.14) y teniendo en cuenta que cuando $S = S_0$, $D = D_{\max}$, se obtiene la siguiente expresión:

$$D_{\max} = \frac{S_0 (\mu_{\max} - k_d) - k_d K_S}{K_S + S_0} \quad (6.16)$$

A partir de los parámetros presentados en la Tabla 6.2 y teniendo en cuenta que $S_0 = 2400 \text{ mgDQO}/\text{L}$, se calculó un valor de $D_{\max} = 0.942 \text{ h}^{-1}$; este valor resultó similar al valor de la máxima velocidad de dilución para la cual se obtuvo un estado estacionario ($D = 0.95 \text{ h}^{-1}$).

6.3. Conclusiones del Capítulo

* En base al estudio del efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de la cepa E932 se determinó que para una relación C:N inferior a 26.4 - 30.0 mgDQO_S/mgN el crecimiento estará limitado por la fuente de C (ácido cítrico). Asimismo, se determinó que el rendimiento en biomasa en condiciones limitantes de fuente de N ($Y_{X/N}$) era de 12.0 mgDQO_B/mgN.

* Mediante experimentos en cultivo continuo se determinó que la concentración de la DQO soluble puede ser reducida solamente hasta un cierto límite que se denominó DQO residual = 80 mg/L. Este valor es la menor concentración de DQO soluble que se puede conseguir mediante el desarrollo de la cepa E932 en las condiciones de trabajo.

* Las ecuaciones empleadas permitieron predecir la concentración de sustrato biodegradable (S) y biomasa (X) en las condiciones de trabajo. Los experimentos de cultivo continuo en quimiostato permitieron determinar los siguientes parámetros que caracterizan el desarrollo de la cepa E932 en un sistema de cultivo continuo en un medio con citrato como sustrato limitante: $Y_{X/S}^V = 0.626 \text{ mgDQO}_B \text{ mgDQO}_S^{-1}$, $k_d = 0.069 \text{ h}^{-1}$, $q_{S_{\max}} = 1.703 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_S = 130 \text{ mgDQO}_S/\text{L}$, $\mu_{\max} = 1.066 \text{ h}^{-1}$, $m_S = 0.110 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$.

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL MICROORGANISMO FILAMENTOSO *SPHAEROTILUS NATANS*

Para comprender las causas del sobrecrecimiento de microorganismos filamentosos como *Sphaerotilus natans* en plantas de tratamiento de efluentes líquidos por barros activados es necesario conocer los parámetros que caracterizan su desarrollo. Hasta el presente, los datos cinéticos disponibles en literatura para *S. natans* se limitaban a sistemas que contenían glucosa como única fuente de carbono (Richard y col., 1985). Como se sabe, los parámetros cinéticos del desarrollo de un microorganismo dependen, entre otras variables, de la composición del medio de cultivo (Babel y col., 1993). Sin embargo, existen muchas aguas residuales donde la glucosa no es un componente cuantitativamente importante (efluentes municipales, industrias químicas, procesadoras de alimentos, etc.) y por lo tanto la aplicabilidad de los datos disponibles en literatura para modelar sistemas que tratan este tipo de efluentes es cuestionable.

El análisis del sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales (papas) demostró que el citrato es uno de los componentes predominantes (Capítulo 2). Por otro lado, los resultados del desarrollo de *S. natans* en diferentes sustratos demostraron que el microorganismo podía crecer en un medio con citrato como única fuente de carbono (Capítulo 3). Debido a que el efluente líquido analizado es un medio químicamente complejo, no definido y poco controlable, se desarrolló un medio de cultivo sintético (sistema modelo de efluente) con características similares al agua residual analizada (Capítulo 3).

El presente Capítulo se divide en tres secciones. En la primera sección se describen las experiencias realizadas con el objeto de estudiar el efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de *S. natans*. En la segunda sección se determinan los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan el crecimiento de *S. natans* en un medio limitado en carbono en cultivo continuo. En la tercera sección se estudia el efecto del pH sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes a *S. natans* en un medio limitado en carbono en sistemas batch mediante técnicas clásicas y respirométricas.

7.1. Efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de *S. natans*

El efecto de la relación C:N en la alimentación sobre el desarrollo de *S. natans* fue determinado a partir de experimentos en cultivo continuo como se explicó en el Capítulo 6.

7.1.1. Resultados y Discusión

En la Figura 7.1 se presentan las concentraciones de la fuente de C (S) y biomasa (X) en el biorreactor en función de la concentración de la fuente de N en la alimentación (N_0) obtenidas para un valor constante de la fuente de carbono en la alimentación ($S_0 = 2400 \text{ mgDQO}_S/\text{L}$). Como puede observarse, para concentraciones de la fuente de N entre 20 y 100 mgN/L, la DQO soluble decrecía a medida que se agregaba más nitrógeno al medio de cultivo mientras que la biomasa aumentó; estos resultados indicaron que en estas condiciones el cultivo estaba limitado en la fuente de N. Por otra parte, cuando la concentración de la fuente de N variaba entre 100 y 500 mgN/L, la utilización de DQO soluble era prácticamente total y la concentración de biomasa era constante indicando una limitación en la fuente de C. Las Ecs. (6.4) y (6.5) fueron ajustadas a los datos experimentales con el objeto de obtener los parámetros N_C e $Y_{X/N}$ encontrándose una correlación satisfactoria tal como se observa en la Figura 7.1; en la Tabla 7.1 se presenta el resultado de los ajustes.

El término $Y_{S/N}$ se calculó mediante la Ec. (6.3) a partir de los datos presentados en la Tabla 7.1 para N_C (88 - 102 mgN/L) resultando: $Y_{S/N} = 23.5 - 27.3 \text{ mgDQO}_S/\text{mgN}$. Para una relación C:N en la alimentación inferior a $Y_{S/N}$, el desarrollo del microorganismo resulta limitado por la fuente de C. En estas condiciones, la concentración de biomasa correspondiente al estado estacionario se puede calcular como: $X = (N_C \cdot Y_{X/N}) = 1329 (\pm 120) \text{ mgDQO}_B/\text{L}$ (Fig. 7.1).

Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores. Richard y col. (1985) encontraron que *S. natans* podía reducir la DQO soluble hasta valores muy bajos (cerca de 100 ppm) siempre que la relación C:N en la alimentación fuera menor a 21 mgDQO_S/mgN; sin embargo, para una relación mayor observaron un aumento en la DQO remanente indicando un exceso de fuente de C.

Finalmente, comparando la Figuras 6.1 y 7.1 y las Tablas 6.1 y 7.1 puede observarse que el comportamiento de la cepa E932 resultó similar al hallado para *S. natans* con relación al efecto de la relación C:N en la alimentación.

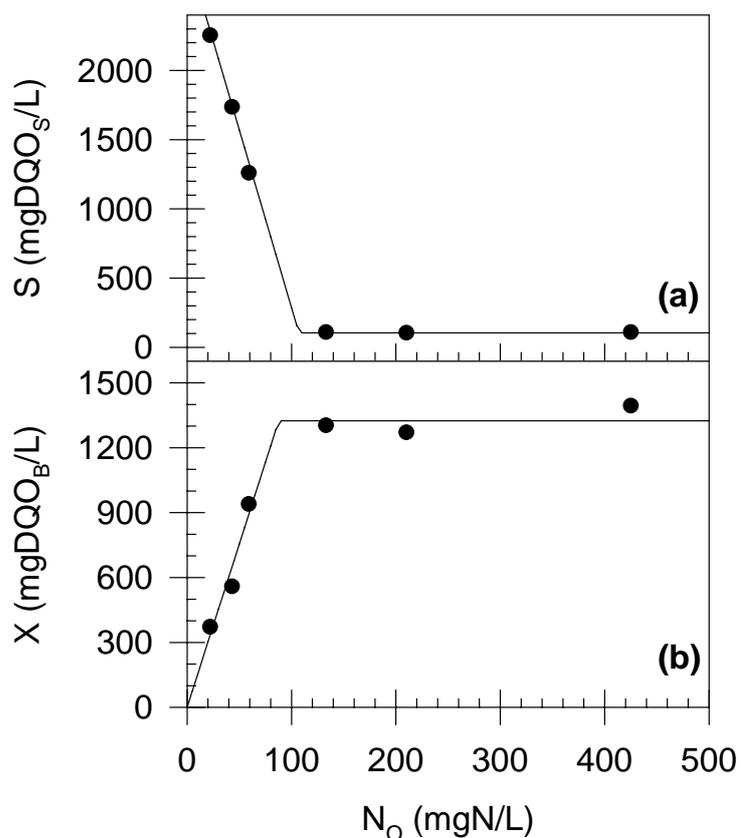


Figura 7.1. Efecto de concentración de fuente de N la alimentación (N_o) sobre:
 (a) concentración de fuente de C (S); (b) concentración de biomasa (X).
 (λ) Datos experimentales, (—) Valores calculados mediante las Ecs. (6.4) y (6.5).

Tabla 7.1. Parámetros estequiométricos de utilización de N obtenidos mediante el ajuste de las Ecs. (6.4) y (6.5) correspondientes a *S. natans*.

Ecuación	N_c (mgN/L)	$Y_{X/N}$ (mgDQO _B /mgN)
(6.4)	102 (± 2)	--
(6.5)	88 (± 6)	15.1 (± 0.9)

Entre paréntesis se indica el desvío estándar

7.2. Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de *S. natans* en un medio limitado en fuente de carbono en cultivo continuo

A partir de los resultados encontrados, se realizó un estudio del desarrollo de *S. natans* en un medio con citrato como única fuente de C (2400 mgDQO/L) y amonio como fuente de N (200 mgN/L). Las condiciones experimentales y las ecuaciones empleadas fueron descriptas en el Capítulo 6.

7.2.1. Resultados y Discusión

En la Figura 7.2 se muestran los valores en estado estacionario de sustrato (S), biomasa (X) y DQO_T (X+S) obtenidos para diferentes velocidades de dilución (D). Al igual que para la cepa E932, se encontró que aún a valores muy bajos de D (menores a 0.10 h⁻¹), la DQO_S era siempre mayor a 80 mg/L debido a restos celulares y/o productos de lisis bacteriana (Orhon y col., 1993); se asumió este valor como el correspondiente a la DQO residual. A su vez, la DQO_T estaba dada principalmente por la biomasa ya que la concentración de sustrato era muy baja.

Para valores de D mayores que 0.35 h⁻¹, se observó una disminución de la biomasa y un aumento en la concentración de sustrato en el reactor. No se logró obtener un estado estacionario a valores de D mayores a 0.41 h⁻¹ debido a que el cultivo se lavaba.

A partir del gráfico de q_S en función de D se estimaron los parámetros Y^V_{X/S} y k_d mediante la Ec.(6.11); como puede observarse en la Figura 7.3 se encontró una muy buena correlación entre los valores de q_S y D.

En la Figura 7.4 se graficó q_S en función de S; los parámetros q_{Smax} y K_S fueron calculados mediante regresión no lineal por ajuste de la Ec.(6.12) a los datos experimentales asumiendo una DQO residual de 80 mg/L; el valor de μ_{max} se calculó mediante la Ec.(6.13). En la Tabla 7.2 se presentan los resultados obtenidos.

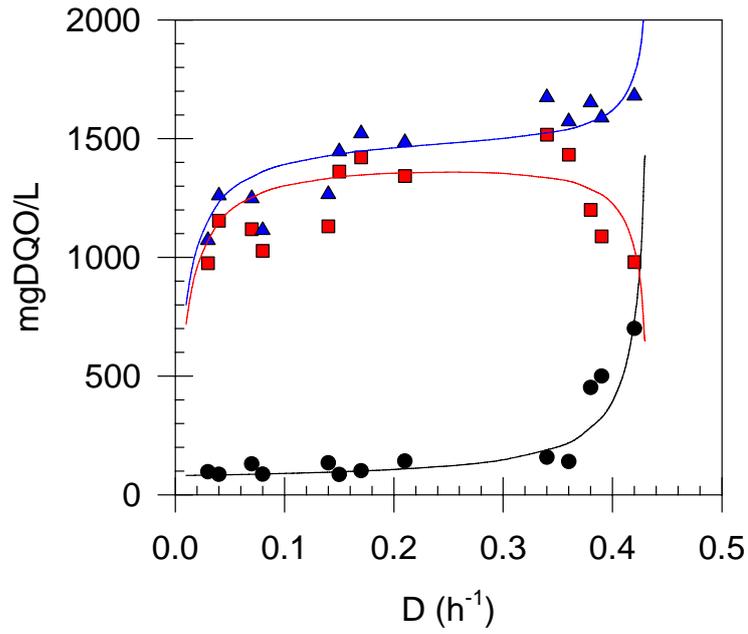


Figura 7.2. Efecto de la velocidad de dilución (D) sobre la concentración de sustrato (DQO_S) (λ), biomasa (X) (v) y DQO_T (σ) correspondientes a *S. natans*.
 (—) Ec. (6.14) + DQO_R , (—) Ec. (6.16), (—) Ec. (6.14) + Ec. (6.16) + DQO_R

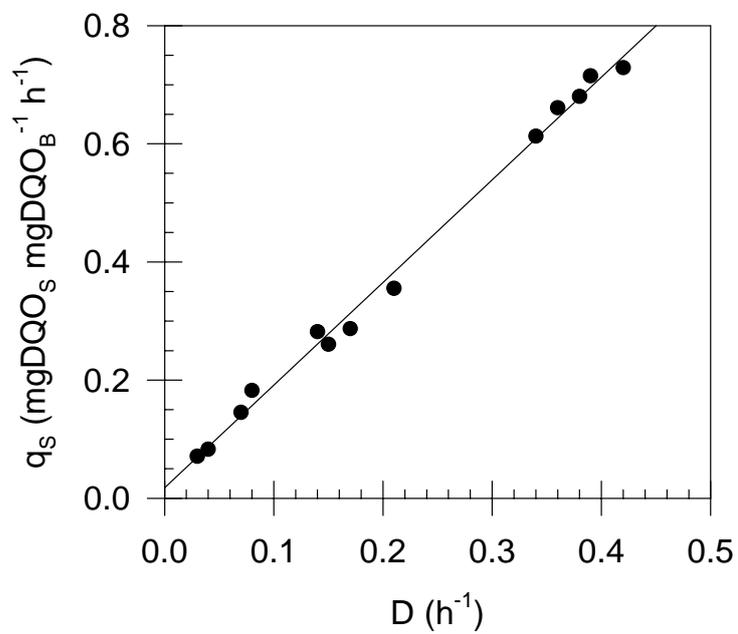


Figura 7.3. Efecto de la velocidad de dilución (D) en la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) para *S. natans*

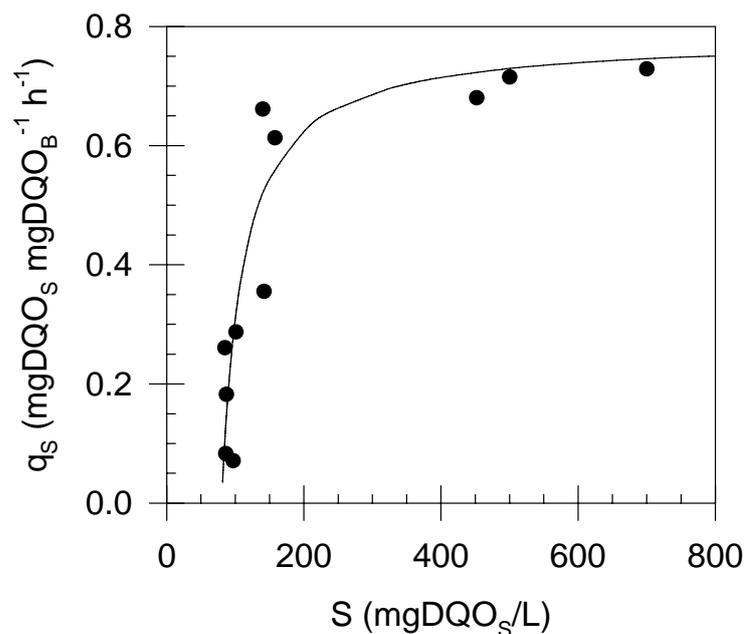


Figura 7.4. Efecto de la concentración de sustrato (S) en la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) para *S. natans*: (•) Datos experimentales, (—) Ajuste mediante la Ec. (6.12)

En la Tabla 7.2 se comparan los resultados de los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en el presente trabajo de Tesis con los datos disponibles en bibliografía (Richard y col., 1985). Los datos originales de Richard y col. (1985) fueron obtenidos utilizando glucosa (Glc) como fuente de carbono. Planteando la ecuación de oxidación de la glucosa:



se demuestra que se necesitan 6 moles de oxígeno por cada mol de glucosa consumida, o sea que la DQO aportada por mg de glucosa es $(6 \cdot 32 / 180) = 1.07$ mgDQO/mgGlucosa; este factor fue utilizado para convertir los datos bibliográficos a unidades DQO. Los datos informados por Richard y col. (1985) parecen ser los únicos disponibles en la literatura ya que otros autores citan a este trabajo como referencia (Jenkins, 1992; Wanner, 1994). Por otro lado, no han sido encontrados en la literatura estudios cinéticos de *S. natans* en un medio con citrato (u otra fuente de C a excepción de glucosa) como única fuente de carbono.

Tabla 7.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes a *S. natans*

Parámetro	<i>Sphaerotilus natans</i>			<i>S. natans</i> FA3* (Richard y col., 1985)
	Valor	DS	CV(%)	Valor
$Y_{X/S}^V$ (mgDQO _B mgDQO _S ⁻¹)	0.575	0.013	2	0.62 ^{**}
k_d (h ⁻¹)	0.011	0.006	60	0.003
q_{Smax} (mgDQO _S mgDQO _B ⁻¹ h ⁻¹)	0.797	0.115	14	0.44 ^{**}
K_S (mgDQO _S /L)	54	24	44	10.7
μ_{max} (h ⁻¹)	0.458	0.067	15	0.27
m_S (mgDQO _S mgDQO _B ⁻¹ h ⁻¹)	0.018	0.010	56	0.005 ^{**}

DS: Desvío estándar

CV: Coeficiente de variación (= DS / Valor)

* Los datos originales fueron transformados a unidades DQO mediante el factor 1.07 mgDQO/mgGlc.

** Se utilizó un factor de transformación de unidades de biomasa de 1.25 mgDQO_B/mgSSV, tal como se explicó en el Capítulo 5.

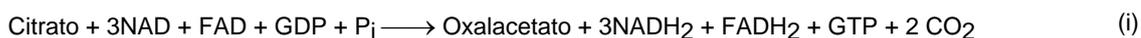
Como puede observarse en la Tabla 7.2, el valor de μ_{max} para *S. natans* en este estudio resultó superior al valor de bibliografía correspondiente a un medio con glucosa mientras que el valor de K_S para citrato expresado en unidades DQO resultó aproximadamente cinco veces mayor que para glucosa.

El valor del parámetro k_d hallado en el presente trabajo (0.01 h⁻¹) fue mayor que el hallado en bibliografía (0.003 h⁻¹). Como se sabe, k_d es extremadamente dependiente de las condiciones de cultivo como temperatura, pH, fuerza iónica y composición del medio (Postgate y Hunter, 1962, 1964; Fieschko y Humphrey, 1984) y por lo tanto resulta muy difícil su comparación. Una situación análoga se presenta con m_S , adicionalmente en este caso su valor también depende del rendimiento y en definitiva del sustrato utilizado. Existen diferentes factores que determinan que el

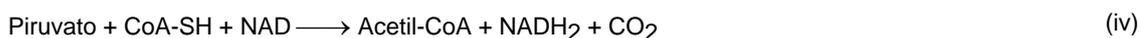
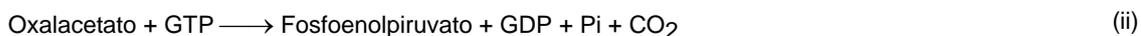
medio empleado no sea el óptimo para el desarrollo del *S. natans*. Por un lado, el medio empleado tenía una fuerza iónica relativamente alta debido a la elevada concentración de fosfatos y sulfato de amonio. Adicionalmente, es conocido el efecto antimicrobiano del ácido cítrico ya sea por su capacidad de quelación o por interferir en la generación de ATP (Wiley, 1994). De todas maneras, el objetivo del presente trabajo era el estudio del desarrollo *S. natans* en un medio de cultivo similar a un efluente de la industria procesadora de vegetales y no el desarrollo de un medio de cultivo óptimo para maximizar la obtención de biomasa.

El valor $Y_{X/S}^V$ informado por Richard y col. (1985) para *S. natans* utilizando glucosa como fuente de carbono (0.62 mgDQO_B/mgDQO_S) fue levemente superior al hallado en el presente trabajo (0.575 mgDQO_B/mgDQO_S). Sin embargo, para poder comparar los valores de $Y_{X/S}^V$ es conveniente expresar al sustrato en base molar. De esta manera, mientras que en un medio con glucosa el rendimiento en biomasa es de 95.2 gSSV por mol de glucosa consumida, en el presente trabajo se obtuvieron 71.0 gSSV por mol de citrato consumido.

La diferencia del rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) para *S. natans* utilizando un medio con glucosa (Richard y col., 1985) o ácido cítrico (presente trabajo) como única fuente de C se debe a que el carbono en la glucosa (C₆H₁₂O₆) tiene un estado de oxidación menor que en el ácido cítrico (C₆H₈O₇). El primer paso en la vía catabólica del citrato involucra 8 reacciones del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs) mediante el cual el citrato es oxidado a oxalacetato:



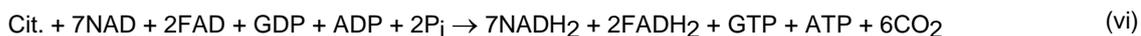
El oxalacetato es posteriormente oxidado a Acetil-CoA:



La reacción (ii) es el primer paso de la gluconeogénesis y es la vía precursora de otros azúcares; las reacciones (iii) y (iv) pertenecen a la vía glicolítica (Stanier y col., 1976). El ciclo continúa con una nueva molécula de citrato que ingresa y es oxidada a oxalacetato según la reacción (i). Finalmente, esta nueva molécula de oxalacetato se combina con el Acetyl-CoA para formar citrato:



Combinando las reacciones (i) a (v) y teniendo en cuenta además que dos moléculas de citrato son oxidadas a oxalacetato, se obtiene la estequiometría global de la oxidación completa del citrato:



Por cada molécula de NADH_2 que se oxida a través de la cadena respiratoria se generan tres moléculas de ATP; además se forman dos moléculas de ATP por cada molécula de FADH_2 que se oxida debido a su menor potencial redox. Por lo tanto, por cada molécula de citrato que se oxida completamente a CO_2 se obtienen 26 ATP y 1 GTP, lo cual es muy inferior a los 38 ATP obtenidos por mol de glucosa oxidada (Stanier y col., 1976). El estado de oxidación del carbono en la biomasa es similar al que tiene en la glucosa mientras que el carbono proveniente del citrato está más oxidado. Si el carbono del citrato aparece como biomasa, previamente debió ser reducido por los electrones provenientes de la respiración y por lo tanto estos electrones no pueden utilizarse en la formación de ATP.

Los parámetros cinéticos y estequimétricos obtenidos en cultivo continuo limitado en fuente de C (Tabla 7.2) concuerdan satisfactoriamente con el estudio del efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de *S. natans* comentado en la sección anterior del presente Capítulo. A partir de los parámetros presentados en la Tabla 7.2, asumiendo $D = 0.20 \text{ h}^{-1}$ y con un valor de $S_0 = 2400 \text{ mgDQO}_s/\text{L}$, mediante la Ec.(6.15) se obtiene un valor de $X = 1289 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$. Este valor es similar al valor calculado en la sección anterior a partir de los coeficientes presentados en la Tabla 7.1 ($X = N_C Y_{X/N} = 1329 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$).

7.3. Estudio del efecto del pH en el desarrollo de *S. natans* mediante técnicas respirométricas

La velocidad de consumo de oxígeno (OUR, "oxygen uptake rate") es un indicador de la actividad de microorganismos aeróbicos (Ros, 1993; Vanrollehem y col., 1994). Las medidas respirométricas están basadas en cambios en la concentración de oxígeno disuelto (OD) en un cultivo debido a la respiración aeróbica de los microorganismos presentes cuando son expuestos a cambios en la concentración de sustrato. La respirometría ha sido empleada en la determinación de parámetros cinéticos microbianos (Cech y col., 1985; Dang y col., 1989; Aichinger y col., 1992; Drtil y col., 1993; Orhon y col., 1995; Ellis y col., 1996; Ubisi y col., 1997), en la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (Köhne, 1985; Ros, 1993) y en el estudio de la toxicidad de aguas residuales (King y Dutka, 1986; Vanrollehem y col., 1994; Kong y col., 1996). Debido a la gran cantidad de información que se puede obtener, se han desarrollado sensores "on-line" para plantas de tratamiento de efluentes por barros activados basados en la técnica respirométrica (Holmberg y col., 1989; Sollfrank y Gujer, 1990; Vanrollehem y col., 1994).

En esta sección se describen los experimentos realizados con el fin de estudiar el efecto del pH sobre la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (q_{O_2max}), coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$) y rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) para *S. natans* en un medio limitado en carbono en sistemas batch mediante técnicas clásicas (Pirt, 1975) y respirométricas.

7.3.1. Condiciones experimentales

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: relación C:N en la alimentación = 12 mgDQO/mgN, temperatura de operación = 30°C, caudal de aireación = 1.5 - 2.5 L/min, agitación = 400 - 800 rpm, pH = 6 - 9. Durante el transcurso de un experimento típico el pH era controlado automáticamente con un error de ± 0.1 unidades mediante agregado de ácido sulfúrico (1M).

