

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

SEDIMENTABILIDAD DE UN LODO NITRIFICANTE EN DOS TIPOS DE REACTORES Y EN PRESENCIA DE MATERIA ORGANICA

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

Felipe Martínez Orta

Director

Jorge Gómez Hernández

Fecha (Julio/2003)

Con cariño para Asael Sandra y Silvia que siempre han estado en los momentos difíciles y compartiendo día a día sus sueños y alegrías

Agradezco:

A mis padres por darme la vida

A mis hermanos por el apoyo incondicional que siempre me han brindado

Con gratitud para:

Dr. Jorge Gómez Hernández,

Dr. Ernesto Favela Torres,

Dr. Andrés Hernández Arana,

Dra. Flor de María Cuervo López,

Dr. Frédéric Thalasso Siret,

Por la dirección, asesoría y revisión de este trabajo.

Mis Amigos:

Armando Peña y Flor de María Cuervo López, por su amistad incondicional en las buenas y en las malas (gracias)

Jaime Pérez, quien siempre me dió ánimos en los momentos difíciles

Frédéric, por su amistad y consejos.

A Juan Lema y Ramón Méndez, por el apoyo recibido durante mi estancia en España.

Con especial cariño a mis amigos en España que me ayudaron en mi aventura por esos lugares Beni, Juanis, Enrique Roca, Juan Garrido, Angeles, Oscar Otero, Luis, Anuska, Margarita, Ana Torrado, Ana Puñal y por los que en este momento no recuerdo.

Mis compañeros de laboratorio:

Alejandro Zepeda, Sandra Islas, Jesús Reyes, Sergio Martínez, Carmen Fajardo, Emir Martinez.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, convenio PFP-20-93.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Microbiana del departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa con apoyo de CONACyT con convenio 400200-5-33668-U.

La impresión de esta tesis se hizo gracias a la UAM que tiene destinada esta prestación para sus trabajadores.

Iztapalapa, D.F. a 29 de Julio de 2003

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó
la tesis

que presentó
Felipe Martínez Orta

Director: Jorge Gómez Hernández

Jurado:

Asesor: Ernesto Favela Torres, UAM- Iztapalapa

Asesor: Andrés Hernández Arana, UAM- Iztapalapa

Sinodal: Flor de María Cuervo López, UAM- Iztapalapa

Sinodal: Frédéric Thalasso Siret, CINVESTAV

INDICE	Página
Nomenclatura	1
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	7
Prólogo	11
1. Revisión bibliográfica	13
1.1 Tratamiento biológico de las aguas residuales	14
1.1.2 Eliminación de carbono	14
1.1.3 Desnitrificación	15
1.1.4 Nitrificación	16
1.1.4.1 Microorganismos nitrificantes	17
1.1.4.2 Bioquímica y cinética de la nitrificación	18
1.1.4.3 Efecto de la materia orgánica sobre la nitrificación	25
1.1.5 Reactores nitrificantes	26
1.1.5.1 Reactores de tanque agitado	26
1.1.5.2 Filtros percoladores	28
1.1.5.3 Discos rotatorios	30
1.1.5.4 Filtros sumergidos	31
1.1.5.5 Reactores de lecho fluidizado	32
1.1.5.6 Reactores airlift	33
1.1.5.7 Estado estacionario del cultivo nitrificante	35
1.1.5.8 Arreglo de los lodos nitrificantes	36
1.1.6 Constituyentes de los lodos nitrificantes	37
1.2 Estructuras que forman los lodos	40
1.2.1 Formación de los lodos	41
1.3 Factores que afectan la estabilidad y sedimentabilidad del lodo	46
1.4 Exopolímeros de los lodos nitrificantes	48
1.4.1. Proteínas exopoliméricas	48
1.4.2 Carbohidratos exopoliméricos	51
1.4.3 Lípidos exopoliméricos	54
1.4.4 Iones	55
1.4.5 Acido desoxirribonucleico exopolimérico	57
1.4.6 Otros exopolímeros presentes en los lodos	57
1.5 Relación entre los exopolímeros y la sedimentabilidad de los lodos	58
1.6 Diferentes métodos de extracción de los exopolímeros	59
1.7 Bibliografía	62
2 Materiales y métodos	72
2.1. Inóculo	74
2.2 Medio de cultivo	74
2.3 Metodología	75
2.3.1 Condiciones de operación de los reactores en continuo	75
2.3.2 Toma de la muestra	77

2.4	Métodos analíticos	77
2.4.1	Medición de amonio	77
2.4.1.1	Procedimiento	78
2.4.2.	Cuantificación de nitrito y nitrato	79
2.4.2.1	Procedimiento	
2.4.3.	Medición de los sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos fijos (SSF) y sólidos suspendidos volátiles (SSV)	80
2.4.4	Determinación del índice volumétrico del lodo (IVL)	81
2.5.	Extracción de los exopolímeros	82
2.4	Métodos para determinar exopolímeros	83
2.6.1	Método para medir proteínas	83
2.6.1.1	Procedimiento	83
2.6.2	Método para medir carbohidratos	84
2.6.2.1	Procedimiento	85
2.6.3	Determinación de lípidos	86
2.6.3.1	Procedimiento	86
2.7	Electroforesis en gel de poliacrilamida	87
2.7.1	Preparación del gel	87
2.7.2	Formación del gel	89
2.7.3	Preparación de la muestra	90
2.7.4	Electroforesis	90
2.7.5	Método de tinción y fijación del gel	90
2.7.6	Marcadores de peso molecular para proteínas	90
2.8	Conclusiones	91
2.9	Bibliografía.	92
3.	Sistemas nitrificantes	93
3.1	Resumen	94
3.2	Objetivo	95
3.3	Resultados y discusión	96
3.3.1	Reactor nitrificante de referencia (RNR)	96
3.3.2	Reactor nitrificante alimentado con acetato (RNA)	98
3.3.3	Comparando los reactores RNR y RNA	100
3.3.4	Reactor nitrificante con materia orgánica compleja (RNOC)	101
3.3.5	Comparación el RNOC y el RNR	102
3.3.6	Reactor nitrificante airlift nucleado a partir de basalto (RNAB)	102
3.3.7	Reactor nitrificante airlift nucleado a partir de flóculos (RNAF)	103
3.3.8	Comparación de los reactores RNAB y RNAF	103
3.4	Conclusiones	104
3.5	Bibliografía	106
4.	Estudio de los exopolímeros en un reactor nitrificante alimentado con medio litoautotrófico	107
4.1	Resumen	108
4.2	Objetivo	109

4.3 Resultados y discusión	110
4.3.1 Comportamiento de las sustancias exopoliméricas	110
4.3.1.1 Carbohidratos exopoliméricos y su relación con el IVL	110
4.3.1.2 Análisis de los lípidos exopoliméricos y su relación con el IVL	111
4.3.1.3 Análisis de las proteínas exopoliméricas y su relación con el IVL	112
4.3.1.4 Análisis electroforético de las proteínas exopoliméricas del lodo del reactor nitrificante	114
4.3.2 Adición de la proteína exopolimérica al reactor nitrificante	116
4.3.3 Análisis electroforesis de la adición de la proteína exopolimérica	118
4.4 Conclusiones	122
4.5 Bibliografía	124
5 Papel de las proteínas exopoliméricas en la sedimentabilidad de los flóculos y biopelículas nitrificantes	126
5.1 Resumen	127
5.2 Objetivo	128
5.3 Resultados y discusión	129
5.3.1 Papel de los exopolímeros (carbohidratos lípidos y proteínas) en la sedimentabilidad de los flóculos y la estabilidad de las biopelículas	129
5.3.2 Reactor airlift nucleado a partir de flóculos (RNAF)	131
5.4 Conclusiones	136
5.5 Bibliografía	138
6. Estudio de los exopolímeros en reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica	140
6.1 Resumen	141
6.2 Objetivo	142
6.3 Resultados y discusión	143
6.3.1 Exopolímeros en los reactores RNR, RNA y RNOC	143
6.3.2 Comparación de los reactores RNR, RNA y RNOC	145
6.4 Conclusiones	153
6.5 Bibliografía	154
7. Conclusiones generales y recomendaciones	157
8. Apéndices	159