Para cada condición experimental se realizaba una etapa de adaptación de *S. natans* que consistía en un cultivo batch ajustando el pH al valor deseado. Una vez transcurridas aproximadamente 24 hs., se retiraban 800 a 900 mL del cultivo los cuales eran reemplazados con medio fresco. Si el pH cambiaba, éste era restituido al valor deseado por agregado de H₂SO₄ (1M) o NaOH (1M) según fuera necesario. Este proceso de adaptación acortaba notoriamente la fase de latencia ya que el microorganismo comenzaba a crecer en fase exponencial entre 1 a 3 horas después del recambio de medio de cultivo. Se retiraban alícuotas del cultivo a diferentes

tiempos y se efectuaban las siguientes determinaciones: velocidad de consumo de oxígeno (OUR), demanda química de oxígeno total (DQO_T) y soluble (DQO_S) y densidad óptica (DO). La biomasa se calculó como la diferencia entre los valores de DQO_T y DQO_S y mediante los valores de DO según lo explicado en el Capítulo 5. Las determinaciones de DQO se realizaron según lo explicado en el Capítulo 2.

La medida de velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo (OUR) fue realizada en un respirómetro que consistía en un vaso con agitador magnético y termostatzado (30°C) en el cual se agregaban 20 mL del cultivo y se saturaba con aire. Posteriormente se cortaba la aireación y se medía el descenso de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en función del tiempo; a partir de la pendiente de esta recta se determinaba OUR. La concentración de oxígeno disuelto se determinaba con un electrodo de oxígeno (YSI Incorp., Ohio, USA) el cual se ajustaba perfectamente en el vaso a fin de impedir el ingreso de oxígeno atmosférico. Los datos eran adquiridos mediante una microcomputadora con una frecuencia de 1 dato por segundo.

7.3.2. Ecuaciones empleadas

Debido a su sencillez, el método más comúnmente utilizado para la medida de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) es el cultivo en batch. Por definición, para un microorganismo creciendo en fase exponencial se considera:

$$\ln(X_t) = \ln(X_0) + \mu_{\max} t \quad (7.1)$$

donde X_0 y X_t son la concentración de biomasa a tiempo cero y t respectivamente. Graficando $\ln(X_t)$ en función de t se obtiene una recta con pendiente μ_{\max} . Es interesante notar que el valor de μ_{\max} no depende del método de medida o de las unidades con que se exprese X ; por lo tanto, cualquier propiedad proporcional a la biomasa puede ser utilizada para estimar μ_{\max} . Por ejemplo, en el Capítulo 5 se demostró que la densidad óptica de los cultivos de *S. natans* era proporcional a la concentración de sólidos suspendidos volátiles, siendo este último parámetro una medida de la biomasa. Alternativamente, se puede expresar la biomasa en unidades DQO según lo explicado en el Capítulo 5 y por lo tanto estimar μ_{\max} a partir de estos datos.

Se define la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno ($q_{O_2\max}$) como:

$$q_{O_2max} = OUR / X \tag{7.2}$$

donde OUR es la velocidad de consumo de oxígeno de los microorganismos cuando crecen en fase exponencial. Si q_{O_2max} es constante, OUR es proporcional a la concentración de biomasa (X). Reemplazando la Ec. (7.2) en la Ec. (7.1) resulta:

$$\ln(OUR_t) = \ln(OUR_o) + \mu_{max} t \tag{7.3}$$

donde OUR_o y OUR_t es la velocidad de consumo de oxígeno inicial y a tiempo t respectivamente. Por lo tanto, siempre que q_{O_2max} se mantenga constante, se podría estimar μ_{max} a partir de medidas de OUR.

Por definición, un microorganismo aeróbico como *Sphaerotilus natans* consume oxígeno durante su desarrollo a fin de obtener energía por oxidación de la fuente de carbono. La cantidad de oxígeno consumido durante el desarrollo del microorganismo (OC_t) puede estimarse de diferentes maneras:

a.- Por balance de DQO (Dang y col., 1989; Aichinger y col., 1992): el oxígeno consumido a tiempo t es la diferencia entre la demanda química de oxígeno total del sistema (soluble + en suspensión) inicial (DQO_{T_o}) y a tiempo t (DQO_{T_t}):

$$OC_t = DQO_{T_o} - DQO_{T_t} \tag{7.4}$$

b.- A partir de la velocidad de respiración (Vanrolleghem y col., 1994; Orhon y Artan, 1994): el oxígeno consumido se calcula como la integral de OUR en función del tiempo transcurrido del experimento:

$$OC_t = \int_0^t OUR_t \cdot dt \tag{7.5}$$

Los valores de OC_t calculados mediante las Ecs. (7.4) y (7.5) pueden no coincidir en todos los casos. Por ejemplo, si hay ácidos orgánicos u otras sustancias volátiles (ya sea propios del medio de cultivo o generados como productos metabólicos) que se escapan por los gases de salida, entonces la DQO_T del sistema disminuye pero sin que haya habido consumo de oxígeno. Por otro lado, si el microorganismo utiliza un aceptor de electrones diferente al oxígeno (nitrato, nitrito, sulfato, etc.) también se observará una disminución de la DQO_T del sistema; en ambos casos mediante el empleo de la Ec. (7.4) se sobreestima el valor de OC_t respecto de la Ec. (7.5). Sin

embargo, esto no quiere decir que la Ec. (7.4) sea errónea sino que ambas ecuaciones dan información complementaria.

Wentzel y col. (1995) definen el porcentaje de recuperación de DQO mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{DQO}_{\text{rec}} = \frac{\text{DQO}_{\text{Tt}} + \int_0^t \text{OUR}_t \cdot dt}{\text{DQO}_{\text{To}}} \cdot 100 \quad (7.6)$$

Haciendo las sustituciones adecuadas se puede demostrar que si el cálculo de OC_t mediante el empleo de las Ecs. (7.4) y (7.5) coincide, entonces el porcentaje de recuperación es del 100%.

Se define el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{\text{O/S}}$) como el oxígeno consumido por el microorganismo por unidad de sustrato utilizado:

$$Y_{\text{O/S}} = \frac{\text{OC}_t}{S_0 - S_t} \quad (7.7)$$

donde S_0 y S_t es el sustrato inicial y al tiempo t respectivamente. Reordenando la ecuación anterior:

$$\text{OC}_t = Y_{\text{O/S}} \cdot S_0 - Y_{\text{O/S}} \cdot S_t \quad (7.8)$$

y graficando OC_t en función de S_t se obtiene una recta con pendiente $-Y_{\text{O/S}}$.

Análogamente, el rendimiento en biomasa ($Y_{\text{X/S}}$) es la biomasa obtenida por unidad de sustrato utilizado y se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$X_t = X_0 + Y_{\text{X/S}} \cdot S_0 - Y_{\text{X/S}} \cdot S_t \quad (7.9)$$

Graficando X_t en función de S_t se obtiene una recta con pendiente $-Y_{\text{X/S}}$. Combinando las Ecs. (7.8) y (7.9) y aplicando un balance de DQO se puede demostrar que la suma $Y_{\text{X/S}} + Y_{\text{O/S}}$ debe ser igual a 1 (Irvine y Bryers, 1985). Esta igualdad puede ser utilizada para verificar la consistencia de los datos.

Haciendo los reemplazos adecuados se puede demostrar que:

$$\mu_{\text{max}} = q_{\text{O2max}} (Y_{\text{X/S}} / Y_{\text{O/S}}) \quad (7.10)$$

Esta ecuación vincula medidas de OUR (las cuales son sencillas y rápidas de efectuar) con μ_{\max} . Por ejemplo, si se conocen los rendimientos y la biomasa entonces se podría estimar μ_{\max} a partir de la medida de OUR; la ventaja de esto es que la medida de OUR es instantánea y se puede hacer "on-line". La Ec. (7.10) es la base de la técnica respirométrica empleada por diferentes autores para estimar parámetros cinéticos (Cech y col., 1985; Dang y col., 1989; Aichinger y col., 1992; Orhon y Artan., 1994; Vanrollenghem y col., 1994).

7.3.3. Resultados y Discusión

En estudios preliminares en sistema continuo sin control de pH se observó que, aunque el medio de cultivo contaba con un sistema buffer relativamente fuerte (0.01 M en $\text{PO}_4^{=}$, $\text{pH}_{\text{inicial}} = 6.9$), el microorganismo producía una alcalinización importante. El pH del medio de cultivo a la salida del biorreactor era 8.9 para $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$ aunque con tendencia a disminuir a medida que se aumentaba D (Fig. 7.5). Este comportamiento fue observado previamente por diversos autores para algunas bacterias ácido-lácticas cuando se desarrollan en un medio de cultivo con ácido cítrico como única fuente de carbono (Ramos y col., 1994; Magni y col., 1996).

Algunos autores asocian esta alcalinización del medio a un transporte de H^+ hacia el interior celular junto con la captación de citrato (Hugenholtz y col., 1993; Ramos y col., 1994; Magni y col., 1996; Bandell y col., 1998). El paso inicial en la utilización del citrato es el transporte del mismo a través de la membrana celular y este paso puede limitar su velocidad de metabolización. La capacidad de metabolizar citrato se encuentra vinculada a la presencia de una enzima transportadora, la cual es responsable de la incorporación del citrato presente en el medio. Se han identificado transportadores de citrato en diferentes cepas de los géneros bacterianos *Lactococcus* y *Leuconostoc* (Starremburg y Hugenholtz, 1991), *Salmonella* (Ishiguro y col., 1992), *Klebsiella* (Lolkema y col., 1994), *Pseudomonas* (Joshi-Tope y Francis, 1995) y *Bacillus* (Boorsma y col., 1996) así como también en el hongo filamentoso *Aspergillus niger* (Kontopidis y col., 1995).

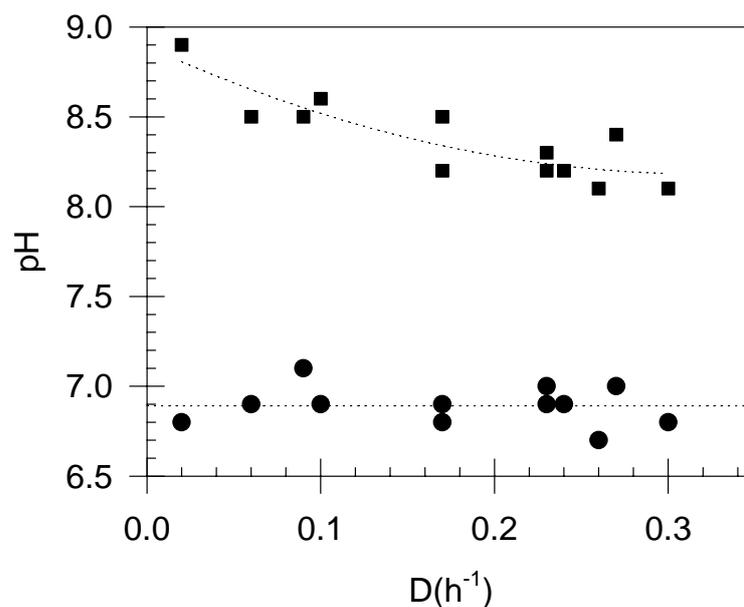


Figura 7.5. Efecto de la velocidad de dilución (D) en el pH del medio en el biorreactor (v) para *S. natans*; pH de la alimentación (λ)

El mecanismo de captación e incorporación de citrato por parte de la célula no ha sido totalmente dilucidado. Algunos autores sugieren que la especie transportada es CitH^{-2} (Hugenholtz y col., 1993; Magni y col., 1996; Bandell y col., 1998). Sin embargo, los resultados informados por Ramos y col. (1994) indican que CitH_2^- es la especie transportada. Es importante aclarar que la mayoría de estos estudios se realizó en un rango de pH comprendido entre 4 y 6.

El ácido cítrico es un ácido trivalente ($\text{p}K_1 = 3.14$, $\text{p}K_2 = 4.77$, $\text{p}K_3 = 5.40$). La fracción de cada especie presente (Cit^{-3} , CitH^{-2} , CitH_2^- y CitH_3) depende del pH; estas fracciones pueden ser calculadas planteando el balance de masa para el ácido cítrico y tomando en cuenta las constantes de disociación. Por ejemplo, la fracción de la especie CitH^{-2} (α_2) puede calcularse según la siguiente ecuación:

$$\alpha_2 = \frac{\text{CitH}^{-2}}{C_T} = \left(\frac{H^2}{k_1 k_2} + \frac{H}{k_2} + 1 + \frac{k_3}{H} \right)^{-1} \quad (7.11)$$

donde C_T es la concentración analítica (total) de ácido cítrico y H es la concentración del ión hidronio ($H = 10^{-\text{pH}}$).

En la Figura 7.6 se muestra la fracción (α) de las cuatro especies posibles del ácido cítrico (Cit^{-3} , CitH^{-2} , CitH_2^{-} y CitH_3) en función del pH. Como puede observarse, dentro del rango de pH analizado (6 - 9) las especies predominantes son Cit^{-3} y CitH^{-2} mientras que CitH_2^{-} es menor al 4% y la cantidad de CitH_3 es prácticamente despreciable. Por ejemplo, a pH = 7.5 las cantidades relativas de las diferentes especies son 0.01% para CitH_2^{-} , 7.16% para CitH^{-2} y 92.83% para Cit^{-3} . Es evidente que, entre las dos posibles especies que serían transportadas al interior celular (CitH_2^{-} y CitH^{-2}) según diferentes autores (Hugenholtz y col., 1993; Ramos y col., 1994; Magni y col., 1996; Bandell y col., 1998), solamente CitH_2^{-} aparece en proporción significativa dentro del rango de pH estudiado.

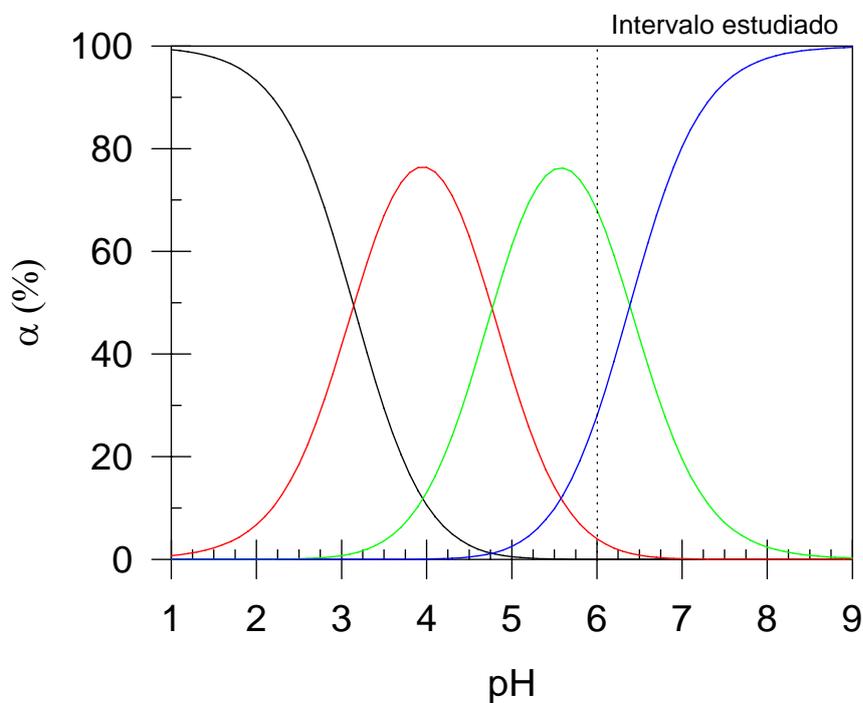


Figura 7.6. Efecto del pH en la distribución de las diferentes especies del ácido cítrico: (—) Cit^{-3} , (—) CitH^{-2} , (—) CitH_2^{-} , (—) CitH_3

A continuación se muestra un ejemplo de los cálculos realizados con el objeto de determinar la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (q_{O2max}), coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$) y rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) para cada pH. El ejemplo analizado corresponde a un pH = 7.0.

En la Figura 7.7 se presenta variación de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en función del tiempo para muestras tomadas a diferentes tiempos de operación del batch. Para cada muestra se determinó la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) como la pendiente de la recta obtenida. Como puede observarse, a medida que transcurría el tiempo del experimento, los valores de OUR se incrementaron indicando un aumento de la concentración de biomasa.

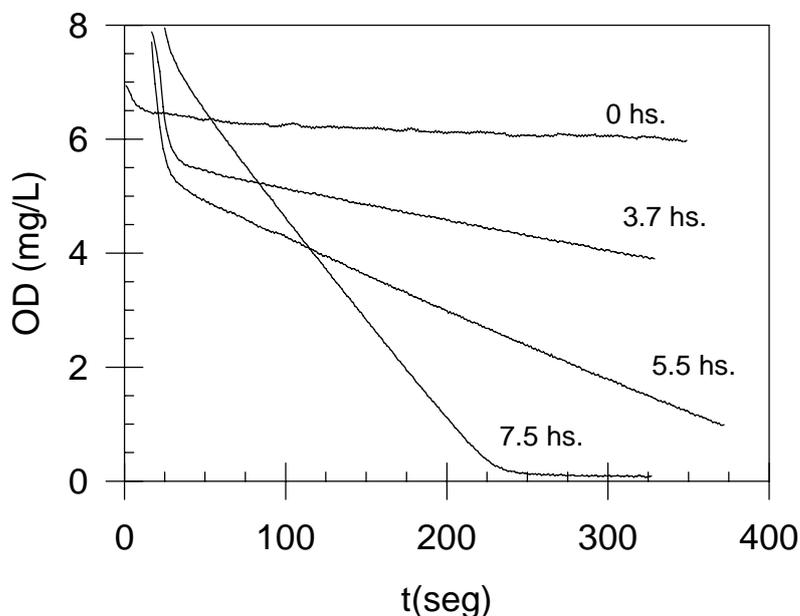


Figura 7.7. Determinaciones de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en función del tiempo para determinar la OUR correspondiente a *S. natans*. En cada curva se indica el tiempo en el cual se retiró la muestra del biorreactor.

Se observó que el microorganismo creció en forma exponencial a partir de la segunda hora de iniciado el experimento según lo indica la variación de densidad óptica (DO) (Fig. 7.8.a), OUR (Fig. 7.8.b) y DQO_B (Fig. 7.8.c) en función del tiempo y se mantuvo así al menos hasta las 8.5 horas. Puede observarse además que la DQO_S fue siempre mayor a 1000 mg/L; además, como el oxígeno disuelto fue siempre mayor

al 50% de saturación, la velocidad específica de crecimiento correspondía a μ_{max} . A partir de los datos de DO, OUR y DQO_B se calculó μ_{max} mediante las Ecs. (7.1) y (7.3).

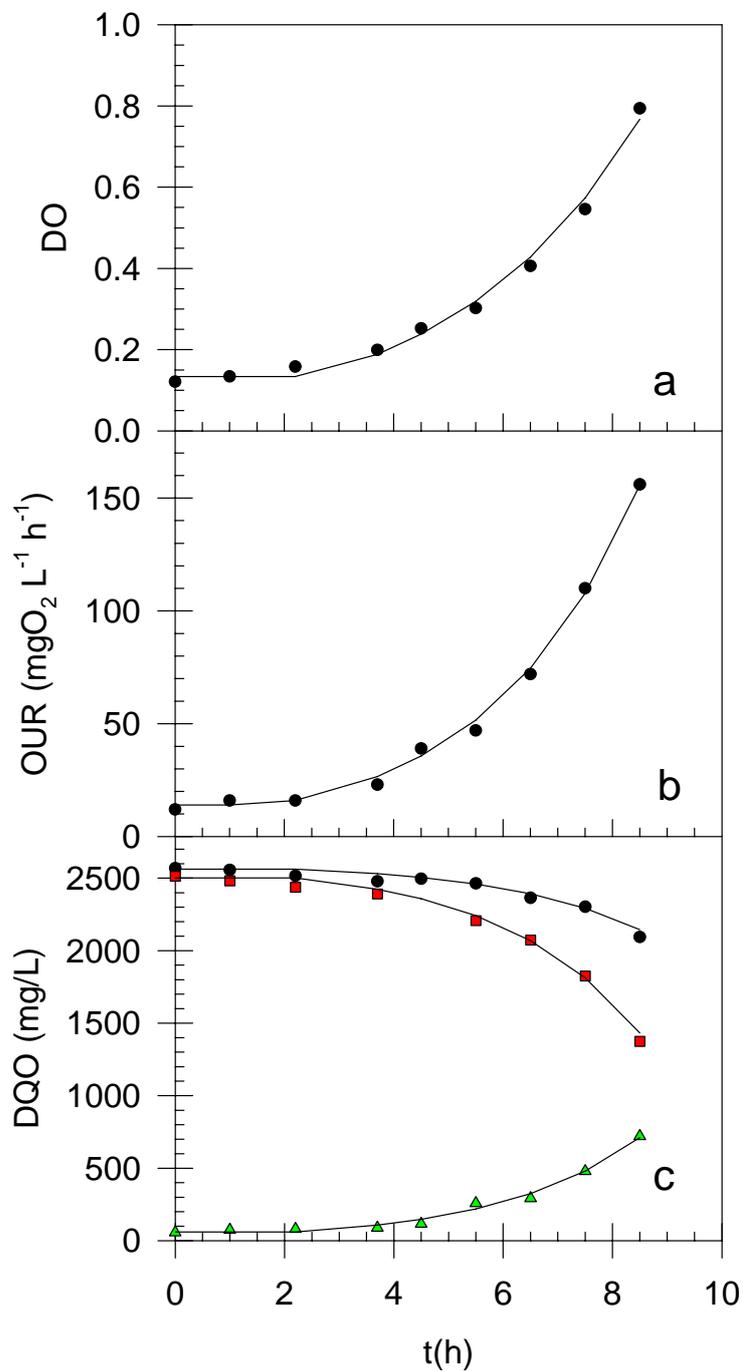


Figura 7.8. Desarrollo de *S. natans* en sistema batch a pH = 7.
 (a) Densidad Óptica (λ), (b) Velocidad de consumo de oxígeno (λ)
 (c) DQO_T (λ), DQO_S (ν) y DQO_B (σ) en función del tiempo.

La velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (q_{O_2max}) se estimó como la pendiente de la recta obtenida al graficar OUR en función de la biomasa estimada como DQO_B (Fig. 7.9). Como puede observarse, se encontró una buena correlación entre los resultados; esto indica que q_{O_2max} fue aproximadamente constante durante todo el experimento y justifica la utilización de medidas de OUR a los efectos de estimar μ_{max} .

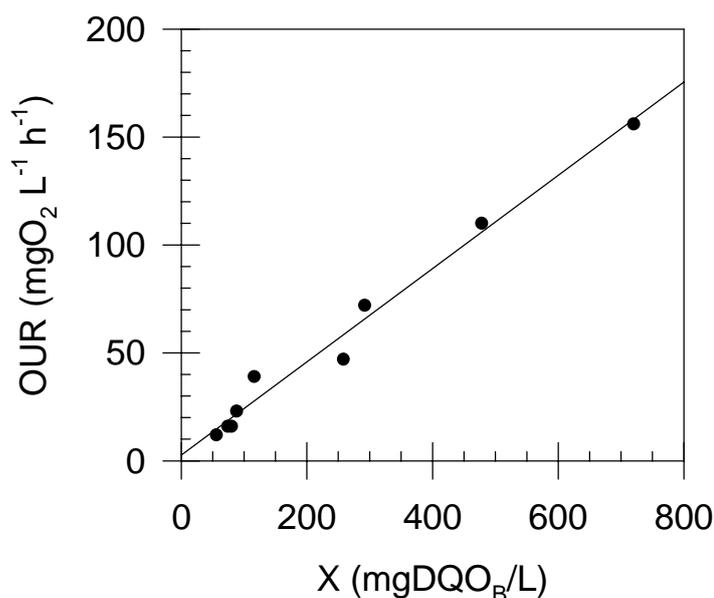


Figura 7.9. Velocidad de consumo de oxígeno (OUR) en función de la biomasa (X).

En la Figura 7.10.a se muestra el oxígeno consumido por *S. natans* en función del tiempo del experimento. Puede observarse que el cálculo de OC_t según las Ecs. (7.4) y (7.5) conduce a idénticos resultados. Asimismo, en la Figura 7.10.b se observa que el porcentaje de recuperación (Ec. 7.6) fue cercano al 100% durante todo el experimento. Estos resultados indican que no hubo pérdidas o fugas (al menos apreciables) de alguna sustancia volátil (DQO) por los gases de salida; por lo tanto, *S. natans* utilizó exclusivamente oxígeno molecular como aceptor de electrones tal como informa Mulder (1989).

A fin de calcular el rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) y el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$) se graficó la biomasa (X) y el oxígeno consumido (OC) en función del sustrato remanente (Fig. 7.11). Puede observarse que se encontró una correlación satisfactoria entre las variables y que tanto $Y_{X/S}$ como $Y_{O/S}$ fueron constantes durante

todo el experimento. Aplicando las Ecs. (7.8) y (7.9) se calcularon los valores de $Y_{O/S}$ y de $Y_{X/S}$ respectivamente en las condiciones ensayadas.