NOMENCLATURA

ADNEP	Ácido desoxirribonucleico exopolimérico
CE	Carbohidratos exopoliméricos
CSTR	Reactores continuos de mezcla completa
D	Velocidad de dilución, (h^{-1})
DLVO	Teoría de Derjaguin, Landau, Verwey, y Oberbeek
E_C	Eficiencia en el consumo de $N-NH_4^+$, ($E_C = N-NH_4^+ \text{ consumido} / N-NH_4^+ \text{ alimentado} \times 100$)
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EGTA	Etilenglicol-bis (β -aminoetil eter)-N,N-ácido tetraacético
IVL	Índice volumétrico del lodo, (mL/g)
KDa	Kilo dalton
LE	Lípidos exopoliméricos
μ_{max} ,	Velocidad específica de crecimiento microbiano, (h^{-1})
PE	Proteínas exopoliméricas
$Q_{(e)}$	Velocidades de carga de salida, (g N/L*d)
$Q_{(i)}$	Velocidades de carga de entrada, (g N/L*d)
$r_{(p)}$	Velocidad de formación de $N-NO_3^-$, (g N/L*d)
$r_{(x)}$	Velocidad de formación N-proteína, (g N/L*d)
RNA	Reactor nitrificante alimentado con acetato
RNAB	Reactor nitrificante airlift nucleado a partir de basalto
RNAF	Reactor nitrificante airlift nucleado a partir de flóculos
RNOC	Reactor nitrificante alimentado con aguas complejas
RNR	Reactor nitrificante de referencia
SSF	Sólidos suspendidos fijos, (g/L)
SST	Sólidos suspendidos totales, (g/L)
SSV	Sólidos suspendidos volátiles, (g/L)
TRH	Tiempo de residencia hidráulica, (días)
Y_N	Rendimiento nitrificante, (mg $N-NO_3^-$ producido /mg $N-NH_4^+$ consumido)

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio en lodos floculares y de biopelícula, del efecto del tipo de reactor (tanque agitado y airlift) y del tipo de influente (medio litoautotrófico, medio litoautotrófico adicionado con acetato y un medio litoautotrófico adicionado con aguas complejas) sobre la concentración de los carbohidratos, lípidos y proteínas exopoliméricas de un lodo nitrificante y su relación con la sedimentabilidad del lodo. Para tal caso se trabajó con cinco reactores, tres de tanque agitado (reactor litoautotrófico: RNR, reactor con acetato: RNA y reactor con aguas complejas: RNOC) y dos airlift (nucleado con basalto: RNAB y nucleado con flóculos: RNAF). Los cinco fueron alimentados en continuo y llevados a régimen estacionario nitrificante.

El análisis de los carbohidratos, lípidos y proteínas exopoliméricas del RNR mostró que durante el tiempo de experimentación, los carbohidratos y lípidos exopoliméricos no presentaron una variación significativa en su concentración, a diferencia de las proteínas exopoliméricas (PE), que presentaron una variación del 93% y se les determinó un comportamiento de onda con máximos y mínimos de concentración (de 5 a 45 mg/L). El índice volumétrico del lodo (IVL) también presentó un comportamiento de onda. Se extrajo la PE de un punto con máxima concentración de ésta y se adicionó en el siguiente punto con un mínimo de concentración PE, observándose un aumento de sólo un 7.35% en el IVL. Estos resultados sugieren que la proteína soluble no tuvo efecto sobre el IVL.