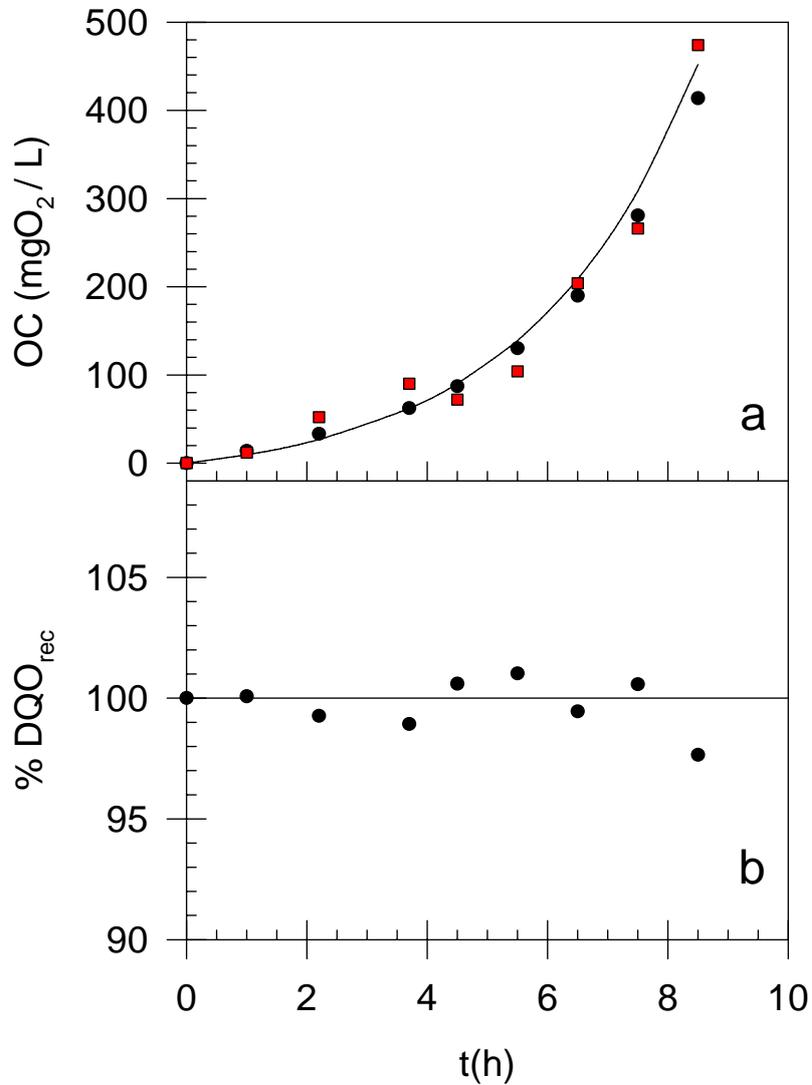


Figura 7.10: (a) Oxígeno consumido en función del tiempo: (\bullet) Ec. (7.4), (\blacktriangledown) Ec.(7.5)
 (b) Porcentaje de recuperación calculado mediante la Ec. (7.6)
 durante el desarrollo de *S. natans* en sistema batch.

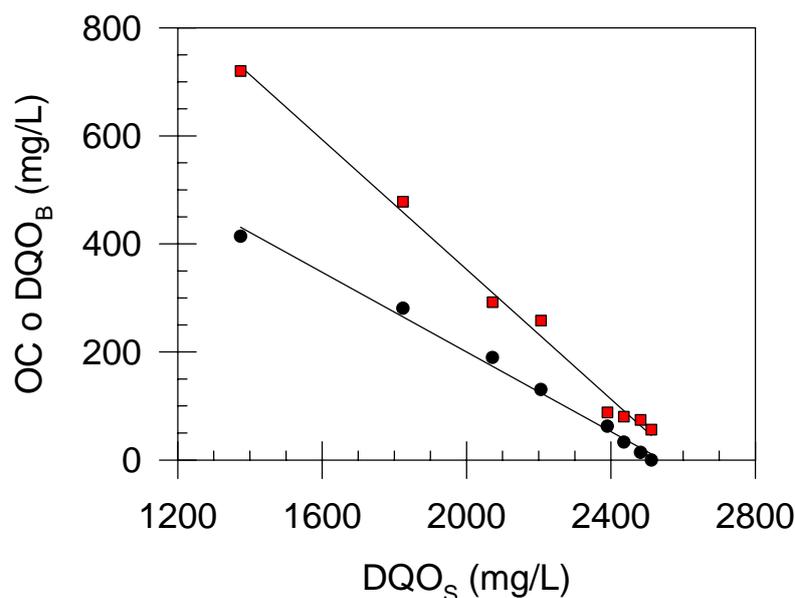


Figura 7.11. Oxígeno consumido (OC) (λ) y concentración de biomasa (DQO_B) (v) en función de la concentración de sustrato (DQO_S).

Los cálculos descriptos se repitieron para cada experimento a cada pH analizado. En la Figura 7.12 se presenta el efecto del pH en el valor de μ_{\max} determinado a partir de datos de densidad óptica (DO), DQO_B, OUR o calculado mediante la Ec. (7.10). Se puede observar que para valores de pH comprendidos entre 6.5 y 7.5, μ_{\max} estaba poco afectada. Asimismo, los valores de μ_{\max} calculados mediante la Ec. (7.10) fueron similares a los determinados en base a las otras técnicas. Para pH = 7.0, el valor promedio de μ_{\max} determinado por los diferentes métodos empleados fue $0.35 (\pm 0.05) \text{ h}^{-1}$; este valor resultó aproximadamente un 20% menor que el calculado mediante los experimentos en cultivo continuo (Tabla 7.2).

Se observó además que la curva de crecimiento graficada como OUR presentaba una fase de crecimiento exponencial prácticamente desde el inicio del experimento a diferencia de lo que sucedía cuando se utilizaba DQO_B o DO como variable de medición. Es posible que esta diferencia sea un artefacto debido a la presencia de restos celulares que interferían en las determinaciones de DO y DQO_B especialmente al inicio del experimento.

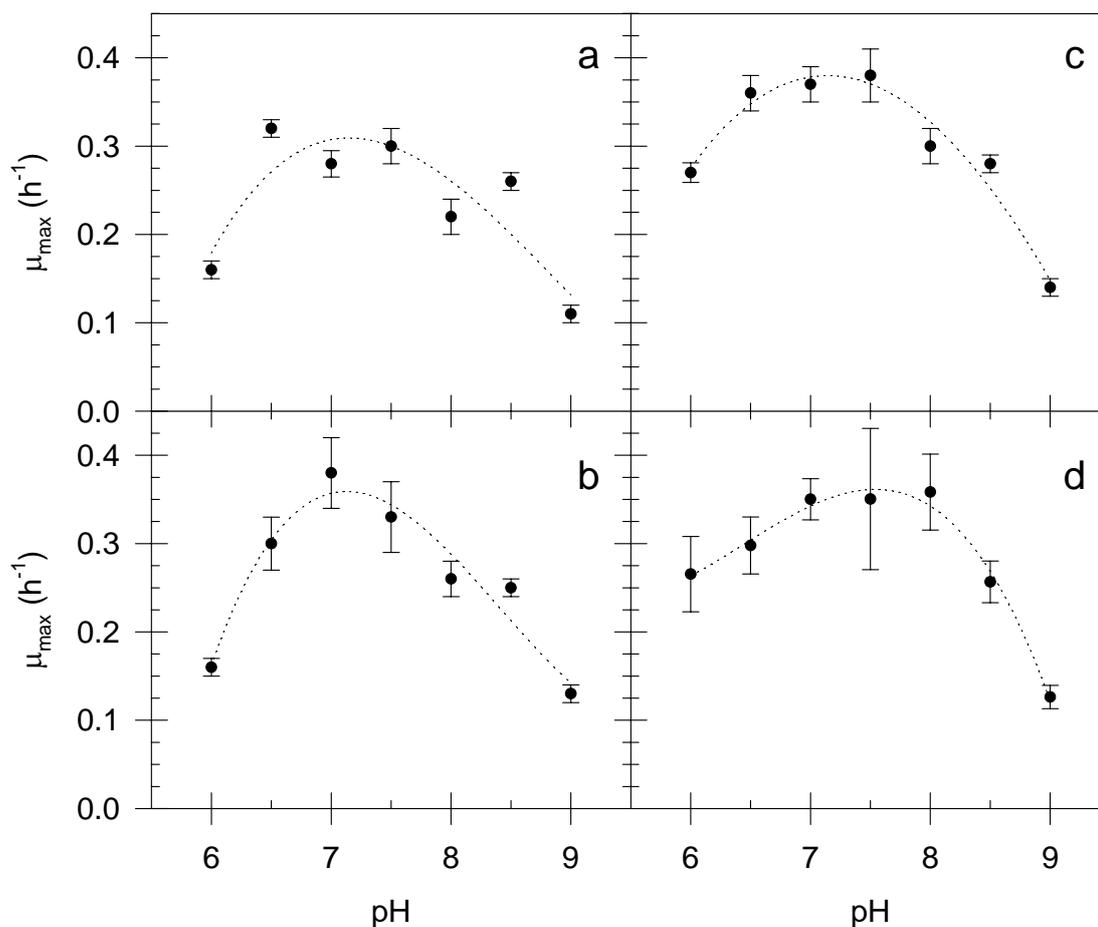


Figura 7.12. Efecto del pH en la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) correspondiente a *S. natans* calculada en base a diferentes datos experimentales: a.- Densidad óptica, b.- DQO_B, c.- OUR , d.- Calculada a partir de la Ec. (7.10).

Las barras indican el desvío estándar

En la Figura 7.13 se presenta el efecto del pH en la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (q_{O_2max}). Puede observarse que dentro de un rango de pH de 6.5 a 8.0, los valores de q_{O_2max} se mantuvieron aproximadamente constantes en $0.22 \pm 0.02 \text{ mgO}_2 \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$ aunque con tendencia a disminuir hacia valores de pH superiores. Por ejemplo, a pH = 9.0, el valor de q_{O_2max} resultó un 64% del valor correspondiente a pH = 6.0.

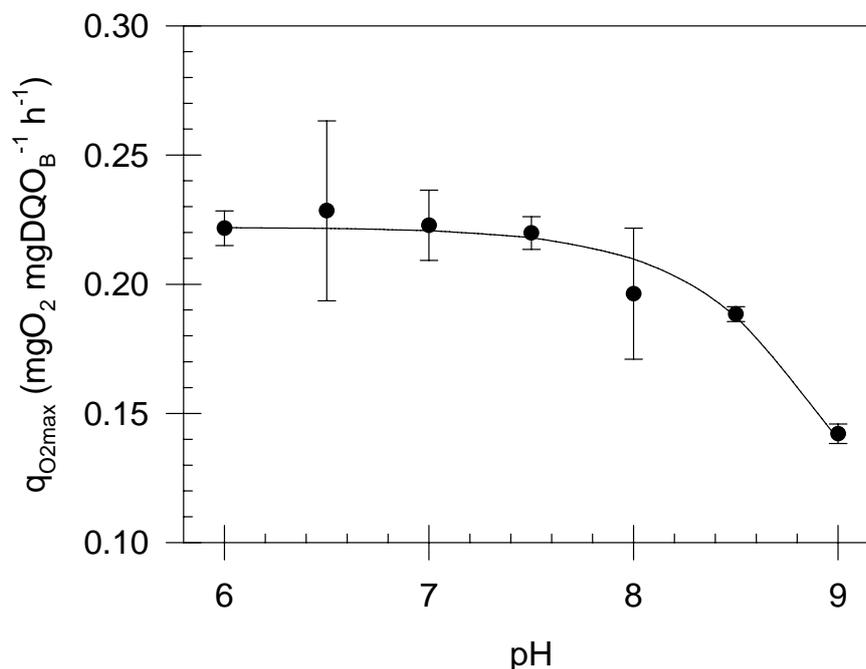


Figura 7.13. Efecto del pH en la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (q_{O_2max}) para *S. natans*. (—) Ec. (7.16). Las barras indican el desvío estándar.

El efecto del pH en el rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) y en el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$) es mostrado en la Figura 7.14. Dentro de un rango de pH entre 7.0 y 8.0, tanto $Y_{X/S}$ como $Y_{O/S}$ fueron aproximadamente constantes con valores de 0.59 ± 0.05 $mgDQO_B/mgDQO_S$ y 0.36 ± 0.05 $mgO_2/mgDQO_S$ respectivamente. El valor de $Y_{X/S}$ determinado en estos experimentos resultó similar al hallado mediante los estudios en quimiostato (0.575 ± 0.013 $mgDQO_B/mgDQO_S$, Tabla 7.2). Asimismo, la suma de rendimientos ($Y_{X/S} + Y_{O/S}$) resultó constante en función del pH dentro del rango estudiado con una media de 0.95 ± 0.10 $mgDQO_{total}/mgDQO_S$ indicando una consistencia satisfactoria de las determinaciones realizadas.

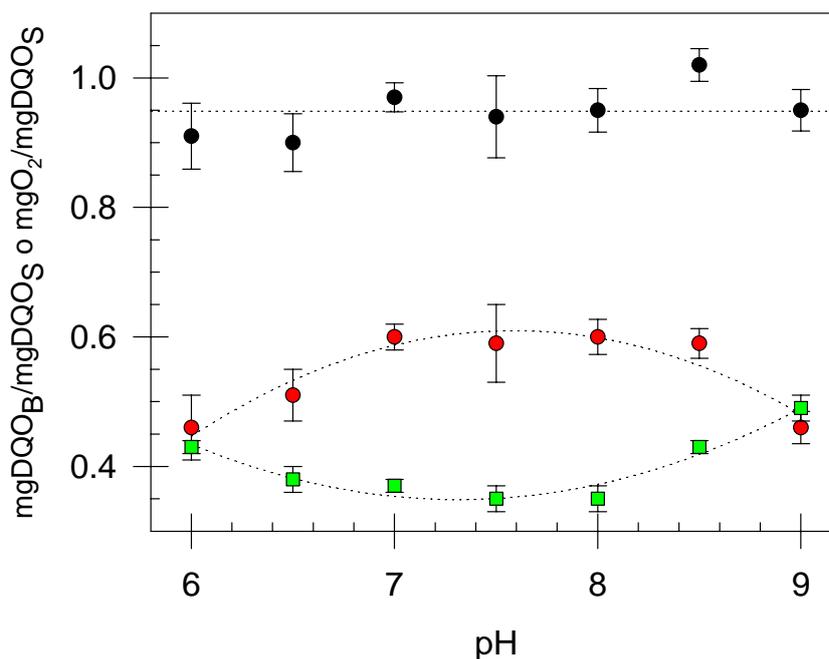


Figura 7.14. Efecto del pH en el rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$) (λ) y en el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{o/s}$) (ν). Suma de rendimientos (λ).

Para un microorganismo aerobio estricto como *S. natans*, una disminución en el rendimiento celular implica un aumento en la fracción del sustrato que fue oxidada para obtener energía. Este mayor gasto de energía podría deberse en principio a un mayor trabajo por parte de la célula para mantener su medio interno en condiciones adecuadas mediante el bombeo de los H^+ hacia el exterior. Cuanto mayor sean las diferencias entre el medio externo y el interno, mayor será este trabajo y por lo tanto se gastará más sustrato en la generación de energía y por lo tanto el rendimiento en biomasa será menor.

Debido a que la única forma que tiene el microorganismo de generar energía es mediante la respiración aeróbica, un parámetro útil para cuantificar este gasto energético es $Y_{o/x}$ ($= Y_{o/s} / Y_{x/s}$) el cual representa el oxígeno consumido por unidad de biomasa generada. Como puede observarse en la Figura 7.15, para valores de pH comprendidos entre 7 y 8 *S. natans* utiliza la menor cantidad de oxígeno por unidad de biomasa generada ($0.62 \text{ mgO}_2 \text{ mgDQO}_B^{-1}$). Como para $\text{pH} = 6$, el valor de $Y_{o/s}$ es de $0.97 \text{ mgO}_2 \text{ mgDQO}_B^{-1}$, esto implica que el microorganismo debe gastar $1.6 (= 0.97/0.62)$ veces más sustrato para generar energía que a $\text{pH} = 7$.

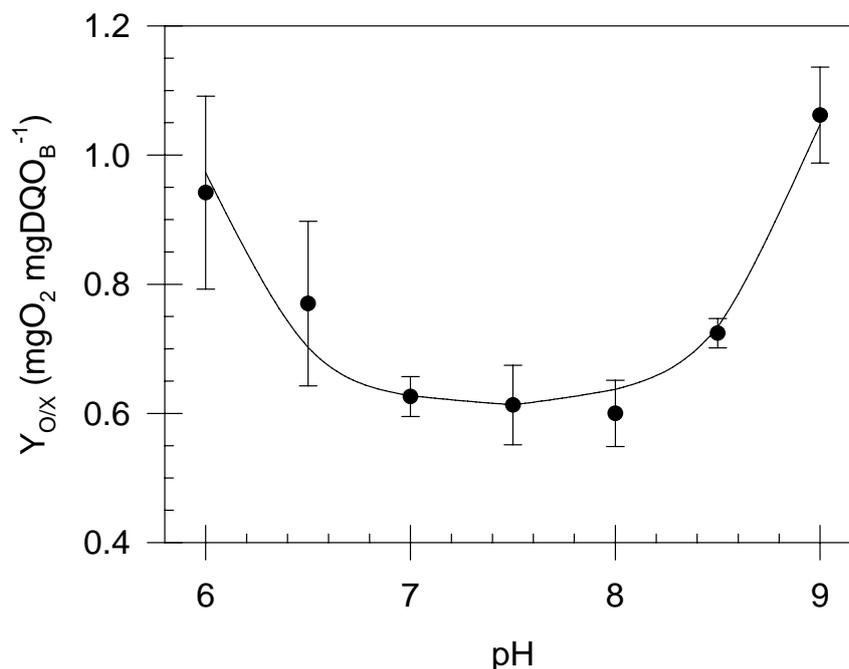


Figura 7.15. Efecto del pH sobre el parámetro $Y_{O/X}$. (λ) Datos experimentales.
 (—) Modelo aplicado: Ec.(7.13)/Ec.(7.17). Las barras indican el desvío estándar.

A partir de los valores de $Y_{X/S}$ y μ_{\max} obtenidos mediante las diferentes técnicas aplicadas, se calculó la velocidad específica máxima de consumo de sustrato ($q_{S\max}$); reordenando la Ec. (6.13) (Capítulo 6) y combinando con la Ec. (7.10) se obtuvo la siguiente expresión:

$$q_{S\max} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} = \frac{q_{O2\max}}{Y_{O/S}} \quad (7.12)$$

Como puede observarse, la igualdad representada en la Ec. (7.12) indica que $q_{S\max}$ puede calcularse de dos maneras: a partir de la determinación de S y X en función del tiempo o mediante medidas respirométricas. Debido a que en principio ambas formas de cálculo deberían ser similares, en la Figura 7.16 se graficó el promedio entre éstas. El valor calculado de $q_{S\max}$ resultó máximo (0.58 mgDQO_S mgDQO_B⁻¹ h⁻¹) para un pH comprendido entre 7 y 7.5. Por otra parte, este valor fue un

27% menor que el obtenido en cultivo continuo ($0.797 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$, Tabla 7.2).

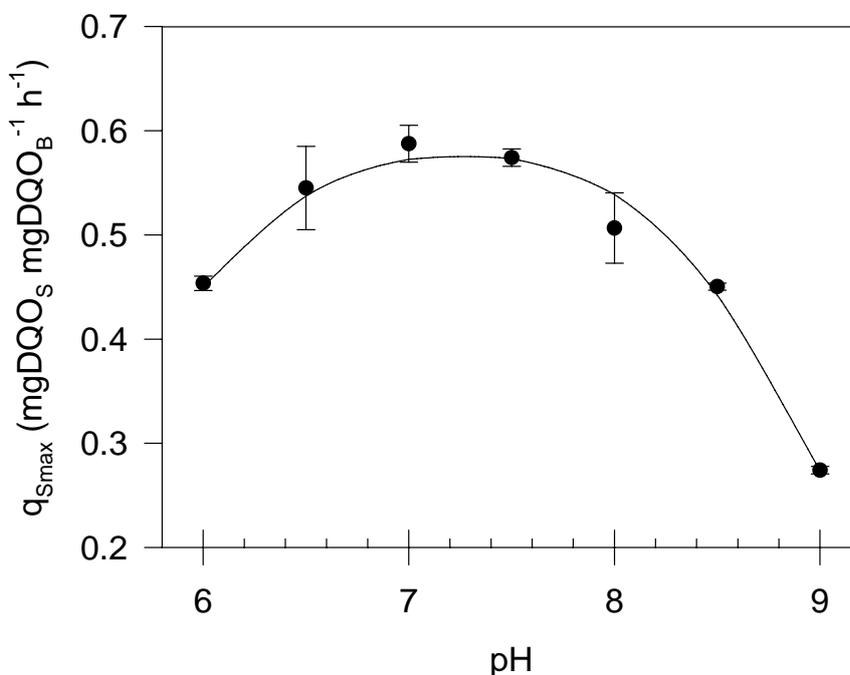


Figura 7.16. Efecto del pH sobre la velocidad específica máxima de consumo de sustrato (q_{Smax}). (—) Ec. (7.16). Las barras indican el desvío estándar.

7.3.3.1. Modelado del efecto del pH en el desarrollo de *S. natans*

En la presente sección se estudió el efecto del pH sobre diferentes variables que caracterizan el desarrollo de *S. natans* en el medio estudiado: μ_{max} , q_{O2max} , $Y_{X/S}$, $Y_{O/S}$ y q_{Smax} . Debido a las diferentes relaciones matemáticas que existen entre las variables (ver por ej. Ecs. 7.10 y 7.12), solamente se necesita conocer el efecto del pH sobre dos de ellas mientras que las demás pueden ser obtenidas por cálculo. Por ejemplo, si para un determinado valor de pH se conocen $Y_{X/S}$ y q_{O2max} , el resto de las variables puede calcularse de la siguiente forma:

$$Y_{O/S} = 1 - Y_{X/S} \quad (7.13)$$

$$q_{Smax} = \frac{q_{O2max}}{1 - Y_{X/S}} \quad (7.14)$$

$$\mu_{max} = q_{O2max} \frac{Y_{X/S}}{1 - Y_{X/S}} \quad (7.15)$$

Aunque el pH es la variable más comúnmente empleada para referirse a la acidez de un determinado medio de cultivo, desde el punto de vista fisiológico los microorganismos responden a la concentración del ion hidronio (H_3O^+), el cual es un parámetro con mayor sentido físico. En la Figura 7.17 se graficaron los valores de $Y_{X/S}$ y q_{O2max} en función de la concentración de H_3O^+ . Como puede observarse, a medida que aumenta H_3O^+ , el valor de q_{O2max} se incrementa hasta mantenerse aproximadamente constante (Fig. 7.17.a). Por otro lado, el rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) aumenta rápidamente pero luego comienza a decrecer a medida que el medio se hace más ácido (Fig. 7.17.b).

A partir del comportamiento presentado en la Figura 7.17, se propusieron las siguientes ecuaciones con el objeto de modelar el efecto de la concentración de H_3O^+ (H) sobre $Y_{X/S}$ y q_{O2max} :

$$q_{O2max} = A_q \frac{H}{B_q + H} \quad (7.16)$$

$$Y_{X/S} = A_Y \frac{H}{B_Y + H} \exp(-C_Y H) \quad (7.17)$$

donde H es la concentración del ion hidronio y A_q , B_q , A_Y , B_Y , C_Y son los coeficientes del modelo aplicado.

Los coeficientes fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal de las ecuaciones a los datos experimentales; en la Tabla 7.3 se presentan los resultados obtenidos. Como puede observarse en la Figuras 7.13, 7.15, 7.16 y 7.17, las ecuaciones empleadas se ajustaron satisfactoriamente a los datos experimentales.

Finalmente, en la Figura 7.18 se graficaron los valores de μ_{max} calculados a partir de la Ec. (7.15) así como el promedio de los valores experimentales de μ_{max}

determinados mediante las diferentes técnicas. Como puede observarse, se obtuvieron muy buenas estimaciones de los valores experimentales de μ_{\max} y por lo tanto, mediante el procedimiento descrito se logró modelar matemáticamente el efecto del pH en los diferentes parámetros que caracterizan el desarrollo de *S. natans* en un medio con ácido cítrico como sustrato limitante.

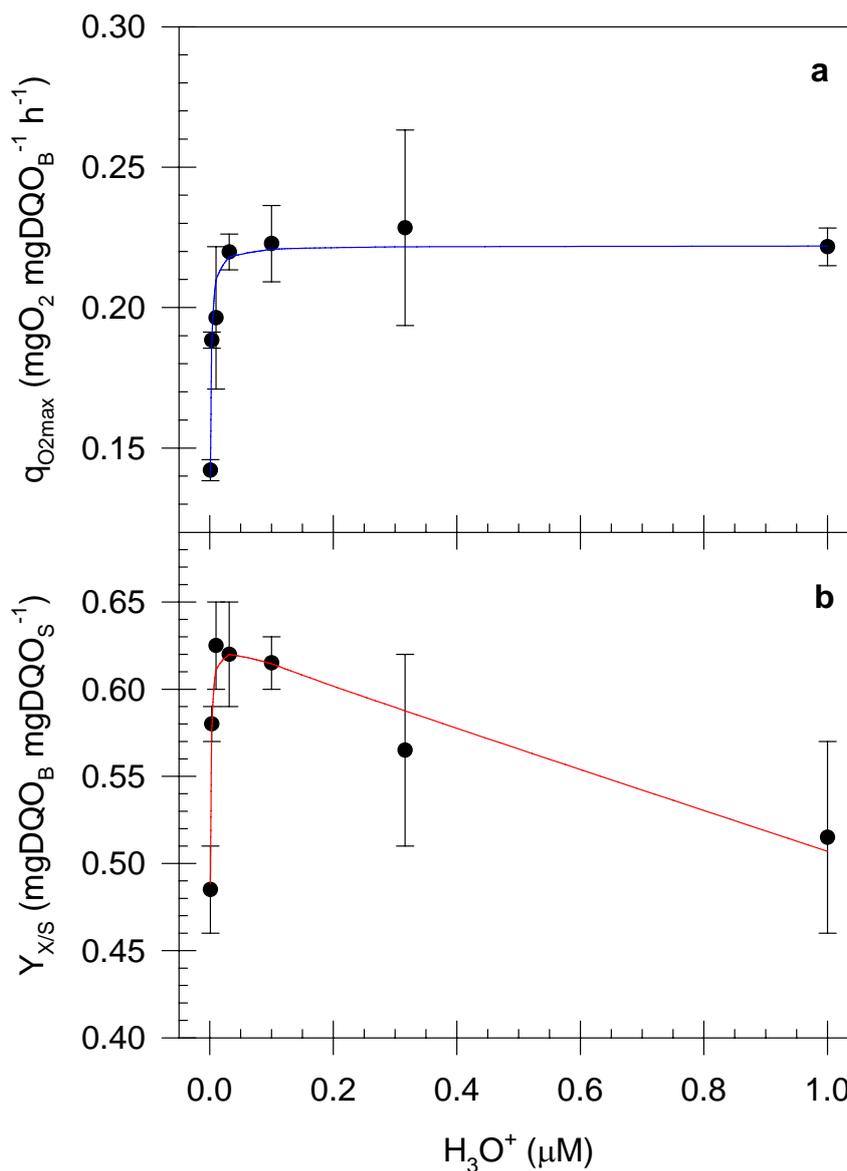


Figura 7.17. Efecto de la concentración del ion hidronio (H_3O^+) sobre:

(a) $q_{O_2\max}$ y (b) $Y_{x/s}$. (—) Ec. (7.16), (—) Ec. (7.17)

Tabla 7.3. Coeficientes correspondientes a las Ecs. (7.16) y (7.17)

	Valor	Desvío Estándar	Ecuación
A_q ($\text{mgO}_2 \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0.222	0.003	(7.16)
B_q (μM)	5.9×10^{-4}	8×10^{-5}	
A_Y ($\text{mgDQO}_B \text{ mgDQO}_S^{-1}$)	0.630	0.009	(7.17)
B_Y (μM)	2.9×10^{-4}	4×10^{-5}	
C_Y (μM^{-1})	0.22	0.03	

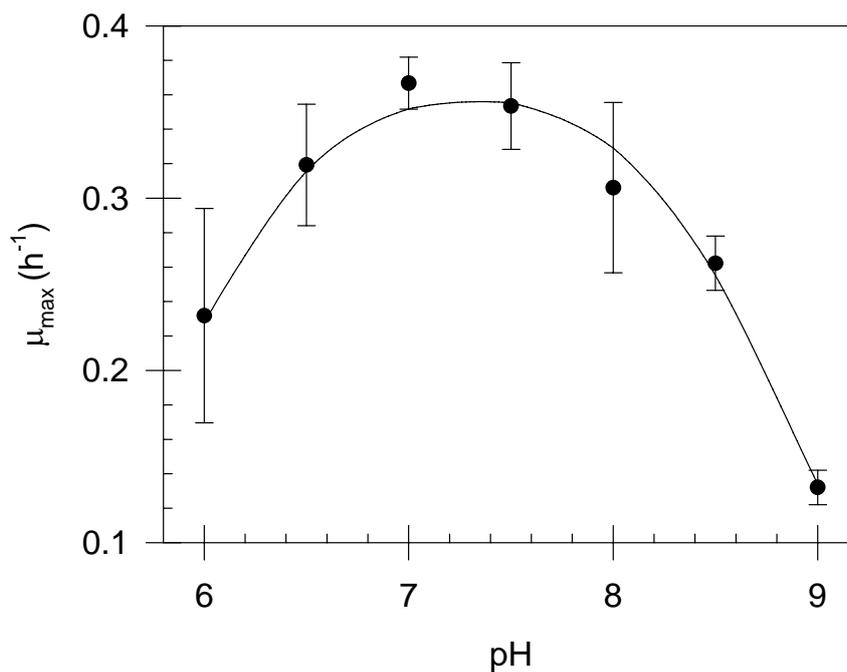


Figura 7.18. Efecto del pH sobre μ_{\max} . (●) Datos experimentales promediados (—) Ec. (7.15). Las barras indican el desvío estándar.

7.4. Conclusiones del Capítulo

* En base al estudio del efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de *S. natans* se determinó que para una relación C:N inferior a 23.5 – 27.3 mgDQO_S/mgN el crecimiento estará limitado por la fuente de C (ácido cítrico). Asimismo, se determinó el rendimiento en biomasa en condiciones limitantes de fuente de N resultando: $Y_{X/N} = 15.1 \text{ mgDQO}_B/\text{mgN}$.

* Los experimentos de cultivo continuo en quimiostato permitieron determinar los siguientes parámetros que caracterizan el desarrollo de *S. natans* en un sistema de cultivo continuo en un medio con ácido cítrico como limitante del crecimiento: $Y_{X/S}^V = 0.575 \text{ mgDQO}_B \text{ mgDQO}_S^{-1}$, $k_d = 0.010 \text{ h}^{-1}$, $q_{S_{\max}} = 0.797 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_S = 54 \text{ mgDQO}_S/\text{L}$, $\mu_{\max} = 0.458 \text{ h}^{-1}$, $m_S = 0.018 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$.

* Mediante la aplicación de técnicas respirométricas en el estudio del desarrollo de *S. natans* en sistema batch se determinó que el microorganismo utilizaba exclusivamente oxígeno molecular como aceptor de electrones. Asimismo, mediante la técnica respirométrica se determinaron valores de velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) similares a las técnicas clásicas y por lo tanto la técnica puede ser utilizada para la estimación de parámetros cinéticos y estequiométricos.

* Las diferentes técnicas aplicadas permitieron determinar el efecto del pH sobre la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno ($q_{O_{2\max}}$), la velocidad específica máxima de consumo de sustrato ($q_{S_{\max}}$), el rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) y el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$). En base a estos resultados obtenidos se desarrolló un modelo matemático que permitió calcular el valor de éstas variables en función del pH del medio de cultivo.

DESARROLLO DE *SPHAEROTILUS NATANS* Y LA CEPA E932 EN CULTIVOS MIXTOS

El estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas en un cultivo mixto es un punto muy importante para entender la evolución de los ecosistemas ya sean naturales o artificiales como por ejemplo los barros activados. El estado final al cual tiende la composición de la población bacteriana depende de varios factores entre los que se pueden citar: tipo de microorganismos presentes, composición del medio de cultivo y modo de operación del sistema de cultivo (batch, batch alimentado o cultivo continuo con o sin recirculación de biomasa) siendo el sistema de cultivo continuo el más frecuentemente empleado en estudios de laboratorio (Shindala y col., 1965; Meers y Tempest, 1968; Tsuchiya y col., 1972; Richard y col., 1985; Tanaka y col., 1985).

Una condición necesaria para el mantenimiento de dos microorganismos en un cultivo en quimiostato es que la velocidad específica máxima de crecimiento de los dos microorganismos presentes sea mayor que la velocidad de dilución. La concentración de las especies microbianas que no cumplan esta condición disminuirá con el tiempo hasta desaparecer del sistema. Además, se deben cumplir otras condiciones las cuales se presentan en la Tabla 8.1. Debido a la complejidad del posible comportamiento de los microorganismos presentes en un sistema mixto (Tabla 8.1), los modelos matemáticos son de gran valor tanto del punto de vista descriptivo como predictivo. El desarrollo de modelos cinéticos como herramientas que permitan predecir la aparición de bulking filamentoso se basa en el estudio de la cinética de crecimiento y las posibles interacciones entre los microorganismos involucrados. En este tipo de estudios, uno de los problemas principales es la falta de una técnica simple y precisa para determinar la composición de la mezcla microbiana analizada ya que la concentración de biomasa es evaluada generalmente a través de parámetros globales como SSV o DQO_B .

Las técnicas disponibles actualmente para determinar la fracción de cada microorganismo en una mezcla presentan diversos inconvenientes. Tanto el recuento en placa como el conteo directo en microscopio son técnicas muy engorrosas que consumen mucho tiempo y tienen un error asociado demasiado grande en relación a las diferencias de biomasa que se pretenden determinar.

Tabla 8.1. Casos en los cuales es posible obtener un estado estacionario de dos microorganismos en un cultivo en quimiostato (Pirt, 1975)

-
1. Teniendo el mismo sustrato limitante del crecimiento
 - a. Igualdad en las velocidades específicas netas de crecimiento
 - b. Si el microorganismo de mayor velocidad específica de crecimiento es inhibido por su propio producto
 - c. Cuando el microorganismo de mayor velocidad específica de crecimiento genera un producto que activa el crecimiento de otras especies

 2. Con diferentes sustratos limitantes del crecimiento
 - a. Si los sustratos limitantes del crecimiento provienen de la alimentación
 - b. Cuando el producto de una especie es el sustrato limitante de la otra
 - c. Cuando existe una relación predador-presa
-

Mediante el empleo contadores electrónicos basados en la técnica de Coulter es posible determinar fácilmente el número de microorganismos de un tipo determinado en una muestra compuesta, especialmente en los casos en que existe una diferencia importante de tamaños; la técnica consiste hacer pasar una suspensión de las partículas en un electrolito soporte por un orificio que comunica dos compartimentos. Cuando una partícula pasa por el orificio provoca un cambio en la resistencia del electrolito soporte cuya magnitud depende del volumen de la partícula. La principal desventaja es que en estos equipos el orificio por donde se realiza la detección de las partículas se obstruye con facilidad o cambia de diámetro requiriendo una calibración periódica. Otra gran desventaja es su costo ya que puede resultar muy elevado. De todas formas, es conveniente en todos los casos verificar la proporcionalidad entre los valores de biomasa determinados como SSV o DQO_B y los valores encontrados por otras técnicas.

En la actualidad diferentes autores han empleado la técnica de análisis de imágenes en el estudio tanto de cultivos puros (Drouin y col., 1997; Mauss y col., 1997) como en sistemas de barros activados (Cenens y col., 2001; da Motta y col., 2001; Heine y col., 2001). Estos trabajos sugieren que el análisis de imágenes sería

una técnica adecuada para determinar la fracción de cada microorganismo presente en una mezcla.

En el Capítulo 3 se describió el aislamiento y caracterización de la cepa floculante E932. Asimismo, en los Capítulos 6 y 7 se describieron los experimentos realizados con el objeto de determinar los parámetros que caracterizan el desarrollo del microorganismo floculante E932 y el filamentoso *Sphaerotilus natans* en cultivo puro en quimiostato.

El presente Capítulo está dividido en dos secciones. En la primera sección se describe el desarrollo de una técnica para determinar la composición de un cultivo mixto compuesto por *Sphaerotilus natans* y la cepa E932 mediante el análisis de imágenes. En la segunda sección se describen los estudios del desarrollo de *Sphaerotilus natans* y de la cepa E932 en cultivos mixtos aplicando dicha técnica y se realiza el modelado matemático de los resultados obtenidos.

8.1. Desarrollo de una técnica para determinar la composición microbiana de un cultivo mixto

En la presente sección se describe el desarrollo de una técnica para determinar la composición de un cultivo mixto compuesto por *Sphaerotilus natans* y la cepa E932 basada en el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía óptica.

El biorreactor utilizado, las condiciones de operación, el medio de cultivo y las características de las cepas bajo estudio fueron descritos en los Capítulos 3, 4, 6 y 7. La concentración de biomasa en los cultivos fue determinada mediante DQO tal como se ha explicado en el Capítulo 5.

8.1.1. Observaciones microscópicas

Las observaciones microscópicas fueron realizadas con un microscopio Leica modelo DMLB con cámara de video incorporada. Para la observación de los preparados se utilizó un sistema de contraste de fases y de iluminación directa con un aumento de 400X y 1000X.

La observación de los preparados por Contraste de Fases (CF) se realizó agregando 10 μ L de muestra sobre un portaobjeto, colocando un cubreobjeto y presionando suavemente para eliminar el exceso de líquido (Jenkins y col., 1993).

La coloración con Azul de Metileno (AM) se realizó mediante la técnica descrita en Meynell y Meynell (1969). Esta coloración permite diferenciar morfología celular y tipo de agrupamiento. Como colorante se utiliza Azul de Metileno 0.3 % p/v

en etanol-agua. La muestra se coloca sobre un portaobjeto y se fija por desecación a temperatura ambiente. Se agrega colorante, se deja actuar durante 3 - 4 minutos y se lava con agua. Los preparados se examinan por inmersión a 1000X con iluminación directa y las bacterias se ven azules sobre un fondo claro.

La coloración de Gram modificada (Jenkins y col., 1993) se realizó mediante la técnica descrita en el Capítulo 8.

8.1.2. Adquisición y análisis de la imágenes

Las imágenes de video correspondientes a cultivos puros y mixtos fueron adquiridas mediante el programa Leica DC 100 Versión 2.51 en formato TIF (768 x 582 pixels) Tipo Color Verdadero (24 bits) con una resolución de 39 pixels/cm. Las imágenes fueron posteriormente transformadas a Tipo Escala de Grises (8 bits) de 256 niveles mediante el programa Microsoft Photo Editor 3.0 para poder ser analizadas con el programa Global Lab *Image* Versión 2.10. Para cada muestra se realizaron tres preparados y se analizaron entre 3 y 5 campos conteniendo entre 50 y 1000 bacterias por campo; los resultados se expresaron como el promedio de todos los campos analizados.

8.1.3. Fundamento teórico de la técnica propuesta

El método propuesto para determinar la composición de un cultivo mixto es una modificación de la técnica clásica de recuento en cámara. La técnica clásica de recuento en cámara consiste en determinar al microscopio el número de partículas (n) contenidas en un volumen conocido (v); la concentración en número de partículas (C_n ; partículas/L) es igual al cociente n/v . El volumen v se calcula como el producto entre la profundidad de la cámara de recuento (h_c) y el área examinada (A); como h_c es constante, C_n resulta proporcional al cociente n/A :

$$\frac{n}{A} = \frac{v C_n}{A} = h_c C_n \quad (8.1)$$

En la técnica propuesta en el presente trabajo se considera que si en un determinado campo de área A contiene un número n de partículas (por ejemplo, bacterias de una especie determinada), la fracción del área total examinada que es ocupada por las partículas (F_b) resulta:

$$F_b = \frac{na_b}{A} \quad (8.2)$$

donde a_b = área de la partícula media ($\mu\text{m}^2/\text{partícula}$).

Combinando las Ecs. (8.1) y (8.2) se obtiene la siguiente expresión:

$$F_b = a_b h_c C_n \quad (8.3)$$

A su vez, la concentración de partículas (bacterias) puede determinarse a través la DQO correspondiente a la biomasa ($X = \text{mgDQO}_B/\text{L}$) tal como se discutió en el Capítulo 5. Si ω es la DQO aportada por cada partícula ($\text{mgDQO}_B/\text{bacteria}$), la Ec. (8.3) resulta:

$$F_b = \frac{a_b h_c}{\omega} X = c X \quad (8.4)$$

El coeficiente "c" de la Ec. (8.4) es característica de las partículas analizadas y debe medirse experimentalmente a partir de la determinación de F_b para diferentes valores de concentración de biomasa (X).

En el caso particular de un cultivo mixto compuesto por *S. natans* y la cepa E932 (microorganismos 1 y 2 respectivamente), se pueden definir las siguientes fracciones:

$$f_{X1} = \frac{X_1}{X_1 + X_2} = \frac{X_1}{X_T} \quad (8.5)$$

$$f_{a1} = \frac{F_{b1}}{F_{b1} + F_{b2}} \quad (8.6)$$

donde f_{X1} = fracción de la especie 1 calculada en base a medidas de concentración de biomasa, X_T = concentración total de biomasa (mgDQO_B/L), f_{a1} = fracción de la especie 1 calculada en base a la determinación de áreas.

Combinando las ecuaciones (8.5) y (8.6) se obtiene la siguiente expresión:

$$f_{x1} = \frac{f_{a1}}{Q - f_{a1}(Q - 1)} \quad (8.7)$$

donde $Q = c_1/c_2$, siendo c_1 y c_2 los coeficientes c de la Ec. (8.4) correspondientes a los microorganismos 1 y 2 respectivamente. La Ec. (8.7) es muy importante ya que vincula las fracciones de *S. natans* calculadas por los diferentes métodos empleados.

8.1.4. Resultados y Discusión

8.1.4.1. Determinación de la fracción de área total ocupada por las bacterias (F_b) en cultivo puro mediante el programa Global Lab Image Versión 2.10

La determinación de la fracción de área que es ocupada por las partículas (F_b) se realizó a partir del análisis de las imágenes correspondientes a micrografías de cultivos mediante el programa Global Lab Image Versión 2.10. El programa puede expresar las longitudes en pixels o en micrómetros (μm) si se realiza una calibración. Sin embargo, debido a que el parámetro F_b es un cociente de áreas (área de las bacterias/área total examinada) no es necesario realizar la calibración y los valores pueden ser expresados en pixels.

Para iniciar el análisis de una imagen determinada como la que se muestra en el fondo de la Figura 8.1, se le debe indicar al programa la zona que se desea examinar o región de interés (ROI); esto se realiza mediante la herramienta "Particle". Con el objeto de calcular el área total de la ROI (A), se debe determinar su ancho y alto mediante la herramienta "Measure"; en el ejemplo presentado en la Figura 8.1, $A = 44280 \text{ pixels}^2$.

Mediante la opción "Find particles" de la herramienta "Particle" el programa cuenta el número de partículas que reconoce dentro de la ROI (en este caso, $n = 309$) y calcula el área promedio de las partículas ($a_b = 18.77 \text{ pixels}^2/\text{partícula}$) (Figura 8.2); el valor de F_b se determina aplicando la Ec. (8.2); en el ejemplo presentado, $F_b = 0.131$.

El programa reconoce a una partícula (diferente del fondo de la imagen) cuando una determinada agrupación de pixels cumple dos condiciones. Por un lado, el área correspondiente a una cierta agrupación de pixels debe ser mayor que un tamaño mínimo (T_m); esto permite descartar los artefactos experimentales pequeños tales como suciedad, manchas, etc.. Cuanto mayor sea el valor de T_m empleado, menor

será la cantidad de artefactos que son reconocidos como partículas. Sin embargo, si se utiliza para el análisis de las imágenes un valor de Tm demasiado elevado, tampoco serán reconocidas las bacterias cuyo tamaño sea menor a Tm. Debido a que el área promedio correspondiente a una bacteria de la cepa E932 (la más pequeña de las estudiadas en el presente trabajo) era de aproximadamente 15 - 20 pixels² (Fig. 8.2), el valor de Tm fue fijado en 10 pixel².

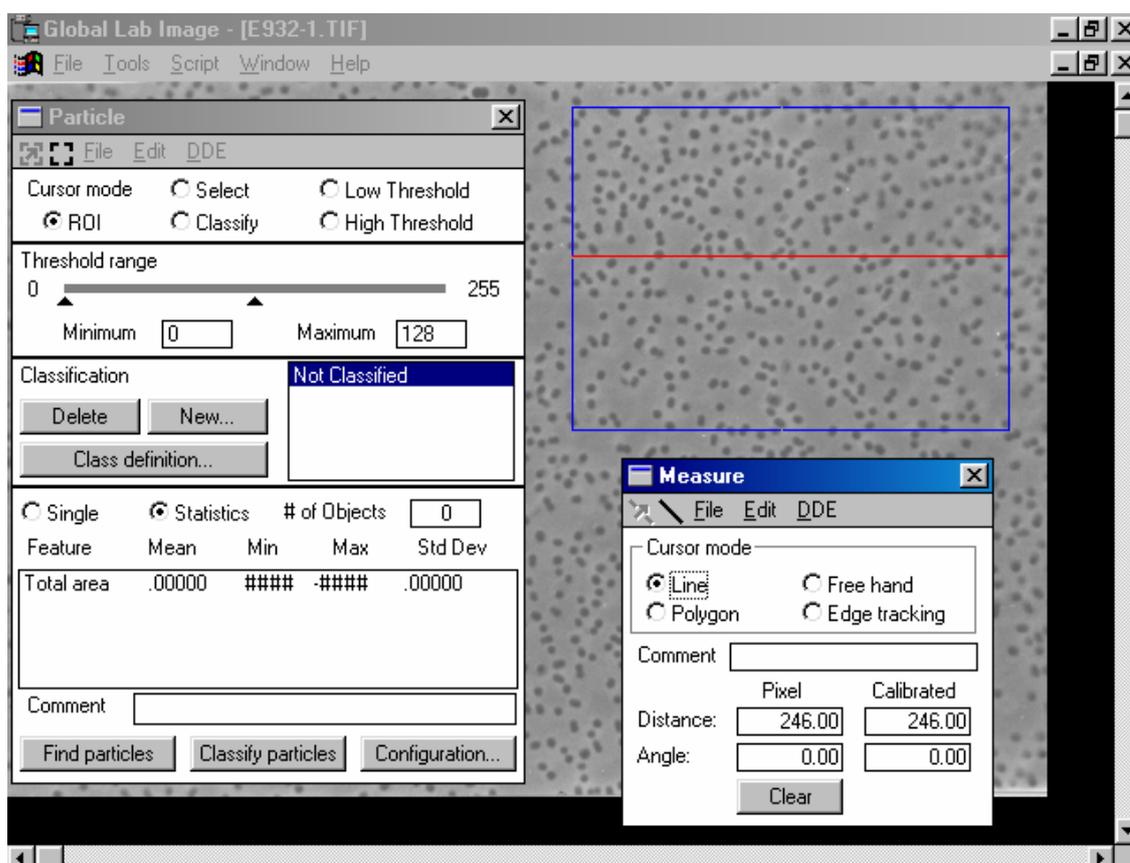


Figura 8.1. Herramientas "Particle" y "Measure".

(—) Area de interés; (—) Ancho = 246 pixels

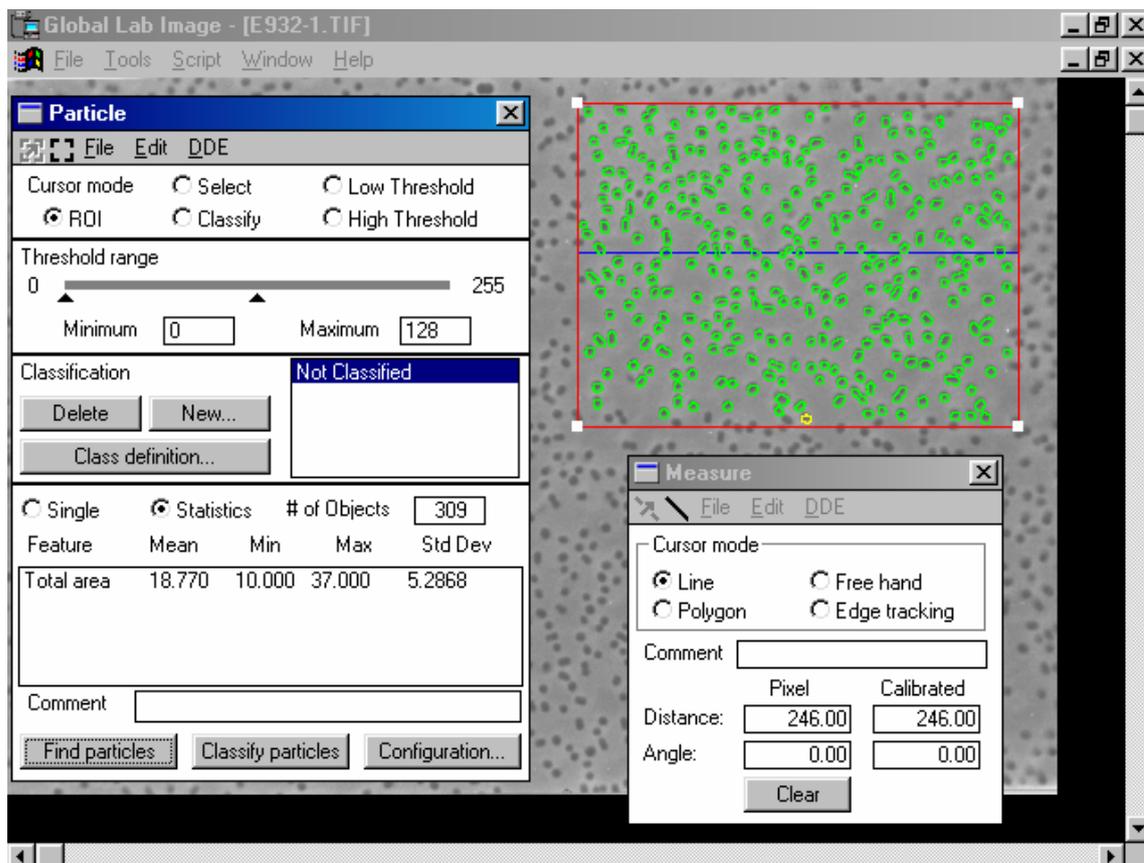


Figura 8.2. Determinación del número total de partículas ($n = 309$) y del área media de las partículas ($a_b = 18.77 \text{ pixels}^2/\text{partícula}$).

(—) Perímetro de las partículas reconocidas.

La segunda condición que debe cumplir una agrupación de pixels para que sea considerada como partícula (bacteria) por el programa es que el valor del nivel (escala) de grises de cada pixel se encuentre dentro de un rango predeterminado. Los límites de este rango se pueden ajustar mediante la opción “Threshold range” del menú “Particle”; los valores 0 y 255 corresponden a negro y blanco respectivamente. Debido a que el fondo era más claro que las partículas, el umbral mínimo del rango (U_{\min}) se fijó en 0 (negro). Sin embargo, se observó que el número de partículas (n), el área promedio (a_b) y el área total ocupada por las partículas ($n \cdot a_b$) eran función del valor asignado al umbral máximo (U_{\max}).