El análisis y comparación de los exopolímeros de lodos de referencia con los lodos provenientes de los reactores airlift indicó que a pesar de la diferencia en la geometría de los reactores y en la forma de obtener la biopelícula, no hubo diferencia significativa (α 0.05) en la concentración de los exopolímeros. Sin embargo, en los reactores airlift el valor del IVL fue mayor que en el de referencia. El análisis electroforético de la PE mostró que en cada uno de los reactores tanto el número de bandas de PE encontradas (RNR, 18; RNAB, 16 y RNAF, 43) como sus pesos moleculares (RNR: 31 a 97kDa; RNAB: 13 a 44 kDa y RNAF: 14 a 222kDa) fueron diferentes. Se observó que a mayor peso molecular de las PE, hubo mayor IVL.

Por otro lado, se encontró que con respecto al RNR, no se presentaron cambios significativos en la concentración de los exopolímeros debidos a la adición de materia orgánica (α 0.05), aunque sí hubo diferencia significativa en los valores del IVL de los tres

reactores. De hecho, la adición de materia orgánica provocó un incremento en el IVL. La presencia de materia orgánica sí tuvo efecto sobre el número de bandas de PE (RNR, 16 ± 4 ; RNA, 22 ± 5 y RNOC, 18 ± 2), así como en sus pesos moleculares, puesto que en promedio en el RNR la mayoría de los pesos moleculares fueron menores que 60 kDa, mientras que en los RNA y RNOC, los pesos moleculares fueron en promedio mayores que 60 kDa. Estos resultados indican que la materia orgánica promueve la formación de PE de alto peso molecular.

Finalmente, en todos los casos se evidenció que el incremento en los valores del IVL estuvo más relacionado con el incremento en los pesos moleculares de las PE que con los cambios en la concentración de las mismas.

ABSTRACT

The influence of type of reactor (CSTR, completely stirred tank reactor and airlift) and type of influent (lithoautotrophic medium, lithoautotrophic medium plus acetate and lithoautotrophic medium plus complex wastewater) on exopolymeric substances produced by a nitrifying sludge (proteins, carbohydrates and lipids) as well as its relationship with sludge settleability was studied. The study was performed in five reactors: three CSTR (lithoautotrophic reference reactor: LRR; acetate reactor: AR and wastewater complex reactor: WCR) and two airlift reactors (nucleated with basalt: NBR and nucleated with flocks: NFR). All the reactors were continuously fed and remained in steady state nitrification.

It was found that along the experimentation in the LRR the exopolymeric lipid and carbohydrate concentration remained constant. In contrast, the exopolymeric protein (EP) concentration showed a high variation (93%) with a wave-like profile, where the maximum values reached 45 mg/L and the minimum reached 5 mg/L. The sludge volume index (SVI) also showed a wave-like profile. The EP was extracted from the sludge when a maximum EP concentration was observed and then this EP was added to the sludge when a minimum EP value was detected. This EP addition resulted in an SVI increase of only 7.35%. This result suggested that the EP added to the sludge might not have any effect on the SVI value.

The comparison among the LRR and the airlift reactors indicated that both the type of reactor and the origin of biofilm had no statistical effect ($\alpha = 0.05$) on the exopolymeric substances concentration. However, in the airlift reactors the SVI value was higher than the reference SVI value. The EP was electrophoretically analysed. It was observed that both the number of EP bands (LRR, 18; NBR, 16 and NFR, 43) and the molecular EP weight (LRR, 31-97 kDa; NBR, 13-44 kDa and NFR, 14-222 kDa) varied in each reactor. It was found that as the molecular EP weight increased the SVI value was also increased.

On the other hand, if compared to the LRR, no statistical effect ($\alpha = 0.05$) of the addition of organic matter to the nitrifying sludge on the exopolymeric substances concentration was observed but in the SVI values. In fact, the addition of organic matter provoked an increase in the SVI values. The presence of organic matter also had an effect on both the EP bands number (LRR, 16 ± 4 ; AR, 25 ± 5 and WCR, 18 ± 2) and the molecular EP weight. That is, in the LRR the average molecular weight was lower than 60 kDa, whereas in the AR and WCR most of the average molecular weights were higher than 60 kDa. These results indicated that the organic matter promoted the formation of EP with high molecular weight.