Como puede observarse en la Figura 8.3.a, el número de partículas (n) aumentaba hasta llegar a un máximo para posteriormente disminuir a medida que se

incrementaba el valor U_{\max} . Este efecto se debía a que para valores bajos de U_{\max} había algunas agrupaciones de pixels que el programa no reconocía como una partícula porque no alcanzaban el tamaño mínimo predeterminado (T_m) mientras que para valores altos de U_{\max} el programa consideraba a varias partículas como una sola. Por otra parte, debido que las partículas no tenían un borde nítido, el valor de a_b se incrementaba a medida que el valor U_{\max} aumentaba y este efecto era aún mayor cuando varias partículas se fusionaban en una sola (Fig. 8.3.b). Asimismo, el valor del producto $n \cdot a_b$ se incrementaba en forma aproximadamente lineal con el aumento de U_{\max} (Fig. 8.3.c).

Con el objeto de hacer comparables todos los análisis subsiguientes se adoptó como criterio de elección de U_{\max} al valor de U correspondiente al máximo número de partículas (Fig. 8.3.a). Debido a que todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo equipo prácticamente en idénticas condiciones, el rango de valores de U_{\max} empleado en el presente estudio resultó de 126 ± 4 ; en el caso particular analizado se seleccionó un valor de $U_{\max} = 128$.

8.1.4.2. Análisis de las imágenes adquiridas correspondientes a cultivos mixtos

El análisis de las imágenes correspondientes a cultivos mixtos se realizó de forma similar al explicado anteriormente para cultivos puros. Las claras diferencias de forma y tamaño permitieron la sencilla distinción de los microorganismos presentes. La selección de un determinado tipo de partículas (por ejemplo las bacterias filamentosas) se realiza mediante la opción "Classify" del menú "Particle" (Figura 8.4). La inclusión de cada partícula dentro de una clase determinada se realiza manualmente seleccionando la partícula con el botón derecho del ratón. Una vez que han sido seleccionadas todas las partículas de un mismo tipo, el programa calcula su número total (n) y el tamaño promedio correspondiente (a_b).

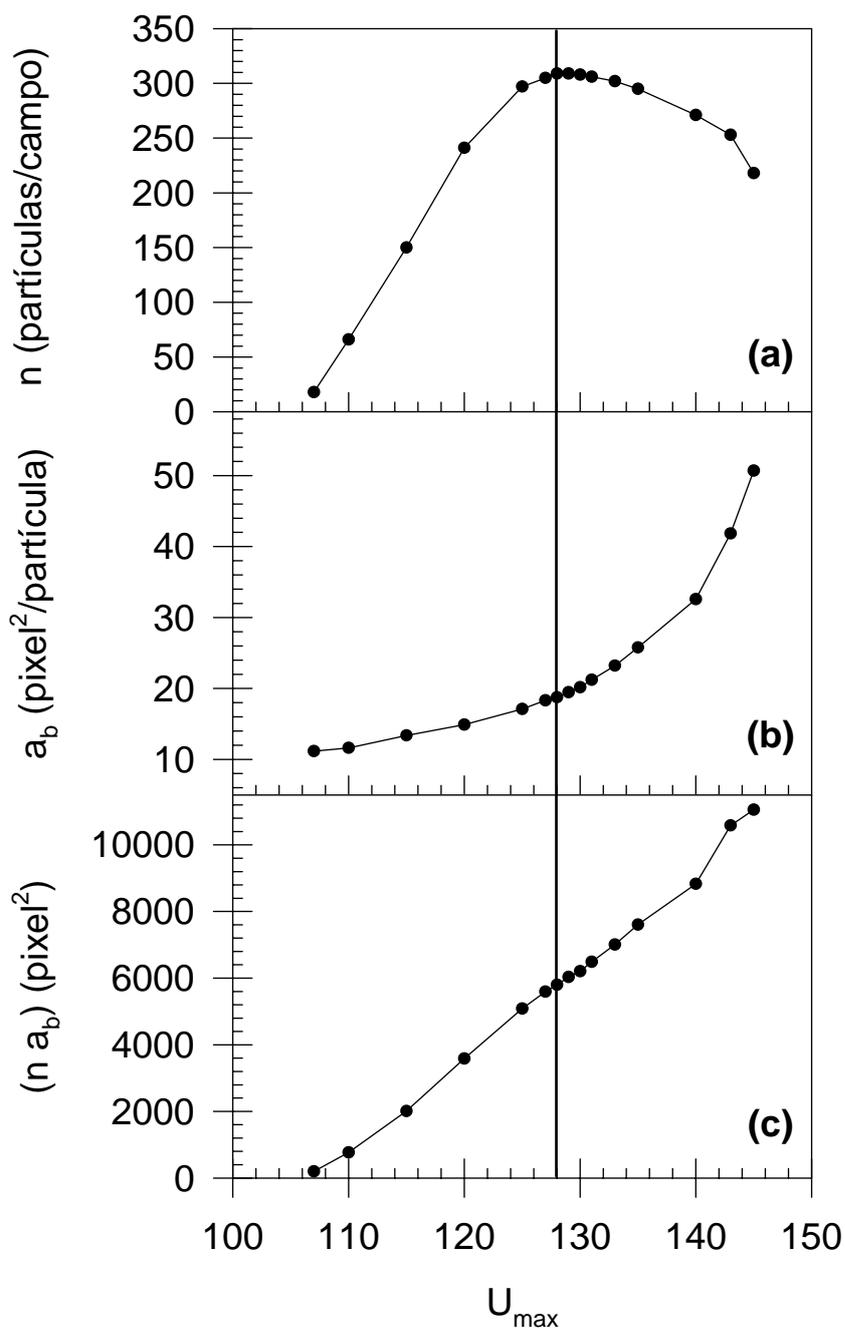


Figura 8.3. Efecto del valor del umbral máximo de la escala de grises (U_{max}) en la determinación de: (a) número de partículas por campo (n); (b) área de la partícula promedio (a_b) en el campo estudiado; (c) área total ocupada por las partículas ($n a_b$). Datos correspondientes a la imagen presentada en Figuras 8.1 y 8.2. La línea indica el valor de U_{max} correspondiente al máximo de n .

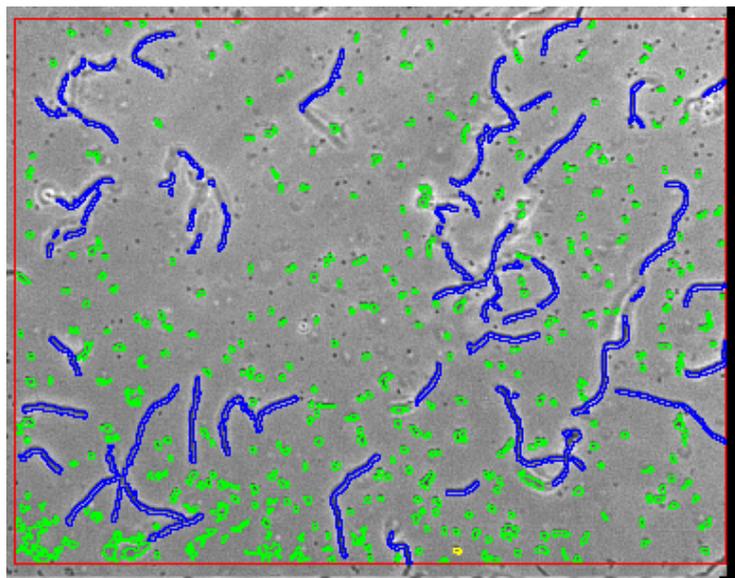


Figura 8.4. Clasificación de las partículas en base a su morfología:
(—) *S. natans*, (—) cepa E932, (—) Área de interés (contraste de fases, 1000X).

8.1.4.3. Determinación de la técnica de observación más adecuada para el análisis de las muestras

En una serie de experimentos preliminares se determinó la técnica de observación más adecuada para el análisis de las muestras; se ensayaron las coloraciones de Gram y Azul de Metileno (AM). Asimismo, se estudiaron preparados por observación microscópica de Contraste de Fases (CF) la cual no requiere ningún tipo de coloración del preparado con lo cual no se introduce ningún tipo de artefacto en la muestra. Se analizaron cultivos de *S. natans* con diferentes concentraciones de biomasa (X) y se realizaron determinaciones de los valores correspondientes de F_b .

Mediante la técnica de Gram no se obtuvieron buenos resultados debido a una alta variabilidad en la coloración obtenida, principalmente en preparados donde había agrupaciones de bacterias. Además, las técnicas de AM y CF eran más sencillas y rápidas; debido a esto, la coloración de Gram fue descartada.

Para las técnicas de Azul de Metileno (AM) y Contraste de Fases (CF) se observó una correlación satisfactoria entre la fracción de área total examinada que es ocupada por las partículas (F_b) y la concentración de biomasa (X). Sin embargo, la constante de proporcionalidad “ c ” correspondiente a la Ec. (8.4) dependía de la técnica utilizada para realizar los preparados; el valor de “ c ” obtenido para la técnica de AM

resultó aproximadamente cuatro veces mayor que el obtenido aplicando la técnica de CF (Figura 8.5).

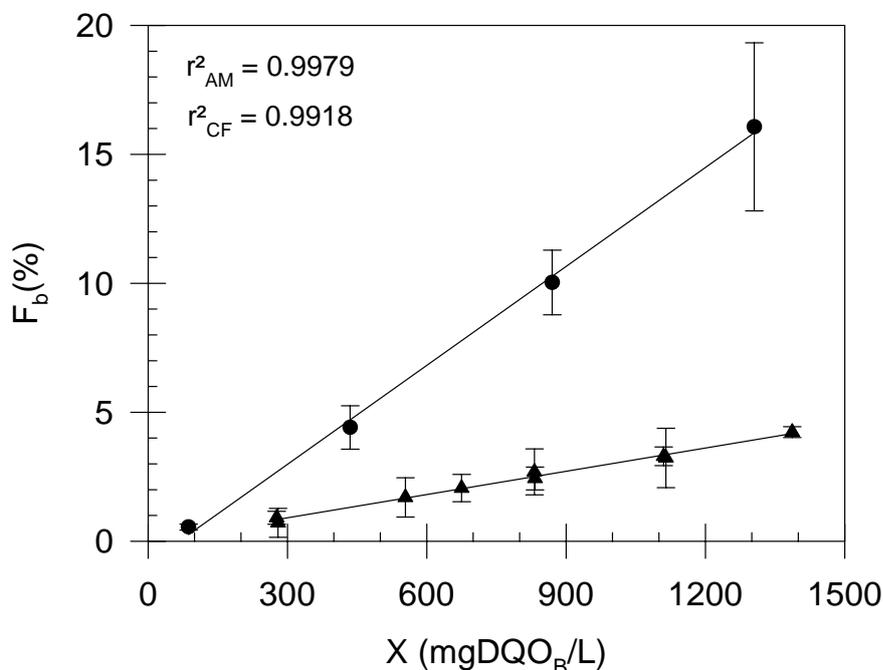


Figura 8.5. Área ocupada por *S. natans* en relación al área total examinada (F_b) en función de la concentración de biomasa (X): (λ) Azul de Metileno (AM), (σ) Contraste de Fases (CF). Las barras indican el desvío estándar.

Este efecto puede deberse posiblemente a dos factores. Por un lado, mediante las tinciones se tiende a sobrestimar el tamaño de las bacterias analizadas debido a un efecto de hinchamiento o agrandamiento de las mismas. Por otro lado, para ser coloreadas con AM, las muestras deben ser fijadas a temperatura ambiente (Jenkins y col., 1993). En este paso, la evaporación del medio de cultivo provocaba un efecto de concentración de los filamentos en diferentes zonas del preparado que generaba una distribución irregular de las células. Posteriormente se encontró un problema adicional durante la aplicación de la técnica de AM, también relacionado con el efecto de concentración por evaporación; cuando se analizaron los preparados correspondientes a cultivos mixtos se observó que muchas células de la cepa E932 estaban unidas a *S. natans* preferentemente hacia uno de los lados del filamento (Figura 8.6). Sin embargo, este efecto no se observó mediante CF por lo que se concluyó que debía ser

un artefacto experimental relacionado a la técnica de AM. Durante la etapa de evaporación del medio de cultivo, los filamentos se mueven aproximadamente hacia el centro del preparado y en ese movimiento ejercen un efecto de barrido, atrapando y arrastrando a las células de la cepa E932. Debido a los problemas expuestos, se descartó la técnica de Azul de Metileno y todos los ensayos posteriores se realizaron mediante la aplicación de la técnica de Contraste de Fases (CF). El análisis de imágenes obtenidas a partir de preparados observados por Contraste de Fases fue empleada también por Cenens y col. (2001) y da Motta y col. (2001).



Figura 8.6. Cultivo de *S. natans* y la cepa E932. (400X) Tinción: Azul de Metileno

8.1.4.4. Determinación del número mínimo de imágenes a analizar

La determinación del número mínimo de imágenes a analizar se realizó mediante el procedimiento descrito en Drouin y col. (1997). A partir de una muestra correspondiente a un cultivo puro de *S. natans* se realizaron 5 preparados para ser analizados por contraste de fases y se tomaron 10 imágenes por preparado. En cada imagen se analizó un área (A) de 304803 pixel² y se determinó el número de filamentos (n) y el área media de las partículas (a_B); a partir de estos datos se calculó el área total ocupada por los filamentos como producto $n \cdot a_B$.

Como puede observarse en la Figura 8.7, en los 5 preparados analizados se determinaron valores similares del producto $n \cdot a_B$ obteniéndose una media general de 12275 pixel² con un rango (diferencia entre el máximo y el mínimo) de 2419 pixel².

Debido a que no había diferencias significativas entre los diferentes preparados, se tomaron las imágenes aleatoriamente y se fue promediando su resultado. Como puede observarse en la Figura 8.8.a, el promedio del producto $n.a_B$ se estabilizó rápidamente cuando se analizaron más de 10 imágenes. Adicionalmente, no se obtuvo una mejora significativa en el intervalo de confianza con un nivel del 95% (IC-95%) para más de 10 imágenes analizadas (Fig. 8.8.b). En base a estos resultados se adoptó como criterio de trabajo analizar un mínimo de 10 imágenes por muestra.

A partir del total de las 50 imágenes, se contruyeron 109 conjuntos de 10 imágenes cada uno tomadas aleatoriamente y se calculó la media para cada conjunto (Drouin y col., 1997). Como puede observarse en la Figura 8.9, el 90% de los conjuntos tenía una media que estaba comprendida entre $\pm 15\%$ de la media global. Esto indica que si se analizan 10 imágenes de una misma muestra, el promedio del producto $n.a_B$ tiene un error menor al 15% con una probabilidad del 90%.

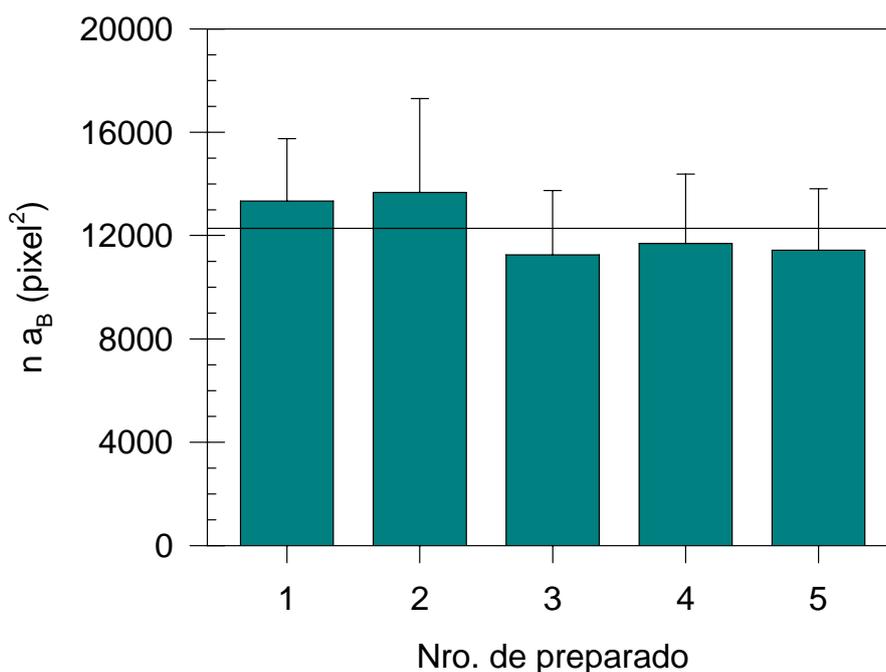


Figura 8.7. Area ocupada por las bacterias ($n.a_B$) determinada en diferentes preparados. Se analizaron 10 imágenes por preparado.

(T) Intervalo de confianza con un nivel del 95%. (—) Promedio general.

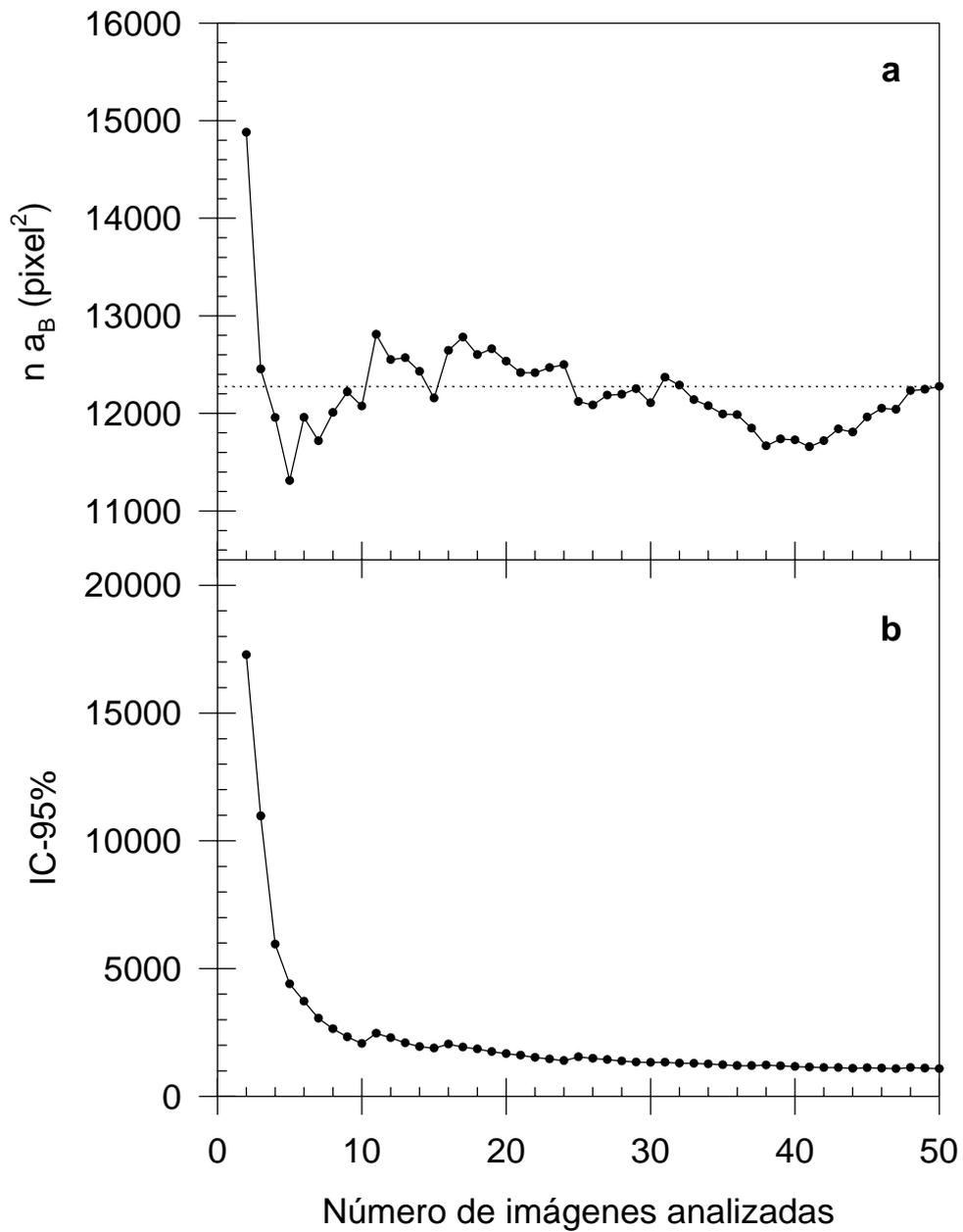


Figura 8.8. Determinación del número mínimo de imágenes a analizar: (a) Area ocupada por las bacterias ($n a_B$), (b) Intervalo de confianza con un nivel del 95%, en función de la cantidad de imágenes analizadas. (- - -) Valor medio de $n a_B$ correspondiente al análisis de 50 imágenes.

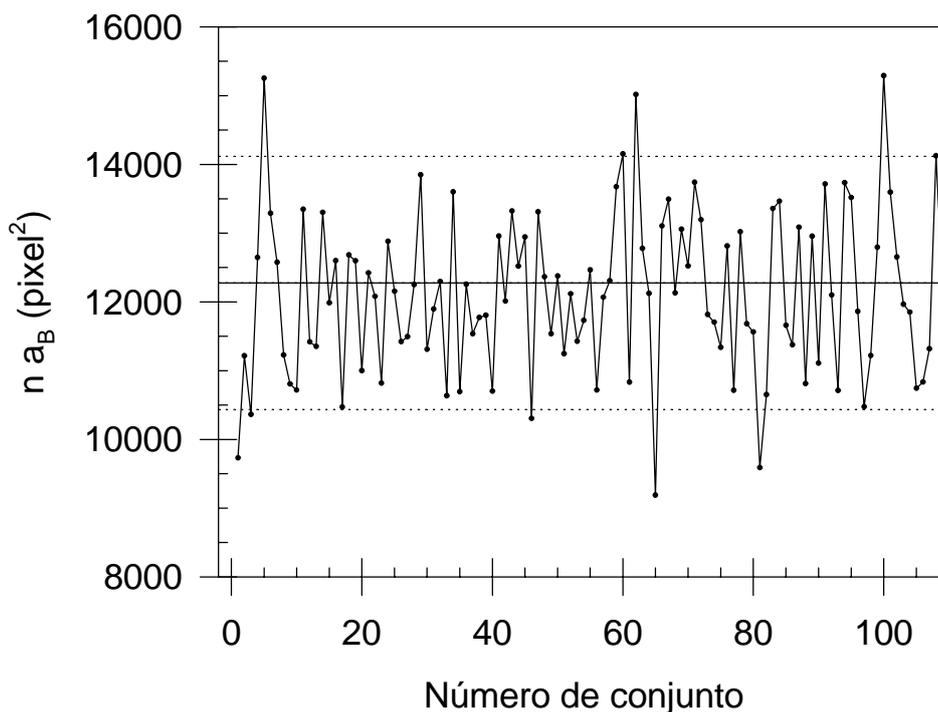


Figura 8.9. Validación estadística por selección aleatoria de conjuntos de 10 imágenes de un total de 50. (—) Valor medio de $n a_B$ correspondiente al análisis de las 50 imágenes. (- - -) Límites de $\pm 15\%$ del valor medio.

Con el objeto de determinar la constante de proporcionalidad “c” para cada microorganismo, se determinaron los valores de F_b mediante la técnica de CF en función de la concentración de biomasa (X) (Ec. 8.4). Como puede observarse en la Figura 8.10, se encontró una correlación satisfactoria entre las variables estudiadas; las pendientes de las rectas obtenidas fueron: $c_1 = 3.01 \times 10^{-3} \text{ L/mgDQO}_B$ ($\sigma_{c1} = 4 \times 10^{-5} \text{ L/mgDQO}_B$) para *S. natans* y $c_2 = 3.63 \times 10^{-3} \text{ L/mgDQO}_B$ ($\sigma_{c2} = 8 \times 10^{-5} \text{ L/mgDQO}_B$) para la cepa E932.

El cociente de pendientes ($Q = c_1/c_2$) representa la fracción del área que ocuparía *S. natans* en relación a la correspondiente a la cepa E932 para la misma concentración de biomasa. A partir de los resultados encontrados se calculó un valor de $Q = 0.83$ ($\sigma_Q = 0.02$). Un valor de $Q < 1$ significa que para una misma concentración de biomasa (expresada como L/mgDQO_B), los filamentos de *S. natans* ocupan una superficie menor que la ocupada por las células de la cepa E932.

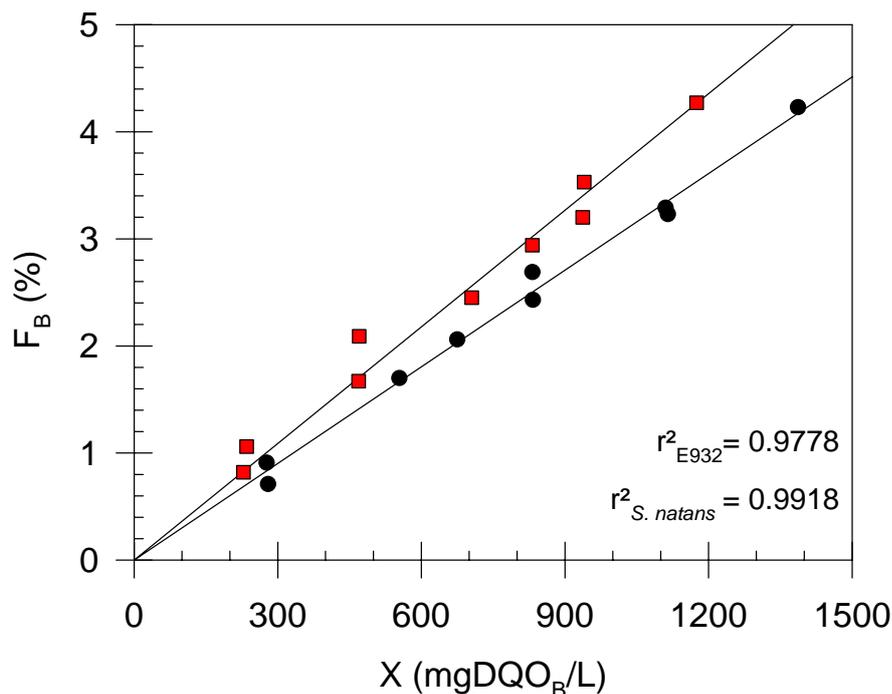


Figura 8.10. Área ocupada por los microorganismos en relación al área total examinada (F_b) en función de la concentración de biomasa (X) para cultivos puros:

(●) *S. natans*, (■) cepa E932

8.1.4.5. Análisis de cultivos mixtos de composición conocida

Una vez hallado el coeficiente que vinculaba los valores de F_b con X para cada microorganismo en cultivo puro, se aplicó el método desarrollado al estudio de cultivos mixtos compuestos por proporciones conocidas de ambos microorganismos. Con el objeto de comprobar si el método desarrollado era aplicable a estos cultivos mixtos, se prepararon diferentes mezclas de microorganismos cuya composición era conocida (f_{X1} conocido) a partir de cultivos puros de *S. natans* y de la cepa E932 (Figura 8.11); para cada una de estas mezclas se determinó el valor de f_{a1} por el método propuesto.