Finally along this work it was evidenced that the increase in the SVI values were more related to the EP with high molecular weight than the increase in the EP sludge concentration.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos químicos presentes en las aguas residuales, son en su mayoría, de tipo orgánico. Están formados principalmente por carbono y nitrógeno en sus diversas formas, además de azufre y fósforo. Una alta concentración de cualquiera de estos compuestos puede ser tóxica para los organismos vivos. Por tal motivo, se han desarrollado tecnologías capaces de transformar estos compuestos en otros menos tóxicos. El nitrógeno en forma de amonio, puede ser transformado a nitrato mediante la nitrificación.

En el tratamiento de aguas residuales, la estabilidad del lodo depurador resulta de suma importancia. En algunas ocasiones y por causas aun no comprendidas completamente, los lodos pierden su estabilidad y sedimentabilidad. Esto representa un problema grave, ya que formar un lodo ya sea flocular, granular o en biopelículas, es un proceso frecuentemente lento, mientras que la desestabilización estructural y fisiológica de los lodos, sólo requiere de unas horas. Se ha atribuido una participación importante en la estabilidad del lodo a las condiciones hidráulicas de los reactores, a su geometría y al tipo de microorganismos presentes. Algunas evidencias apuntan a las sustancias exopoliméricas, carbohidratos y proteínas, principalmente, como posibles responsables de estos cambios. Asimismo, se ha observado que en un lodo nitrificante, la presencia de materia orgánica soluble afecta no sólo la eficacia y velocidad del proceso, sino también su estabilidad estructural.

Hasta el momento, la información disponible se circunscribe a la aportación de datos sobre muestras de lodo puntuales que no fueron analizadas de manera sistemática o con respecto al tiempo. Resulta necesario entonces, aportar nuevas evidencias que indiquen qué o cuáles son los factores que más influyen en la estabilidad estructural de los lodos.

Introducción

Basándose en esto, el propósito del presente trabajo consiste en hacer una contribución acerca del papel que ejercen las proteínas, carbohidratos y lípidos exopoliméricos sobre la estructura de un lodo nitrificante en régimen estacionario.

Esta tesis está dividida en ocho capítulos. En cada uno de ellos se presenta un resumen de los resultados obtenidos, los objetivos propuestos, los resultados y su análisis y finalmente las conclusiones y referencias.

En el capítulo 1 se presenta una revisión bibliográfica detallada acerca del proceso nitrificante y de los factores que afectan la estabilidad y sedimentabilidad de los lodos.

En el Capítulo 2 se incluyen los materiales y métodos utilizados durante el trabajo experimental. Se describen las condiciones de operación de los reactores en continuo y se detallan las técnicas analíticas.

En el Capítulo 3 se muestran los resultados que indican que tomando como variables de respuesta a la velocidad, la eficiencia y el rendimiento, los lodos de los cinco reactores alimentados en continuo alcanzaron el régimen estacionario nitrificante.

En el Capítulo 4 se presenta el análisis de las proteínas, carbohidratos y lípidos exopoliméricos presentes en un lodo nitrificante alimentado con un medio litoautotrófico y su relación con la sedimentabilidad del lodo. Se incluye también un análisis del efecto de la adición de proteínas exopoliméricas sobre la sedimentabilidad del lodo.

En el Capítulo 5 se analizan y comparan las proteínas, carbohidratos y lípidos exopoliméricos presentes en los lodos nitrificante provenientes de flóculos y de biopelículas.

En el Capítulo 6 se analiza el efecto de la adición de la materia orgánica sobre la proteína exopolimérica de los lodos floculares y su posible relación con la sedimentabilidad.

En el Capítulo 7 se indican las conclusiones generales de este trabajo.

Introducción

Finalmente, el último capítulo corresponde a los apéndices, en donde se incluyen los análisis estadísticos y las publicaciones relacionadas con esta tesis.