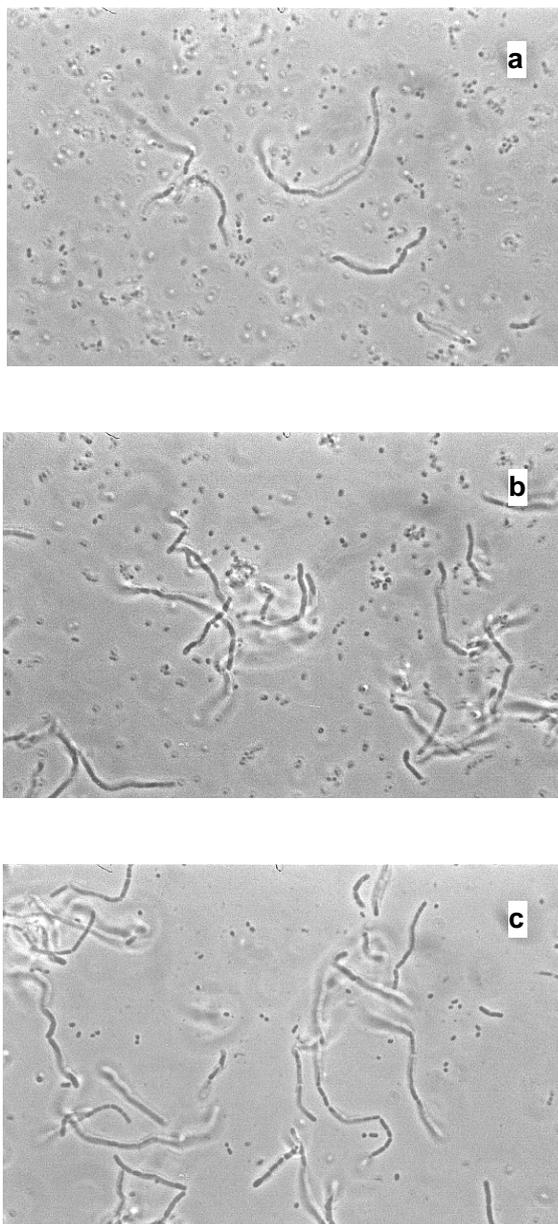


Figura 8.11. Micrografías correspondientes a mezclas de cultivos puros de *S. natans* y la cepa E932 (1000X): (a) $X_{S.natans} = 280 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$, $X_{E932} = 940 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$; (b) $X_{S.natans} = 830 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$, $X_{E932} = 470 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$; (c) $X_{S.natans} = 1120 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$, $X_{E932} = 230 \text{ mgDQO}_B/\text{L}$

Como puede observarse en la Figura 8.12, la Ec. (8.7) se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales de f_{a1} (basada en la relación de áreas) en función de f_{x1} (basada en la relación de biomasa como DQO_B) obteniéndose en este caso un valor de $Q = 0.78$ ($\sigma_Q = 0.07$) ($r^2 = 0.9623$); este valor resultó similar al calculado previamente ($Q = c_1/c_2 = 0.83$, $\sigma_Q = 0.02$) en base al análisis de las imágenes obtenidas para cultivos puros (Fig. 8.10).

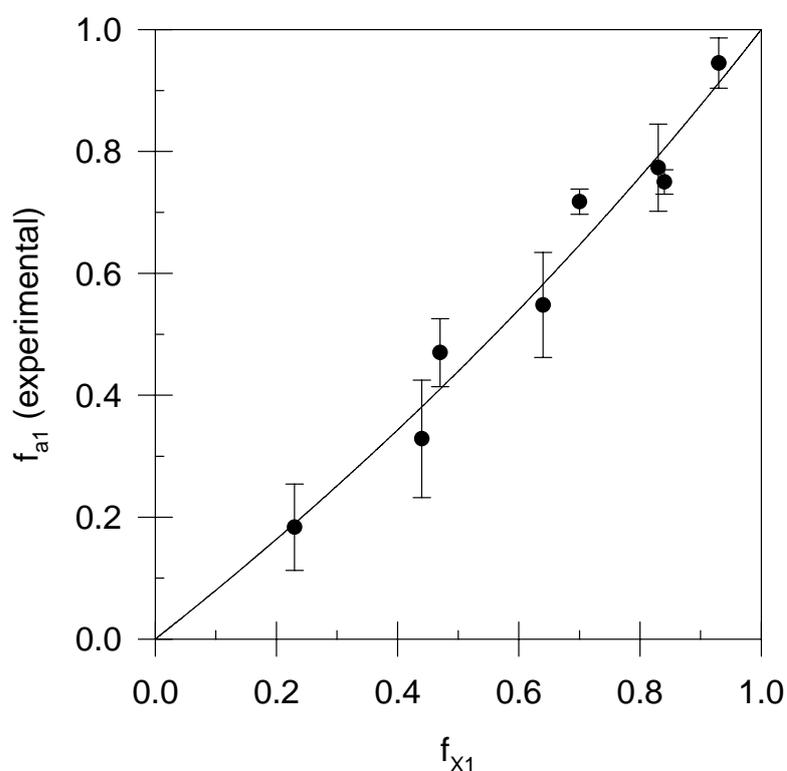


Figura 8.12. Fracción de *S. natans* calculada en base a medidas de área (f_{a1}) en función de la fracción estimada en base a la concentración de biomasa (f_{x1}) en mezclas de *S. natans* y la cepa E932. (•) Datos experimentales, (—) Ec. (8.7).

Las barras indican el desvío estándar.

La constante de proporcionalidad “c” de la Ec. (8.4) que vincula la fracción del área total que es ocupada por los microorganismos (F_b) y la concentración de biomasa (X) está asociada al tamaño de los mismos. Por definición:

$$c = \frac{a_b h_c}{\omega} \quad (8.8)$$

donde: a_b = área de la partícula media, h_c = profundidad del campo examinado y ω = DQO que aporta cada microorganismo (mgDQO_B/partícula).

Por otra parte, van Hamersveld y col. (1997) propusieron la siguiente relación:

$$DO \propto a_b C_n \quad (8.9)$$

donde DO = densidad óptica de una suspensión bacteriana de concentración C_n (bacterias/L). Combinando las ecuaciones (8.8) y (8.9) se obtuvo la siguiente expresión:

$$c \propto \frac{DO}{\omega C_n} h_c = \left(\frac{DO}{X} \right) h_c \quad (8.10)$$

donde el término DO/X es la densidad óptica por unidad de concentración de biomasa expresada como mgDQO_B/L. Haciendo el cociente entre los valores del término DO/X correspondiente a cada microorganismo estudiado y suponiendo que la profundidad del campo examinado (h_c) se mantiene constante resulta:

$$\frac{(DO/X)_1}{(DO/X)_2} = \frac{c_1}{c_2} = Q \quad (8.11)$$

donde los subíndices 1 y 2 corresponden a *S. natans* y la cepa E932 respectivamente.

A partir de los datos presentados en el Capítulo 5, se calcularon los factores (DO/X) correspondientes a *S. natans* y la cepa E932, resultando 1.02 y 1.40 L/gDQO_B respectivamente; aplicando la Ec. (8.11) se estimó un valor de $Q = 0.77$ ($\sigma_Q = 0.03$). Este valor resultó similar al determinado mediante los experimentos descritos en las secciones precedentes del presente Capítulo ($Q = 0.78 - 0.83$) indicando una excelente concordancia entre las diferentes experiencias.

Finalmente, durante la obtención de las mezclas de microorganismos de composición conocida se observó que en algunos casos la bacteria filamentosa y la

floculante se unían formando flóculos compuestos. Debido a que los flóculos aparecían al menos una hora después de realizar las mezclas, no interfirieron en el análisis de las imágenes. Como puede observarse en la Figura 8.13, los flóculos estaban constituidos por una asociación de ambos microorganismos donde *S. natans* formaba un esqueleto por sobre el cual se adherían las bacterias de la cepa E932. Este tipo de asociación se encuentra frecuentemente en los flóculos que se forman naturalmente en sistemas de barros activados (Sezgin y col., 1978).

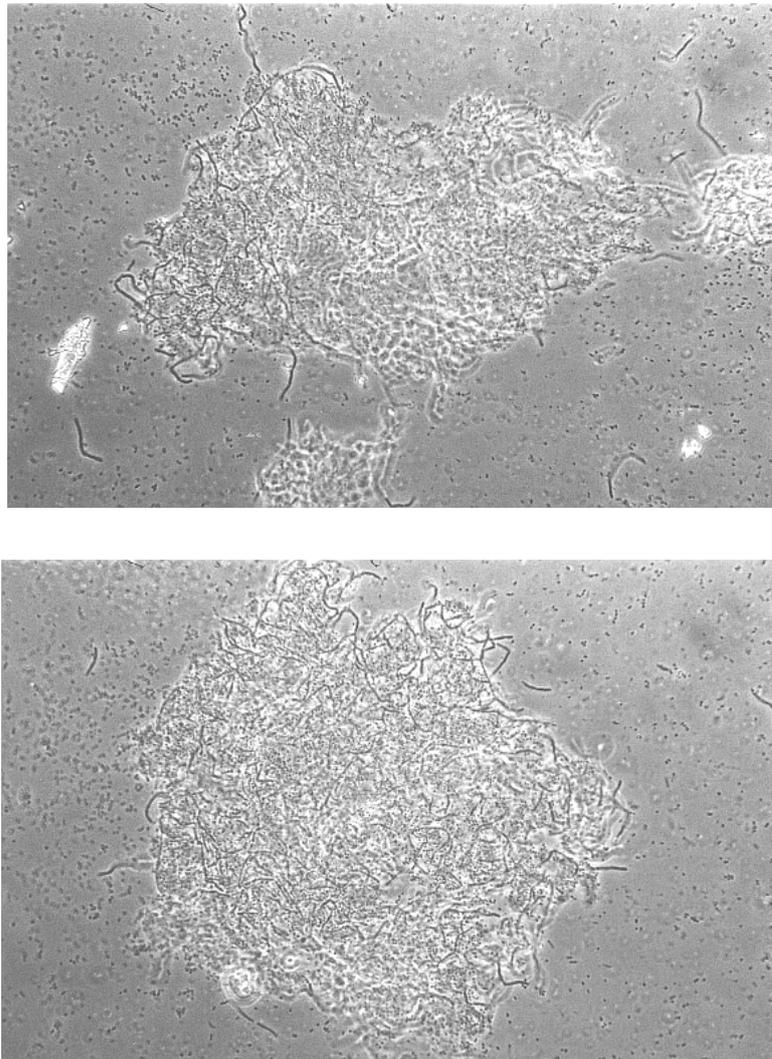


Figura 8.13. Ejemplos de flóculos compuestos por *S. natans* y la cepa E932 (400X)

8.2. Estudio de cultivos mixtos en quimiostato

Con el objeto de estudiar el efecto de la velocidad de dilución (D) en la concentración relativa de la bacteria filamentosa *S. natans* y la cepa floculante E932, se realizaron cultivos mixtos de estas cepas en quimiostato. El experimento se inició con un cultivo puro de *S. natans* operando en forma continua con una D determinada; se agregó la cepa E932 y observó el efecto de sucesivos cambios de D en la población microbiana.

En estos experimentos la concentración de biomasa total (X_T) fue medida como DQO_B (Capítulo 5) y la composición microbiana fue determinada mediante el análisis de imágenes tal como se explicó en las secciones anteriores del presente Capítulo.

A partir de los valores experimentales de f_{a1} (correspondiente a *S. natans*) se calculó f_{x1} mediante la Ec. (8.7) considerando $Q = 0.81$; la fracción f_{x2} (correspondiente a la cepa E932) se calculó como $1 - f_{x1}$. Conociendo las fracciones f_x para ambos microorganismos y la biomasa total (X_T), la concentración de biomasa correspondiente a cada microorganismo (X_1 , X_2) fueron calculadas mediante las siguientes expresiones:

$$X_1 = f_{x1} X_T \quad (8.12.a)$$

$$X_2 = f_{x2} X_T \quad (8.12.b)$$

donde los subíndices 1 y 2 corresponden a *S. natans* y a la cepa E932 respectivamente.

8.2.1. Resultados Obtenidos

En la Figura 8.14 se presenta la variación de la biomasa total y la biomasa correspondiente a cada microorganismo para diferentes velocidades de dilución durante los experimentos de cultivos mixtos en quimiostato.

El experimento se inició con un cultivo puro de *S. natans* (Fig. 8.15.a) operando con una velocidad de dilución $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$. A las 165 hs. (correspondiente a 25 tiempos de residencia hidráulicos) se reemplazaron 500 ml del cultivo por 500 ml de un cultivo de la cepa E932 obteniéndose un cultivo mixto con una biomasa compuesta por un 60% de *S. natans* y un 40% de la cepa E932 (Figura 8.15.b). Simultáneamente, se cambió el valor de D a 0.03 h^{-1} (Fig. 8.14); operando con esta velocidad de dilución, la

fracción de *S. natans* se incrementó hasta un 90 - 95% mientras que la concentración de la cepa E932 disminuyó significativamente (Figura 8.15.c).

A las 300 hs., D se incrementó a 0.39 h^{-1} (Fig. 8.14) obteniéndose un rápido predominio de la cepa E932 (99%). En este punto se observó la formación de flóculos compuestos principalmente por bacterias de la cepa E932 (Figura 8.15.d,e). Si se comparan estos flóculos con los mostrados en la Figura 8.13, puede verse que son de naturaleza completamente diferente. Los flóculos que se formaron a partir de la mezcla de cultivos puros estaban compuestos por ambos tipos de microorganismos (Figura 8.13); sin embargo, los flóculos observados en el cultivo mixto en quimiostato estaban formados exclusivamente por bacterias de la cepa E932 (Figura 8.15.d,e).

Posteriormente, a las 340 hs. de iniciado el experimento, D se disminuyó nuevamente a 0.05 h^{-1} (Fig. 8.14) observándose que aunque continuaba predominando la cepa E932, la fracción correspondiente a *S. natans* se incrementó hasta un 13% alrededor de las 420 hs. (Figura 8.15.f). La velocidad de dilución se aumentó nuevamente a 0.17 h^{-1} para $t = 470$ hs. (Fig. 8.14) y en estas condiciones se observó que la fracción correspondiente a la cepa E932 creció hasta desplazar casi por completo a *S. natans* a las 500 hs.

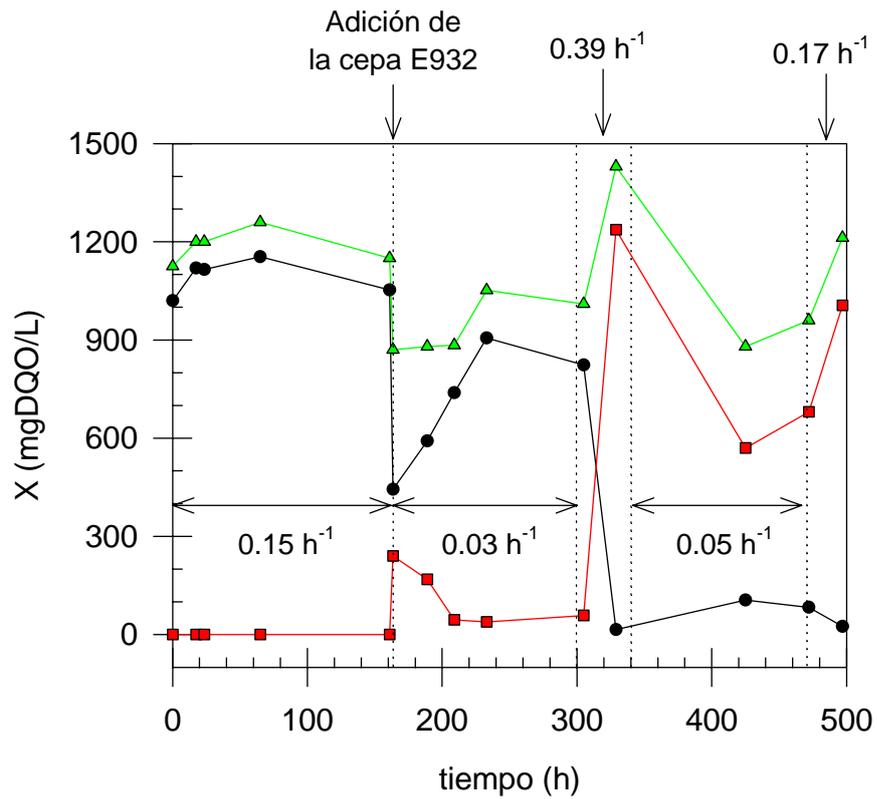


Figura 8.14. Efecto de la velocidad de dilución (D) sobre la composición de un cultivo mixto (λ) *S. natans*, (ν) cepa E932, (σ) Biomasa total
 Las flechas indican la velocidad de dilución empleada en cada caso.

Figura 8.15. Micrografías del cultivo mixto de *Sphaerotilus natans* y la cepa E932 en quimiostato. a - b: 400X; c - f: 1000X

8.2.2. Modelado de los resultados

Los resultados obtenidos demostraron que la composición de un cultivo mixto de *S. natans* y la cepa E932 es función de la velocidad de dilución. Esto implica que es posible controlar el desarrollo del microorganismo filamentoso *S. natans* en un cultivo mixto mediante el ajuste de la velocidad de dilución del biorreactor.

Los balances para los microorganismos y el sustrato limitante en el biorreactor resultan similares a los planteados para los cultivos puros siendo:

$$\frac{dX_1}{dt} = \left(\mu_{\max 1} \frac{S}{K_{S1} + S} - k_{d1} - D \right) X_1 \quad (8.13)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = \left(\mu_{\max 2} \frac{S}{K_{S2} + S} - k_{d2} - D \right) X_2 \quad (8.14)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \left(\mu_{\max 1} \frac{S}{K_{S1} + S} \right) \frac{X_1}{Y_{X/S1}^V} - \left(\mu_{\max 2} \frac{S}{K_{S2} + S} \right) \frac{X_2}{Y_{X/S2}^V} \quad (8.15)$$

donde los subíndices 1 y 2 corresponden a *S. natans* y a la cepa E932 respectivamente. La resolución simultánea del sistema formado por las ecuaciones (8.13), (8.14) y (8.15) permite calcular, teniendo en cuenta las condiciones iniciales en el reactor, la evolución de las variables X_1 , X_2 y S en función del tiempo.

Debido a que el medio de cultivo utilizado durante las experiencias contenía ácido cítrico como única fuente de C y que además era el sustrato limitante del crecimiento, la única condición que se debía cumplir para obtener un estado estacionario con dos microorganismos en un quimiostato (Tabla 8.1) es la igualdad en las velocidades específicas netas de crecimiento ($\mu - k_d$).

Como se discutió en el Capítulo 6, la concentración de sustrato limitante (S) correspondiente al estado estacionario para un cultivo puro puede calcularse igualando a cero las Ecs. (8.13) y (8.14) correspondientes a los microorganismos 1 y 2. En la Tabla 8.2 se presentan los parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes a cada microorganismo estudiado en cultivo puro (ver Capítulos 6 y 7 del presente trabajo de Tesis). A partir de los datos presentados en la Tabla 8.2, se calculó la concentración de S en función de D para a cada microorganismo en cultivo puro en estado estacionario. Como puede observarse en la Figura 8.16, las curvas de S en función de D presentan un punto de intersección (D_i , S_i).

Tabla 8.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes a cultivos puros de *S. natans* y la cepa E932 determinados en quimiostato.

	<i>Sphaerotilus natans</i>		Cepa E932	
$Y^V_{X/S}$ (mgDQO _B mgDQO _S ⁻¹)	0.575	(0.013)*	0.626	(0.013)
μ_{max} (h ⁻¹)	0.458	(0.067)	1.066	(0.133)
k_d (h ⁻¹)	0.011	(0.006)	0.069	(0.011)
K_s (mgDQO _S /L)	54	(24)	130	(55)

*Entre paréntesis se indica el desvío estándar

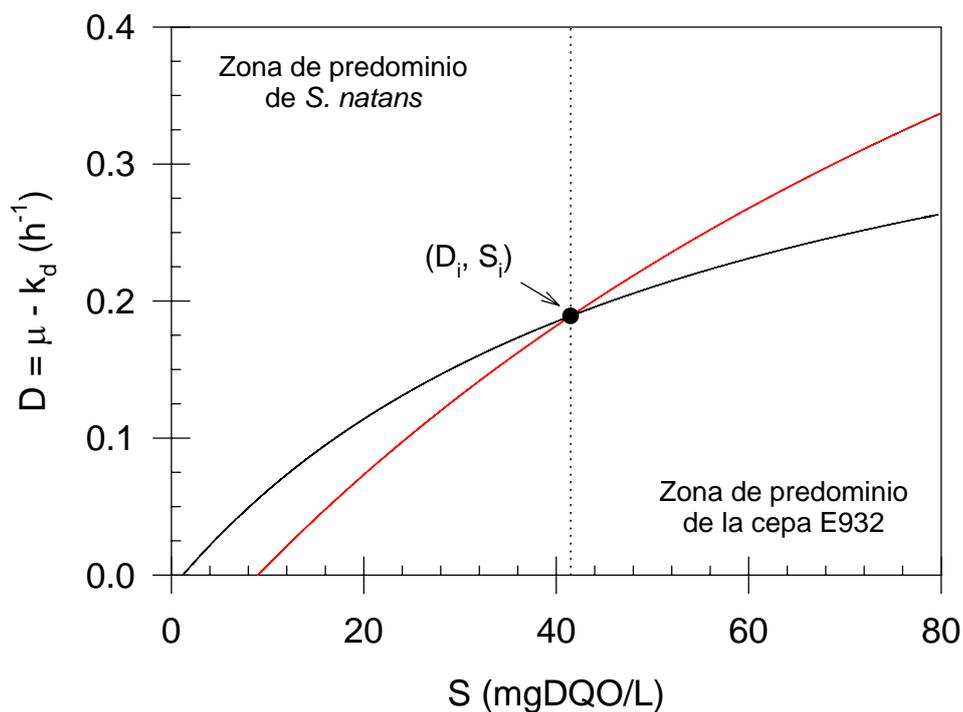


Figura 8.16. Efecto de la velocidad de dilución (D) en la concentración de sustrato en estado estacionario (S) para cultivos puros de *S. natans* (—) y la cepa E932 (—)

Si se supone que no existe ningún tipo de interacción entre los microorganismos en un cultivo mixto, para que el sistema alcance un estado estacionario con ambos microorganismos presentes, la condición de D , S está dada por el punto de intersección D_i , S_i mostrado en la Figura 8.16. Dicha condición es equivalente a la resolución simultánea de las Ecs. (8.13) y (8.14); en ese caso se cumple la siguiente condición:

$$S_i = \frac{K_{S1}(D_i + k_{d1})}{\mu_{\max 1} - D_i - k_{d1}} = \frac{K_{S2}(D_i + k_{d2})}{\mu_{\max 2} - D_i - k_{d2}} \quad (8.16)$$

Mediante la resolución de la Ec. (8.16) se calcularon los valores de S y D correspondientes al punto de intersección siendo $S_i = 41.5 \text{ mgDQO/L}$, $D_i = 0.189 \text{ h}^{-1}$. Este valor permitiría predecir el microorganismo predominante en un cultivo mixto teniendo en cuenta el valor de D al que opera el sistema.

Evidentemente, para un determinado valor de S en el biorreactor, predominará el microorganismo con mayor velocidad específica neta de crecimiento ($\mu - k_d$), la cual a su vez es igual a D en estado estacionario. Así, para valores bajos de S ($D < D_i$) la velocidad específica neta de crecimiento correspondiente a *S. natans* será mayor que para la cepa E932 determinando el predominio del primero; sin embargo, para valores de $S > S_i$ ($D > D_i$) la cepa E932 será la predominante (Fig. 8.16). Esta predicción teórica concuerda satisfactoriamente con los resultados obtenidos en los experimentos con cultivos mixtos comentados en la sección anterior del presente Capítulo. Como puede observarse en la Figura 8.14, *S. natans* predominó sobre la cepa E932 para velocidades de dilución bajas ($D = 0.03 - 0.05 \text{ h}^{-1}$); por el contrario, cuando $D = 0.39 \text{ h}^{-1}$ la cepa E932 desplazó rápidamente al microorganismo filamentoso.