PRÓLOGO

Los primeros asentamientos humanos se construyeron a las orillas de ríos y lagos. Durante mucho tiempo, el hombre produjo desechos producto de los materiales que utilizaba, que luego eran vertidos a los ríos, lagos y mares. El hombre desconocía el impacto de los desechos que producía sobre el ambiente, puesto que la naturaleza llevaba a cabo el proceso de eliminación de los desechos producidos por el hombre. Sin embargo, en el siglo XIX con el comienzo de la industrialización la población se aglomeró y las ciudades crecieron, los habitantes de las ciudades demandaron una mayor cantidad de satisfactores, produciendo una mayor cantidad de contaminantes, éstos se acumularon y pusieron en riesgo a los diversos ecosistemas, de los cuales el hombre se proveía de materia prima.

Uno de los recursos naturales que el hombre empleó en forma irracional fue el agua, adicionándole cantidades considerables de materia orgánica, compuesto que en altas concentraciones suele ser nocivo para los organismos vivos. Este tipo de aguas fue vertida a los ríos y mares rompiendo el equilibrio de los diversos ecosistemas, volviéndose en la actualidad un problema serio, aún sin resolver.

En años recientes, la industria ha generado nuevos productos y por consiguiente nuevos contaminantes, como los plásticos, los cuales tienen un uso muy extendido y que son poco susceptibles de descomposición por vías biológicas. Otro tipo de compuestos que ha evolucionado, son los pesticidas y herbicidas de última generación, como los organofosforados que son altamente tóxicos para los organismos vivos. Otros ejemplos de notables fuentes de contaminación, son la industria papelera y petrolera que en sus procesos utilizan enormes cantidades de agua, contaminándola con compuestos químicos muy poco biodegradables. Este tipo de compuestos impacta de manera negativamente a los ecosistemas, ya que son difíciles de degradar por métodos biológicos, siendo confinados a

Prologo

grandes extensiones del subsuelo. Lo anterior ha obligado a muchos países a formular leyes, en donde se limita las cantidades de desperdicios que se pueden verter a los cuerpos de agua, suelos y atmósfera, generados por las industrias y las grandes ciudades, con la finalidad de disminuir su efecto sobre los ecosistemas.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los compuestos químicos presentes en las aguas residuales, son en su mayoría, de tipo orgánico y están formados principalmente por carbono y nitrógeno, además del azufre y fósforo, en donde a altas concentraciones cualquiera de estos compuestos puede ser tóxico para los organismos vivos. El carbono y el nitrógeno representan el porcentaje más alto de los compuestos que producen la industria y las ciudades, siendo en consecuencia los más abundantes en las aguas residuales.

Dependiendo del tipo de compuesto, su eliminación será más o menos complicada. El fósforo y el azufre se encuentran en menor concentración en la materia orgánica y por consiguiente en las aguas residuales, pero no dejan de ser un problema de contaminación. Por tal motivo, se han desarrollado tecnologías capaces de transformar estos compuestos, en otros que sean menos tóxicos para los organismos vivos.

En México, la contaminación del agua sigue siendo un problema serio, ya que se producen alrededor de $232 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales, en donde sólo se trata $47 \text{ m}^3/\text{s}$ que corresponde sólo al 12%. La fracción de aguas residuales urbanas que se depura, se lleva a cabo por 946 plantas de tratamiento de aguas residuales. Por otra parte, la industria que es la principal fuente de contaminantes nitrogenados, produce $168 \text{ m}^3/\text{s}$ de aguas residuales, en donde 282 plantas tratan el 12% del total del agua residual producida por la industria (Monroy y col., 2000). Del total de plantas de tratamiento de aguas residuales, el 21% no llevan a cabo una eficiente eliminación. Por tal motivo, del 12% del agua residual tratada inicialmente, podría disminuir. Las aguas residuales que no reciben tratamiento alguno (88%) son descargadas

directamente a los ríos, siendo un problema serio para la salud de la población, además de contribuir al deterioro de los ecosistemas.