8.2.2.1. Simulación numérica del comportamiento del cultivo mixto

Con el objeto de simular los experimentos previamente descritos se resolvió numéricamente el sistema de ecuaciones 8.13, 8.14 y 8.15. Dicho sistema describe la evolución de las variables X_1 , X_2 y S (los subíndices 1 y 2 corresponden a *S. natans* y a la cepa E932 respectivamente) en función del tiempo. La resolución numérica mediante el programa Sigma Plot 2.0 permitió calcular la concentración de ambos microorganismos ante las variaciones de tipo escalón en los valores de D impuestas durante el experimento. La concentración total de biomasa (X_T) se calculó como $X_1 + X_2$. La simulación del sistema fue realizada a partir del momento en que la cepa E932 fue agregada al biorreactor ($t_0 = 165 \text{ hs.}$); como condiciones iniciales se tomaron los valores de las variables en ese instante del experimento. El paso de tiempo empleado

en los cálculos (Δt) fue de 0.0001 hs. (0.36 seg.) aunque se comprobó que los resultados obtenidos empleando un valor de $\Delta t = 0.001$ hs. (3.6 seg.) eran similares. La concentración de sustrato de la alimentación (S_0) se fijó en 2400 mgDQO/L; en la Figura 8.17 se grafica la variación de la velocidad de dilución (D) en función del tiempo que corresponde a las condiciones en las que se realizó el experimento y que fue utilizada para la integración numérica.

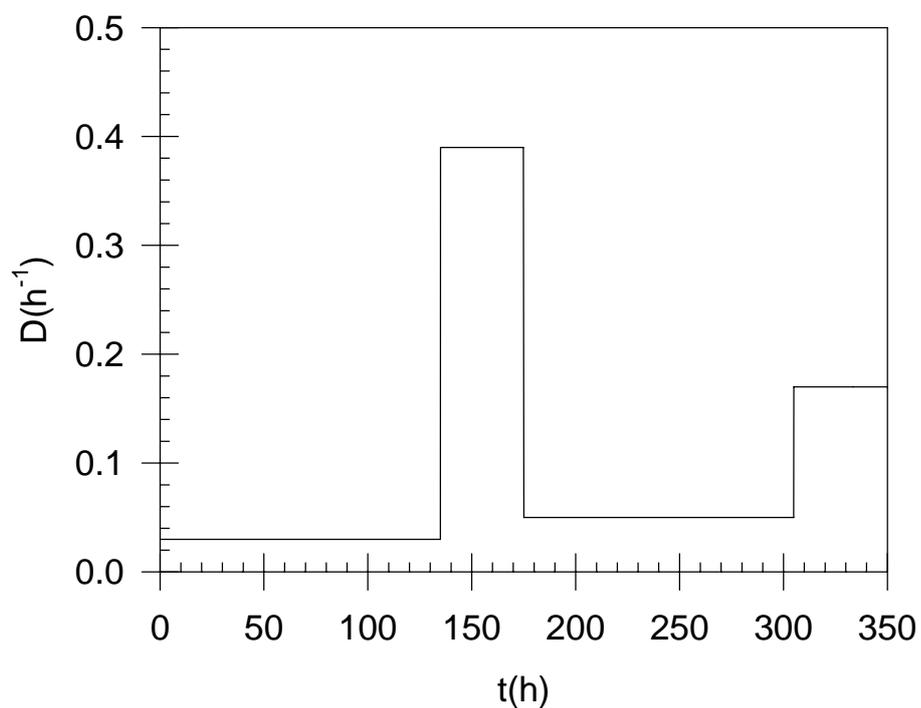


Figura 8.17. Velocidades de dilución (D) en función del tiempo utilizadas en la simulación del experimento de cultivo mixto

El parámetro estimado con mayor error a partir de los experimentos en cultivo puro para ambos microorganismos (Capítulos 6 y 7) resultó K_S (Tabla 8.2). Las simulaciones se realizaron alimentando los parámetros $Y_{X/S}^V$, μ_{\max} y k_d de la Tabla 8.2; en el caso de K_S se trabajó en un entorno que corresponde al desvío estándar informado en dicha Tabla. Los resultados obtenidos mediante la simulación numérica del modelo propuesto (Ecs. 8.13, 8.14 y 8.15) se presentan en la Figura 8.18. El tiempo $t = 0$ en esta Figura corresponde a $t = 165$ hs. de la Figura 8.14, momento en el que se inoculó el biorreactor (el cual contenía *S. natans* en estado estacionario) con la cepa E932.

Como puede observarse en la Figura 8.18, la simulación numérica se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales en todo el intervalo de tiempo estudiado y para los distintos escalones de D . Los valores de K_S que condujeron al mejor ajuste fueron: $K_{S(E932)} = 107$ mgDQO/L y $K_{S(S. natans)} = 65$ mgDQO/L. Estos valores difieren de los informados en la Tabla 8.2 en menos del 20% encontrándose dentro de los correspondientes intervalos de confianza.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que para velocidades de dilución bajas hay un predominio del microorganismo filamentoso *S. natans* por sobre la cepa floculante E932; por lo tanto, estas condiciones de operación favorecerían la aparición de bulking filamentoso en plantas de barros activados que tratan efluentes ricos en ácido cítrico como lo son las aguas residuales provenientes de la industria procesadora de vegetales analizadas.

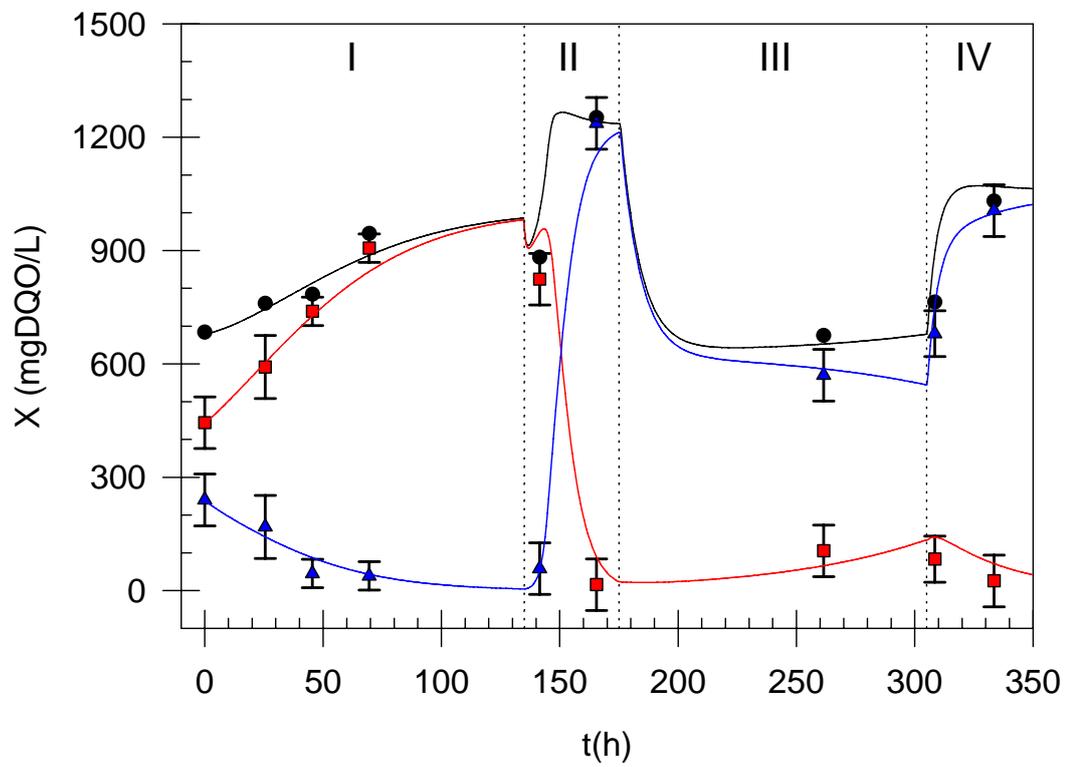


Figura 8.18. Simulación numérica del comportamiento del cultivo mixto en función del tiempo para diferentes valores de velocidad de dilución (D). (I) $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$, (II) $D = 0.39 \text{ h}^{-1}$, (III) $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$, (IV) $D = 0.17 \text{ h}^{-1}$. Datos experimentales: (λ) Biomasa total, (ν) *S. natans*, (σ) cepa E932. Las barras indican el desvío estándar. Las líneas llenas corresponden a la simulación: (—) Biomasa total, (—) *S. natans*, (—) cepa 932.

8.3. Conclusiones del Capítulo

* En el presente Capítulo se describió el desarrollo de una técnica simple y precisa basada en el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía óptica la cual permitió determinar la concentración de cada tipo microbiano presente en un cultivo mixto. La técnica desarrollada resultó aplicable a la cuantificación de la biomasa presente tanto en cultivos puros como en cultivos mixtos de *S. natans* y de la cepa E932. Asimismo, se determinó que el área ocupada por las bacterias por unidad de biomasa era una característica intrínseca de cada especie estudiada.

* Mediante la aplicación de la técnica desarrollada en el presente trabajo de Tesis se estudió el comportamiento de un cultivo mixto compuesto por el microorganismo filamentoso *Sphaerotilus natans* y la bacteria floculante E932. Los resultados obtenidos mostraron una buena concordancia con el comportamiento predicho teóricamente. Para valores bajos de velocidad de dilución se observó una prevalencia de *S. natans*; sin embargo, para valores altos de velocidad de dilución se observó un rápido desarrollo de la cepa floculante desplazando casi completamente al microorganismo filamentoso.

* Se realizó una simulación numérica del efecto de cambios escalonados de la velocidad de dilución en la composición del cultivo mixto obteniéndose un ajuste satisfactorio a los datos experimentales. Debido a que para bajas velocidades de dilución se observó un predominio de *S. natans*, estas condiciones de operación favorecerían la aparición de bulking filamentoso.

CONCLUSIONES

Con referencia al análisis del sistema modelo de efluente de la industria procesadora de vegetales, éste resultó un medio limitado en fuente de carbono. Se observaron importantes diferencias en la composición de dicho sistema para efluentes obtenidos a tiempos de contacto papa - agua, cortos o largos. Las sustancias presentes a tiempos de contacto cortos provienen principalmente de la papa y por lo tanto, la composición del efluente es más característica de las industrias que procesan este tipo de vegetal. En este caso se identificaron dos fuentes de carbono mayoritarias: ácidos orgánicos (principalmente ácido cítrico) y carbohidratos (glucosa y otros azúcares). Para el efluente que resulta de tiempos de contacto más largos, la composición es resultado de la actividad fermentativa microbiana (aparecen los ácidos acético y láctico); esto determina que la composición en este tipo de muestras sea más variable e indefinida.

Se aislaron y caracterizaron cuatro cepas con características floculantes procedentes de diferentes fuentes que se denominaron E932, JB, B y C. Con relación a la utilización de diferentes fuentes de carbono, la cepa B presentó pobre desarrollo en general, siendo el acetato la fuente de carbono más favorable para su crecimiento. La cepa C fue la única que no desarrolló en acetato, el crecimiento en citrato fue bueno aunque lento mientras que en glucosa fue rápido y abundante. El comportamiento de las cepas E932 y JB resultó similar; ambas cepas mostraron desarrollo abundante tanto en citrato como en acetato pero el desarrollo en glucosa resultó muy escaso. Mediante una serie de pruebas bioquímicas se demostró que ambas cepas pertenecían al género *Acinetobacter* especie *anitratu*s.

Con fines comparativos, se realizaron ensayos de utilización de diferentes fuentes de carbono para la cepa filamentosa *S. natans* ATCC #29329; este microorganismo creció en todos los medios ensayados aunque se desarrollaba más rápida y abundantemente en un medio con acetato o citrato que con glucosa.

Los estudios del desarrollo de la cepa E932 en medio líquido demostraron que el microorganismo pudo desarrollar en un medio con citrato; sin embargo, en una mezcla glucosa/citrato el crecimiento era muy pobre; adicionalmente se demostró que la cepa E932 transformaba la glucosa del medio de cultivo en algún producto, posiblemente ácido glucónico.

Se diseñó un medio de cultivo sintético con citrato como única fuente de carbono y sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno para ser empleado en

posteriores estudios de la cinética de crecimiento de *Sphaerotilus natans* y la cepa E932 en cultivos puros y mixtos.

La cepa E932 fue seleccionada para estudios posteriores como representante de los microorganismos floculantes debido a dos factores: por un lado, esta cepa fue aislada a partir de muestras de barros activados de una planta que trataba un efluente modelo de la industria procesadora de vegetales; por otra parte, la cepa E932 fue identificada (*Acinetobacter anitratus*) y esto facilita su comparación con los datos de bibliografía.

Se estudió el efecto de la velocidad de agitación, caudal de aireación y medio de cultivo en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La) correspondiente al biorreactor empleado en el presente trabajo de Tesis. Para ello se empleó un método dinámico que tiene en cuenta la dinámica del electrodo. El valor de K_La aumentó con el incremento de la velocidad de agitación (N) y en menor medida del caudal de aireación (Q_A) en agua destilada. El efecto combinado de ambas variables en el valor de K_La fue modelado matemáticamente mediante la siguiente ecuación: $K_La = \alpha N^\beta Q_A^\gamma$. Esta ecuación se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales obteniéndose las constantes $\alpha = 0.023 (\pm 0.0089)$, $\beta = 1.174 (\pm 0.0602)$, $\gamma = 0.747 (\pm 0.0493)$. Asimismo se obtuvieron valores similares de K_La en agua destilada y en condiciones de operación con medio de cultivo y microorganismos. Por lo tanto, la ecuación propuesta puede ser utilizada para calcular los valores de K_La en condiciones de operación.

Se evaluaron diferentes métodos para la determinación de biomasa en cultivos puros y en sistemas de barros activados. Asimismo se propusieron y evaluaron diferentes modificaciones a las técnicas estándar de determinación de biomasa como SSV y como DQO.

La modificación propuesta de la técnica de SSV permitió determinar la biomasa para cultivos de bacterias del orden de $1 \mu\text{m}$ (como es la cepa E932) que el método estándar no puede detectar debido a que las células no son retenidas por el tipo de membrana utilizada. Los valores de SSV obtenidos por la técnica estándar y la modificada no mostraron diferencias significativas. El coeficiente de variación de la técnica modificada resultó similar al de la técnica estándar, siendo menor al 3% para triplicados en el rango estudiado.

Se encontró una muy buena concordancia entre la técnica propuesta de determinación de biomasa como DQO (calculada por diferencia entre DQO_T y DQO_S) y el método desarrollado por Bullock y col. (1996). El método propuesto de determinación de biomasa como DQO resultó más rápido y sencillo que el método

clásico de determinación de SSV, requiere bajo volumen de muestra y utiliza un kit comercial para la determinación de DQO. Esto facilita el manejo de gran número de muestras y acorta el tiempo del ensayo a 2 hs.

La estimación de biomasa mediante DO resultó aplicable solamente para los cultivos puros estudiados; sin embargo, en sistemas de barros activados no se logró una buena correlación debido principalmente a la heterogeneidad de las muestras y a la variabilidad en el tamaño de los flóculos.

Mediante la aplicación de las diferentes técnicas desarrolladas en el presente trabajo de Tesis se determinó el factor de conversión f_x (mgDQO_B/mgSSV) para diferentes tipos de cultivos; los valores hallados se encuentran comprendidos dentro del rango informado por otros autores. De acuerdo a los resultados obtenidos, el método propuesto de medida de biomasa asociada a los sólidos suspendidos como DQO es aplicable tanto a estudios de laboratorio como a determinaciones en plantas de tratamiento de efluentes.

Con referencia a la cepa floculante E932 se determinó que para una relación C:N inferior a 26.4 - 30.0 mgDQO_S/mgN el crecimiento estaba limitado por la fuente de C (ácido cítrico). Asimismo, se determinó que el rendimiento en biomasa en condiciones limitantes de fuente de N ($Y_{X/N}$) era de 12.0 mgDQO_B/mgN.

Mediante experimentos en cultivo continuo se determinó que la concentración de la DQO soluble puede ser reducida solamente hasta un cierto límite que se denominó DQO residual = 80 mg/L. Este valor es la menor concentración de DQO soluble que se puede conseguir mediante el desarrollo de la cepa E932 en las condiciones de trabajo.

Las ecuaciones empleadas permitieron predecir la concentración de sustrato biodegradable (S) y biomasa (X) en las condiciones de trabajo. Los experimentos de cultivo continuo en quimiostato permitieron determinar los siguientes parámetros que caracterizan el desarrollo de la cepa E932 en un sistema de cultivo continuo en un medio con citrato como sustrato limitante: $Y_{X/S}^V = 0.626 \text{ mgDQO}_B \text{ mgDQO}_S^{-1}$, $k_d = 0.069 \text{ h}^{-1}$, $q_{S_{\max}} = 1.703 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_S = 130 \text{ mgDQO}_S/\text{L}$, $\mu_{\max} = 1.066 \text{ h}^{-1}$, $m_S = 0.110 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$.

En base al estudio del efecto de la relación C:N de la alimentación en el desarrollo de *S. natans* se determinó que para una relación C:N inferior a 23.5 – 27.3 mgDQO_S/mgN el crecimiento estaba limitado por la fuente de C (ácido cítrico). Asimismo, se determinó el rendimiento en biomasa en condiciones limitantes de fuente de N resultando: $Y_{X/N} = 15.1 \text{ mgDQO}_B/\text{mgN}$.

Los experimentos de cultivo continuo en quimiostato permitieron determinar los siguientes parámetros que caracterizan el desarrollo de *S. natans* en un sistema de

cultivo continuo en un medio con ácido cítrico como limitante del crecimiento: $Y_{X/S}^V = 0.575 \text{ mgDQO}_B \text{ mgDQO}_S^{-1}$, $k_d = 0.010 \text{ h}^{-1}$, $q_{S_{\max}} = 0.797 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_S = 54 \text{ mgDQO}_S/\text{L}$, $\mu_{\max} = 0.458 \text{ h}^{-1}$, $m_S = 0.018 \text{ mgDQO}_S \text{ mgDQO}_B^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Mediante la aplicación de técnicas respirométricas en el estudio del desarrollo de *S. natans* en sistema batch se determinó que el microorganismo utilizaba exclusivamente oxígeno molecular como aceptor de electrones. Asimismo, mediante la técnica respirométrica se determinaron valores de velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) similares a las técnicas clásicas y por lo tanto la técnica puede ser utilizada para la estimación de parámetros cinéticos y estequiométricos.

Las diferentes técnicas aplicadas permitieron determinar el efecto del pH sobre la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno ($q_{O_{2\max}}$), la velocidad específica máxima de consumo de sustrato ($q_{S_{\max}}$), el rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) y el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$). En base a estos resultados obtenidos se desarrolló un modelo matemático que permitió calcular el valor de éstas variables en función del pH del medio de cultivo.

Con el objeto de evaluar el desarrollo conjunto de *S. natans* y de la cepa E932 en cultivos mixtos se desarrolló una técnica simple y precisa basada en el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía óptica. La técnica desarrollada resultó aplicable a la cuantificación de la biomasa presente tanto en cultivos puros como en cultivos mixtos de *S. natans* y de la cepa E932. Asimismo, se determinó que el área ocupada por las bacterias por unidad de biomasa era una característica intrínseca de cada especie estudiada.

Mediante la aplicación de la técnica desarrollada en el presente trabajo de Tesis se estudió el comportamiento de un cultivo mixto compuesto por *Sphaerotilus natans* y la bacteria floculante E932. Los resultados obtenidos mostraron una buena concordancia con el comportamiento predicho teóricamente. Para valores bajos de velocidad de dilución se observó una prevalencia de *S. natans*; sin embargo, para valores altos de velocidad de dilución se observó un rápido desarrollo de la cepa floculante desplazando casi completamente al microorganismo filamentoso.

Se realizó una simulación numérica del efecto de cambios escalonados de la velocidad de dilución en la composición del cultivo mixto obteniéndose un ajuste satisfactorio a los datos experimentales. Debido a que para bajas velocidades de dilución se observó un predominio de *S. natans*, estas condiciones de operación favorecerían la aparición de bulking filamentoso.

BIBLIOGRAFÍA

Aberley R. C., Rattray G. B. y Douglas P. P. (1974) Air diffusion unit. *J. Water Pollut. Control Fed.* 46, 895-910.

Ahmad M. N., Holland C. R. y McKay G. (1994) Mass transfer studies in batch fermentation: mixing characteristics. *J. Food Eng.* 23, 145-158.

Aiba S., Humphrey A. E. y Millis N. F. (1973) *Biochemical Engineering*. Academic Press, Inc., New York.

Aichinger G., Leslie Grady Jr. C. P. y Tabak H. H. (1992) Application of respirometric biodegradability testing protocol to slightly soluble organic compounds. *Wat. Environ. Res.* 64, 890-900.

APHA (1992) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edn. Am. Publ. Hlth. Assoc., Washington, D. C.

ATV Working Group 2.6.1. (1989) Prevention and control of bulking sludge and scum. *Korrespondenz Abwasser* 36, 165-177.

Babel W., Brinkmann U. y Müller R. H. (1993) The auxiliary substrate concept - An approach for overcoming limits of microbial performances. *Acta Biotechnol.* 13, 211-242.

Banco Mundial (1995) *La contaminación ambiental en la Argentina. Problemas y Opciones. Tomo II: Informe Técnico*. World Bank Report No. 14070-AR, 1995.

Bandell M., Lhotte M.E., Marty-Teyssset C., Veyrat A., Prevost H., Dartois V., Divies C., Konings W.N. y Lolkema J.S. (1998) Mechanism of citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1594-1600.

Barbusinski K. y Koscielniak H. (1995) Influence of substrate loading intensity on floc size in activated sludge process. *Water Res.* 29, 1703-1710.

Beccari M., Mappelli P. y Tandoi V. (1980) Relationship between bulking and physicochemical properties of activated sludges. *Biotech. Bioeng.* 22, 969-979.

Bertola N., Palladino L., Bevilacqua A. y Zaritzky N. (1999) Optimisation of the activated sludge system for the wastewater treatment of a potato processing plant. *J. Food Eng.* 40, 27-33.

Bjurstrom E.E., Just J. y Swartz J.R. (1985) Analysis of the behaviours of some industrial microbes towards oxygen. En *Biotech. '85 USA*. Online. Pinne, UK, pp. 527-544.

Boller M. (1997) Small wastewater treatment plant - A challenge to wastewater engineers. *Water Sci. Technol.* 35, 1-12.

Boorsma A., van der Rest M.E., Lolkema J.S. y Konings W.N. (1996) Secondary transporters for citrate and the Mg^{+2} -citrate complex in *Bacillus subtilis* are homologous proteins. *J. Bacteriol.* 178, 6216-6222.

Buchan L. (1983) Possible biological mechanism of phosphorous removal. *Water Sci. Technol.* 15, 87-103.

Bullock C.M., Bicho P.A., Zhang Y. y Saddler J.N. (1996) A solid chemical oxygen demand (COD) method for determining biomass in waste waters. *Water Res.* 30, 1280-1284.

Burke R.A., Dold P.L. y Marais G.vR. (1986) Biological excess phosphorous removal in short sludge age activated sludge systems. Res. Rept. No. W58, Dept. of Civil Eng., Univ. of Capetown, RSA.

CIDIS (1997) *Catálogo Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental 96/97*. Edición Argentina. AIDIS-Argentina.

Cech J. S., Chudoba J. y Grau P. (1985) Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms. *Water Sci. Technol.* 17, 259-272.

Cenens C., Van Beurden K.P., Jenné R. y Van Impe J.F. (2001) On the development of a novel image analysis technique to distinguish between flocs and filaments in activated sludge images. *Proceedings of the 3rd International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Session XII, pp. 282-289.

Chudoba J., Grau P. y Ottová V. (1973) Control of activated sludge filamentous bulking-II. Selection of microorganisms by means of a selector. *Water Res.* 7, 1389-1406.

Chudoba J., Cech J. S., Farkac J. y Grau P. (1985) Control of activated sludge filamentous bulking. Experimental verification of a kinetic selection theory. *Water Res.* 19, 191-196.

Converti A., Rovatti M. y Del Borghi M. (1995) Biological removal of phosphorous from wastewaters by alternating aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.* 29, 263-269.

Cooper C.M., Fernstrom G.A. y Miller S.A. (1944) *Ind. Eng. Chem.* 36, 504.

Corrieu G., Lalande M. y Peringer P. (1975) *Rev. Ferm. Ind. Alim.* 30, 126.

Crabtree K. y McCoy E. (1967) *Zoogloea ramigera* Itzigsohn, identification and description. *Int. J. Sys. Bact.* 17, 1-10.

Daigger G.T. y Grady Jr. C.P.L. (1982) The dynamics of microbial growth on soluble substrates. A unifying theory. *Water Res.* 16, 365-382.

da Motta M., Pons M.N. y Roche N. (2001) Study of filamentous bacteria by image analysis and relation with settleability. *Proceedings of the 3rd International*

Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes. Session XII, pp. 265-272.

Dang J.D., Harvey D.M., Jobbagy A. y Leslie Grady Jr. C.P.L. (1989) Evaluation of biodegradation kinetics with respirometric data. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 61, 1711-1721.

Dias F.F. y Heukelekian H. (1967) Utilization of inorganic nitrogen compounds by *Sphaerotilus natans* growing in a continuous-flow apparatus. *Appl. Microbiol.* 15, 1083-1086.

Dignac M.F., Urbain V., Rybacki D., Bruchet A., Snidaro D. y Scribe P. (1998) Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci. Tech.* 38, 45-53.

Di Marzio W.D. (2001) First results from a screening of filamentous organisms present in Buenos Aires's activated sludge plants Argentina. Trabajo presentado en 3rd *IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes.* Poster Session, paper Nro. 133. Roma, Italia.

Dondero N.C. (1975) The *Sphaerotilus-Leptothix* group. *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 407-428.

Drouin J.F., Louvel L., Vanhoutte B., Vivier H., Pons M.N. y Germain P. (1997) Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis. *Biotechnol. Techniques* 11, 819-824.

Drtíl M., Németh P. y Bodík I. (1993) Kinetic constants of nitrification. *Water Res.* 27, 35-39.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *An. Chem.* 28, 350-356.

Ducrós E., Ferrari M., Juárez P., Mattea M. y Orejas Joaquín (1998) Transferencia de oxígeno en un biorreactor de tanque agitado: aplicación a la producción de cepas de *Staphylococcus aureus* Smiths. Actas del 7^{mo}. Congreso Latinoamericano de Transferencia de Materia y Calor. Vol. II, pp. 300-305. Salta, Arg.

Durán J. (1999). Tratamiento biológico de efluentes por barros activados. Presentado en: "IV Curso de Tratamiento Biológico de Residuos", UFSC, Brasil.

Eckenfelder W.W. Jr. (1970) *Water Quality Engineering for Practicing Engineers.* Barnes & Noble, New York.

Eckenfelder W.W. Jr. (1989) *Industrial Water Pollution Control.* Segunda Edición. McGraw-Hill Company, New York.

Eckenfelder W.W. y Ford D.L. (1970) *Water pollution control. Experimental procedures for design.* Jenkins Publishing Company. New York.

Eikelboom D.H. (1977) Identification of filamentous organisms in bulking activated sludge. *Prog. Wat. Technol.* 8, 153-164.

Eikelboom D.H. y Geurkink B. (2001) Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants. *Proceedings of the 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Session XVIII, pp. 409-417.

Eikelboom D.H. y van Buijsen H.J.J. (1981) *Microscopic Sludge Investigation Manual*. TNO Res. Inst. for Env. Hygiene, Delft, Holanda.

Eriksson L., Steen I. y Tendaj M. (1992) Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant. *Water Sci. Technol.* 25, 251-265.

Ellis T.G., Barbeau D.S., Smets B.F. y Grady Jr. C.P.L. (1996) Respirometric technique for determination of extant kinetic parameters describing biodegradation. *Wat. Environ. Res.* 68, 917-926.

Figueredo M.M. y Calderbank P.M. (1979) The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution. *Chem. Eng. Sci.* 34, 1333-1338.

Fieschko J. y Humphrey A.E. (1984) Statistical analysis in the estimation of maintenance and true growth yield coefficients. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 394-396.

Gaab D.M.D., Ekama G.A., Jenkins D. y Marais G.v.R. (1989) The incidence of *Sphaerotilus natans* in laboratory scale activated sludge systems. *Water Sci. Technol.* 21, 29-36.

Gaab D.M.D., Gonzalez E. y Simons W. (1985) The effects of a selector on the growth of filamentous bacteria in the nitrification activated sludge process. Internal Rept. Dept. of Water Pollution Control, San José, CA.

Hao O.J., Richard M.G., Jenkins D. y Blanch H.W. (1983) The half-saturation coefficient for dissolved oxygen: a dynamic method for its determination and its effect on dual species competition. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 403-416.

Heine W., Sekoulov I., Burkhardt H. y Behrendt J. (2001) Early recognition of poor sludge settling due to filamentous organism by image analysis. Trabajo presentado en 3rd *International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Poster Session, paper Nro. 201. Roma, Italia.

Henze M., Grady Jr. C.P.L., Gujer W., Marais G.vR. y Matsuo T. (1987) Activated sludge model No. 1. IAWPRC Scientific and Technical Reports No. 1, IAWQ London.

Henze M., Gujer W., Takahashi M., Tomonori M., Wentzel M.C. y Marais G. vR. (1995) Activated sludge model No. 2. IAWQ Scientific and Technical Reports No. 3, IAWQ London.

Hisieh D.P.H., Silver R.S. y Mateles R.L. (1969) *Biotechnol. Bioeng.* 11, 1.

Holmberg U., Olsson G. y Andersson B. (1989) Simultaneous DO control and respiration estimation. *Water Sci. Tech.* 21 1185-1195.

Hoover R.S. y Porges N. (1952) Assimilation of dairy wastes by activated sludge-II. The equations of synthesis and rate of oxygen utilization. *Sewage and Ind. Wastes* 24, 306-312.

Houtmeters J., van den Eynde E., Poffe R. y Verachter H. (1980) Relation between substrate feeding pattern and development of filamentous bacteria in activated sludge process. *European. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 63.

Hugenholtz J., Perdon L y Abee T. (1993) Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4216-4222.

Irvine R.L. y Bryers J. D. (1985) Stoichiometry and kinetics of waste treatment. En: *Comprehensive Biotechnology*. Vol. 4. (C. W. Robinson and J. A. Howell, editors). Pergamon, New York. Cap. 41, pp. 757-772.

Ishiguro N., Izawa H., Shinagawa M., Shimamoto T. y Tsuchiya T. (1992) Cloning and nucleotide sequence of the gene (citC) encoding a citrate carrier from several *Salmonella* serovars. *J. Biol. Chem.* 267, 9559-9564.

Jenkins D. (1992) Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Water Sci. Tech.* 25, 215-230.

Jenkins D., Richard M.G. y Daigger G.T. (1993) *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2nd Edition. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan.

Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G., Urbain V. y Manem J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res.* 29, 1639-1647.

Joshi-Tope G. y Francis A.J. (1995) Mechanisms of biodegradation of metal-citrate complexes by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 177, 1989-1993.

Juni E. (1984) Genus III *Acinetobacter*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, section 4, Williams & Wilkins (Eds.), Baltimore, pp 303-307.

Kämpfer P., Weltin D., Hoffmeister D. y Dott W. (1995) Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Water Res.* 29, 1585-1588.

Karim M.Y.A. y Sistrunk W.A. (1984) The use of selected strains of yeasts in the treatment of processing wastewater from lye-peeled and steam-peeled potatoes. *J. Food Processing Preservation* 8, 175-189.

Karim M.Y.A. y Sistrunk W.A. (1985) Treatment of potato processing wastewater with coagulating and polymeric flocculating agents. *J. Food Sci.* 50, 1657-1661.

Kappeler J. y Gujer W. (1992) Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Sci. Tech.* 25, 125-140.

Keesman K.J., Spanjers H. y van Straten G. (1998) Analysis of endogenous process behavior in activated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 156-163.

Kerdachi D.A. y Healey J.K. (1987) The reliability of the cold perchloric acid extraction to assess metal-bound phosphate. En: *Phosphate Removal from Wastewater*. Editado por Ramadori R., Pergamon Press, Oxford.

King E.F. y Dutka B.J. (1986) Respirometric techniques. En: *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Editado por Dutka B. y Bitton G., CRC Press, Florida.

Koestier W.T., Thoenes D. y Frankena J.F. (1973) Mass transfer in a closed stirred gas-liquid contactor, Part 1. *Chem. Eng.* 5, 61-69.

Köhne M. (1985) Practical experiences with a new on-line BOD measuring device. *Environ. Technol. Lett.* 6, 546-555.

Kong Z., Vanrolleghem P., Willems P. y Verstraete W. (1996) Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer. *Water Res.* 30, 825-836.

Kontopidis G., Matthey M. y Kristiansen B. (1995) Citrate transport during the citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biotech. Lett.* 17, 1101-1106.

Lee S.E., Koopman B.L. Jenkins D. y Lewis R.F. (1982) The effect of aeration basin configuration on activated sludge bulking at low organic loading. *Water Sci. Technol.* 14, 407.

Lolkema J.S., Enquist H. y van der Rest M.E. (1994) Transport of citrate catalyzed by the sodium-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae* is obligatory coupled to the transport of two sodium ions. *Eur. J. Biochem.* 220, 469-475.

Lotter L.H. (1985) The role of bacterial phosphate metabolism in enhanced phosphorous removal from activated sludge process. *Water Sci. Technol.* 17, 127-138.

Magni C., Lopez P. y de Mendoza D. (1996) The properties of citrate transport catalyzed by CitP of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *FEMS Microbiology Letters* 142, 265-269.

Mauss P., Drouin J.F., Pons M.N., Vivier H., Germain P., Louvel L. y Vanhoutte B., (1997) Location of respiration activity in filamentous bacteria by image analysis. *Biotechnol. Techniques* 11, 813-817.

Meers J.L. y Tempest D.W. (1968) The influence on the behaviour of mixed microbial populations in magnesium-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 52, 309-317.

Metcalf L. y Eddy H.P. (1977) *Tratamiento y depuración de las aguas residuales*. Editorial Labor S.A., Barcelona.

Metcalf y Eddy Inc. (1987) *Wastewater Engineering: Treatment / Disposal / Reuse* (Revisado por Tchobanoglous G.), 2nd edn. McGraw-Hill, New York.

Meynell C.G. y Meynell E. (1969) *Bacteriología Experimental. Teoría y Práctica*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.

Miller G.T. (1994) *Ecología y Medioambiente*. Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., México.

Monod J. (1949) The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 3, 371-394.

Moscoso J. y León R. (1996) *Curso de Tratamiento y Uso de Aguas Residuales*. OPS/CEPIS/PUB 96.20. Lima, Perú.

Mulder E.G. (1989) Genus *Sphaerotilus natans* Kützing. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, section 22, Williams & Wilkins (Eds.), Baltimore, pp. 1994-1998.

Neethling J.B., Asce A.M. y Chung Y.C. (1987) Activated sludge-chlorine reactions during bulking control. *J. Env. Eng.* 113, 134-146.

Okrend H. y Dondero N.C. (1964) Requirement of *Sphaerotilus natans* for cyanocobalamin. *J. Bacteriol.* 87, 286-292.

Orhon D.; Görgün E.; Germirli F. y Artan N. (1993) Biological treatability of dairy wastewaters. *Water Res.* 27, 625-633.

Orhon D. y Artan N. (1994) *Modelling of activated sludge systems*. Technomic Publishing Company, Inc., USA.

Orhon D., Yildiz G., Ubay Cokgor E. y Sozen S. (1995) Respirometric evaluation of the biodegradability of confectionery wastewaters. *Water Sci. Technol.* 32, 11-19.

Palm J.C., Jenkins D. y Parker D.S. (1980) Relationship between organic loading, dissolved oxygen concentration and sludge settleability in the completely-mixed activated sludge process. *JWPCF* 52, 2484-2491.

Pellegrin V., Juretschko S., Wagner M. y Cottenceau G. (1999) Morphological and biochemical properties of a *Shaeerotilus sp.* isolated from paper mill slimes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 156-162.

Picha D.H. (1985) Organic acid determination in sweet potatoes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 33, 743-745.

Pirt S.J. (1975) *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell, Oxford.

Pitter P. y Chudoba J. (1990) *Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment*. Boca Raton, Fl.: CRC Press, Inc.

Postgate J.R. y Hunter J.R. (1962) The survival of starved bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 29, 233-263.

Postgate J.R. y Hunter J.R. (1964) Accelerated death of *Aerobacter aerogenes* starved in the presence of growth-limiting substrates. *J. Gen. Microbiol.* 34, 459-473.

Powell E.O. (1963) Photometric methods in bacteriology. *J. Sci. Food Agric.* 4, 1-5.

Ramalho R.S. (1993) *Tratamiento de aguas residuales*. Ed. Reverté, S.A, Barcelona.

Ramos A., Poolman B., Santos H., Lolkema J. y Konings W.N. (1994) Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generates a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.* 176, 4899-4905.

Rensink J.H., Donker H.J.G.W. y Ijwema T.S.J. (1982) The influence of feeding pattern on sludge bulking. En: *Bulking of activated sludge: preventative and remedial methods*. Eds. B. Chambers y E.J. Tomlinson, Ellis Horwood Ltd., Chichester, Inglaterra.

Richard M.G. (1989) *Activated Sludge Microbiology*. Water Polln. Control Fedn., Alexandria, VA.

Richard M., Hao O. y Jenkins D. (1985) Growth kinetics of *Sphaerotilus* species and their significance in activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* 57, 68-81.

Roels J.A. (1983) *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

- Ros M. (1993) *Respirometry of Activated Sludge*. Technomic Publishing Co., Inc. Basilea, Suiza.
- Rubio M. (1995) Introducción al tratamiento de efluentes líquidos. Presentado en "Tratamiento de efluentes cloacales e industriales. Fundamentos y aspectos prácticos", Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, UNLP.
- Sawyer C.N. (1956) Bacterial Nutrition and Synthesis. En *Biological Treatment of Sewage and Industrial Wastes*, Vol 1, J. McCabe and W.W. Eckenfelder Jr. eds., New York. Reinhold Publishing Co., pp. 3-17.
- Seoánez Calvo M. (1996) *Ingeniería del Medio Ambiente Aplicada al Medio Natural Continental*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Sezgin M., Jenkins D. y Parker D.S. (1978) A unified theory of filamentous activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* 50, 362-381.
- Shimizu T., Kudo K. y Nasu Y. (1993) Anaerobic waste-water sludge digestion - A bioconversion mechanism and kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 1082-1091.
- Shindala A., Bungay III H.R., Krieg N.R. y Culbert K. (1965) Mixed-culture interactions. *J. Bacteriol.* 89, 693-696.
- Sollfrank U. y Gujer W. (1990) Simultaneous determination of oxygen uptake rate and oxygen transfer coefficient in activated sludge systems by an on-line methods. *Water Res.* 24, 725-732.
- Stanier R.Y., Doudoroff M. y Adelberg E.A. (1970) *The Microbial World*, 3rd. ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc.
- Stanier R.Y., Adelberg E.A. y Ingraham J. (1976) *The microbial world*, 4^{ta} ed., Prentice Hall, Inc., USA.
- Starremburg M.J. y Hugenholtz J. (1991) Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3535-3540.
- Still D., Blackbeard J.R., Ekama G.A. y Marais G. vR. (1986) The effect of feeding patterns on sludge growth rate and sludge settleability. Res. Rept. No. W55, Dept. of Civil Eng., Univ. of Capetown, RSA.
- Strom P.F. y Jenkins D. (1984) Identification and significance of filamentous microorganisms in activated sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 56, 449-459.
- Switzenbaum M.S., Plante T.R y Woodworth B.K. (1992) Filamentous bulking in Massachusetts: extent of the problem and case studies. *Water Sci. Technol.*, 25, 265-271.
- Taguchi H. y Humphrey A.E. (1966) *J. Ferment. Technol.* 44, 881.
- Talbur W.F. y Smith O. (1987) *Potato Processing*. Van Nostrand Reinhold Co., New York.

Tanaka H., Kurano N., Ueda S., Okazaki M. y Miura Y. (1985) Model system of bulking and flocculation in mixed culture of *Sphaerotilus sp.* and *Pseudomonas sp.* for dissolved oxygen deficiency and high loading. *Water Res.* 19, 563-571.

Tsao G.T. y Kempe L.L. (1960) *J. Biochem. Microbiol. Technol.* 2, 129-142.

Tsuchiya H., Drake J., Jost J. y Fredrikson A. (1972) Predator-Prey interactions of *Dictyostelium discoideum* and *Escherichia coli* in continuous culture. *J. Bacteriol.* 110, 1147-1153.

Ubisi M.F., Jood T.W., Wentzel M.C. y Ekama G.A. (1997) Activated sludge mixed liquor heterotrophic active biomass. *Water SA* 23, 239-248.

Urbain V., Block J.C. y Manem J. (1993) Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Water Res.* 27, 829-838.

van den Eynde E., Vriens L. y Verachtert H. (1982) Relation between substrate feeding pattern and development of filamentous bacteria in activated sludge processes. III. Applications with industrial waste waters. *European. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15, 246.

van der Waarde J., Krooneman J., Geurkink B., van der Werf A., Eikelboom D.H., Beimfohr C., Snaidr J., Levantesi C. y Tandoi V. (2001). Molecular monitoring of bulking sludge in industrial wastewater treatment plants. *Proceedings del 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Session XVIII, pp. 425-433.

van Hamersveld E.H., van der Lans R.G.J.M. y Luyben K.C.A.M. (1997) Quantification of the brewer's yeast flocculation in a stirred tank: effect of physical parameters on flocculation. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 190-200.

Vanrolleghem P.A., Kong Z., Rombouts G. y Verstraete W. (1994) An on-line respirometric biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewaters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59, 321-333.

Wanner J. (1994) *Activated sludge bulking and foaming control*. Technomic Publishing Company, Inc., USA.

Wentzel M.C., Mbewe A. y Ekama G.A. (1995) Batch test for measurement of readily biodegradable COD and active organism concentrations in municipal wastewaters. *Water SA* 21, 117-124.

Wheeler M., Jenkins D. y Richard M.G. (1984) The use of a selector for bulking control at the Hamilton, Ohio, USA, water pollution control facility. *Water Sci. Technol.* 16, 35-39.

Wijbenga D.J., Meiberg J.B.M. y Brunt K. (1984) Wastewater purification in the potato starch industry. En: *Innovations in Biotechnology*. Houwink y van der Meer (Eds.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

Wiley R.C. (1994) *Minimally processed refrigerated fruits & vegetables*. Chapman & Hall, Inc. One Penn Plaza, New York.

Winkler M.A. (1996) *Tratamiento biológico de aguas de desecho*. Editorial Limusa, S. A. de C. V., México, D. F.

Williams S. (2000a) El agua es asunto de todos. *Fuentes* 121, 3.

Williams S. (2000b) Sueño con un planeta azul. *Fuentes* 121, 4-5.

World Resources (1996-1997). En Internet: http://www.wri.org/wri/index_spa.html

Wu Y.C., Hsieh N.H., Carey D.F. y Ou K.C. (1984) Control of activated sludge bulking. *J. Env. Eng. Div. Amer. Soc. Civil Eng.* 110, 472.

APENDICE I

Reordenando la Ec. (8.7) se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{f_{a1}}{f_{X1}} = \frac{Q}{f_{X1}(Q-1)+1} \quad (\text{AI.1})$$

Debido a que f_{X1} puede tomar valores entre 0 y 1, los valores que puede tomar cociente f_{a1}/f_{X1} estarán comprendidos entre Q y 1. Por lo tanto, f_{a1} será igual a f_{X1} para todo valor de f_{X1} solamente si $Q = 1$; para valores de $Q < 1$, $f_{a1} \leq f_{X1}$, mientras que si $Q > 1$, $f_{a1} \geq f_{X1}$. Adicionalmente, puede observarse en la Figura AI.1 que el valor de Q influye más en el cociente f_{a1}/f_{X1} para valores bajos de f_{X1} .

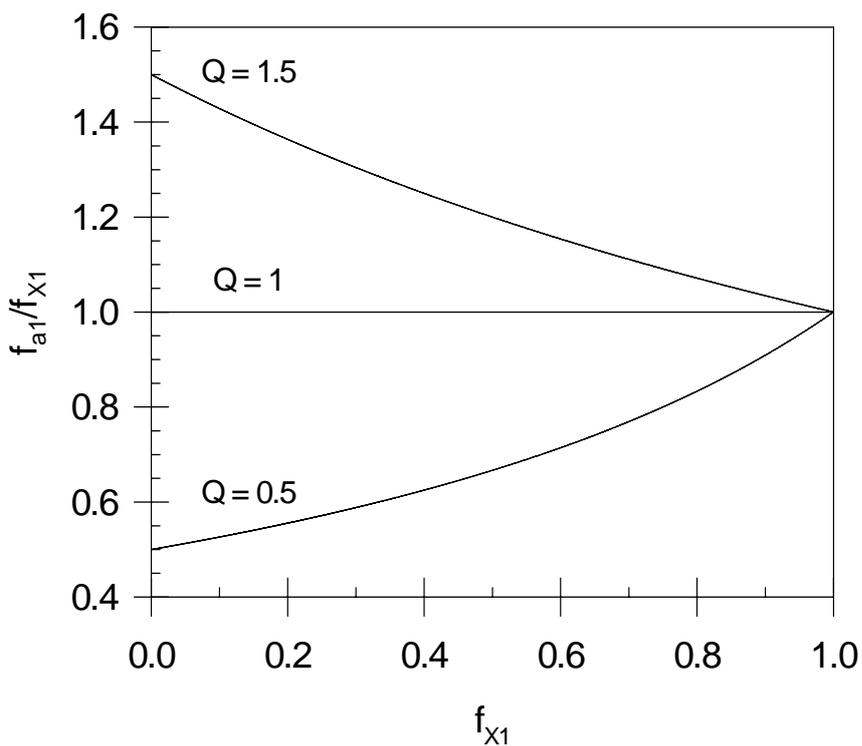


Figura AI.1. Variación del cociente f_{a1}/f_{X1} en función de f_{X1} para diferentes valores de Q . Las curvas fueron calculadas mediante la ecuación (AI.1)

Aplicando el método de propagación de errores a la Ec. (8.7) se puede obtener la expresión para el desvío estándar de la determinación de f_{X1} (σ_{X1}):

$$\sigma_{f_{X1}} = \sqrt{\left(\frac{Q \sigma_{fa1}}{Z^2}\right)^2 + \left(\frac{f_{a1}(f_{a1} - 1)\sigma_Q}{Z^2}\right)^2} \quad (A1.2)$$

donde: $Z = Q - f_{a1}(Q - 1)$, σ_{fa1} = desvío estándar de f_{a1} , σ_Q = desvío estándar de Q .

Mientras que los valores de $Q = 0.81$ y $\sigma_Q = 0.06$ son constantes determinadas previamente, los valores de f_{a1} y σ_{fa1} varían según la composición de la muestra analizada. Como puede verse en la Figura A1.2, el coeficiente de variación de las determinaciones experimentales de f_{a1} (CV_{fa1}) disminuyó en forma aproximadamente exponencial en función los valores de f_{a1} correspondientes.

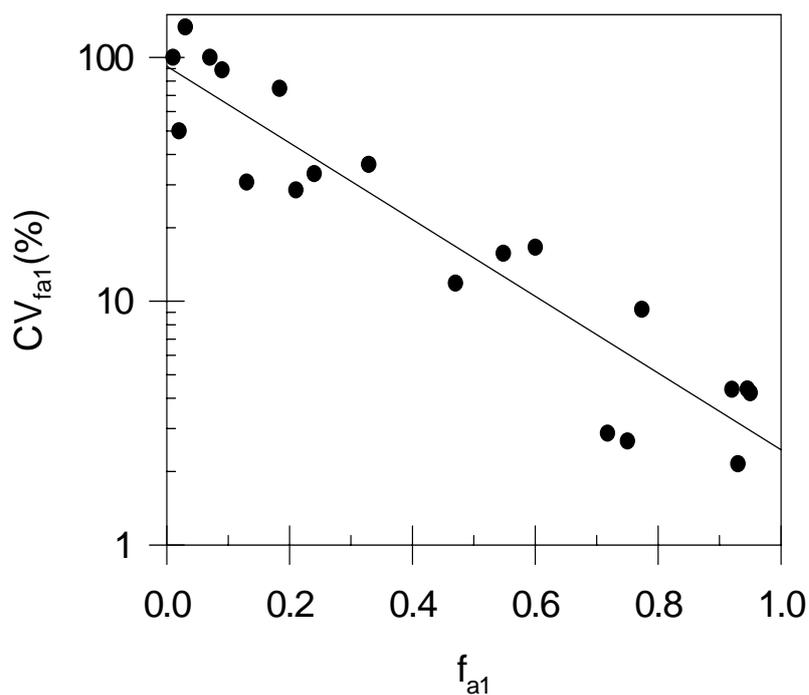


Figura A1.2. Efecto de f_{a1} en el valor de CV_{fa1}

La dependencia observada indica que σ_{fa1} debe responder aproximadamente a la siguiente ecuación:

$$\sigma_{fa1} = f_{a1} CV_O 10^{-k f_{a1}} \quad (\text{AI.3})$$

donde CV_O es el coeficiente de variación de f_{a1} cuando f_{a1} tiende a cero y k una constante empírica. La ecuación (AI.3) fue ajustada a los valores de σ_{fa1} mediante regresión no lineal, se obtuvieron los siguientes valores: $CV_O = 92.1\%$, $k = 1.57$.

En la Figura AI.3 se graficaron los valores de σ_{fx1} y σ_{fa1} calculados mediante las ecuaciones (AI.2) y (AI.3) respectivamente en función de f_{a1} . Como puede verse, el valor de σ_{fa1} es menor que σ_{fx1} para valores de f_{a1} menores que 0.55; sin embargo, para valores de f_{a1} mayores a 0.55, σ_{fa1} es mayor que σ_{fx1} . El primer término de la ecuación (AI.2) corresponde al error asociado a f_{a1} ; cuando f_{a1} tiende a 1, este término tiende a Q . σ_{fa1} para valores de $Q < 1$. El segundo término corresponde al error asociado a Q , toma su valor máximo para $f_{a1} = 0.5$ pero tiende a cero cuando f_{a1} tiende a 1. Finalmente, puede observarse que los valores de σ_{fx1} y σ_{fa1} son menores a 0.11 en todo el rango de valores de f_{a1} .

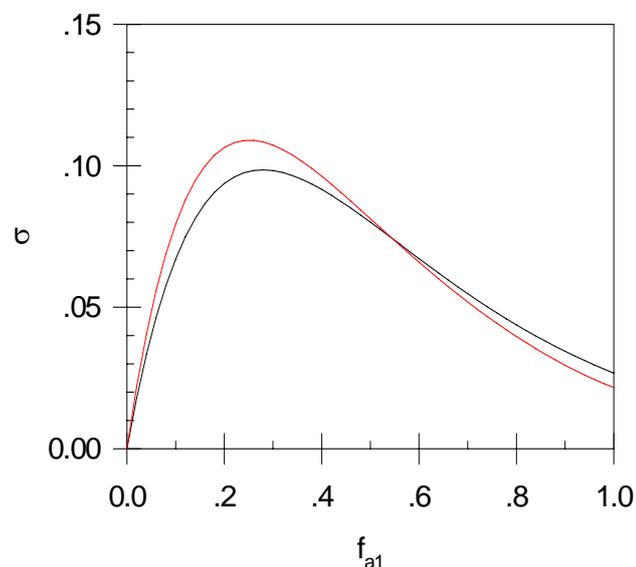


Figura AI.3. Efecto de f_{a1} en el valor de (—) σ_{fx1} y (—) σ_{fa1} calculados mediante las ecuaciones (AI.2) y (AI.3) respectivamente