Se han realizado diversos estudios para optimizar los procesos de depuración de las aguas residuales y de esta manera disminuir su efecto sobre el ambiente. El enfoque ha sido en dos vertientes, el método biológico y los métodos fisico-químicos. El método biológico ha sido el más desarrollado debido a su bajo costo y versatilidad en la eliminación de la materia orgánica y el nitrógeno. Se cuenta con varios procesos biológicos para eliminar el carbono de las aguas residuales, uno de ellos es la metanogénesis, este proceso se lleva en varias etapas y por varios microorganismos. Para la transformación del nitrógeno se cuenta con la nitrificación y la desnitrificación, que en su conjunto permiten la transformación del amonio hasta nitrógeno molecular.

1.1 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LAS AGUAS RESIDUALES

1.1.2 ELIMINACIÓN DE CARBONO

Los primeros trabajos para la eliminación del carbono orgánico, fueron llevados a cabo por Volta (1776), pero no fue hasta el siglo XX cuando se empezó su estudio, que hasta el momento sigue planteando nuevas interrogantes. Uno de los procesos para degradar la materia orgánica es la metanogénesis, la cual se lleva a cabo por medio de microorganismos en condiciones de anaerobiosis, que conllevan a la obtención de metano y gas carbónico (Guyot y Ramirez, 1989), aunque también existen microorganismos capaces de utilizar hidrógeno y gas carbónico para la formación de metano (Zehnder y col, 1980). En general, las bacterias metanogénicas utilizan substratos orgánicos simples como el ácido acético, pero pueden utilizar una gran variedad de substratos como los lignocelulósicos, para la formación del metano. La metanogénesis se lleva a cabo en varias

Revisión bibliográfica

fases, el primer paso es la hidrólisis de los compuestos complejos, seguido por la acidogénesis, el tercer paso es la acetogénesis y finalmente metanogénesis, en donde el producto final es el metano (Guyot, 1992).

Las bacterias que llevan a cabo este tipo de procesos, se desarrollan a una temperatura de 30 a 50°C siendo microorganismos mesofílicos. El pH en el cual se lleva de manera eficiente este proceso está situado entre 6.5 y 8.0 (García, 1982; Guyot, 1992), en donde cambios en las condiciones ambientales como el pH y la temperatura, pueden modificar el proceso metanogénico. Las bacterias metanogénicas por lo general se agrupan para formar estructuras como los gránulos, biopelículas y flóculos, que facilitan el proceso de eliminación del carbono orgánico.

Después de haber eliminado el carbono de las aguas residuales por métodos biológicos, el segundo paso es eliminar el nitrógeno. Esto se lleva a cabo en dos pasos, el primero de tipo aerobio y por medio de microorganismos nitrificantes (nitrificación) y el segundo paso de tipo anaerobio, la desnitrificación. En el primer paso el amonio es oxidado a nitrito y luego a nitrato, y el segundo paso el nitrato es reducido a nitrógeno molecular.

1.1.3 DESNITRIFICACIÓN

Para la desnitrificación se pueden utilizar una gran variedad de donadores de electrones para reducir al nitrato (Dahab, 1988). La desnitrificación se puede llevar a cabo por microorganismos quimiolitótrofos y quimiorganotótrofos. Estos microorganismos son generalmente anaerobios facultativos (Cole y Brown., 1980), entre los que se encuentra a *Pseudomonas sp*, *Clostridium sp* o *Xantomonas sp*, entre otros. El pH en el que se puede realizar el proceso desnitrificante puede ir de 6.0 a 9.0, y una temperatura de 30 y 40°C en donde el control adecuado de estos factores ambientales puede influir en la eficiencia del

proceso (Grant y col., 1984; Perez, 1998). Los microorganismos desnitrificantes pueden agruparse para formar consorcios, para favorecer la transformación de nitrato a nitrógeno molecular.

1.1.4 NITRIFICACIÓN

La nitrificación se lleva a cabo en la tierra de forma natural desde hace miles de años, pero su estudio sólo tiene un centenar de años. Los organismos al morir son degradados por microorganismos hasta sus compuestos fundamentales como aminoácidos y ácidos nucleicos, entre otros. Estos, a su vez, pueden liberar compuestos como el amonio, proceso que recibe el nombre de mineralización. El nitrógeno liberado en forma de amonio, es incorporado al ciclo terrestre del nitrógeno (Figura 1).

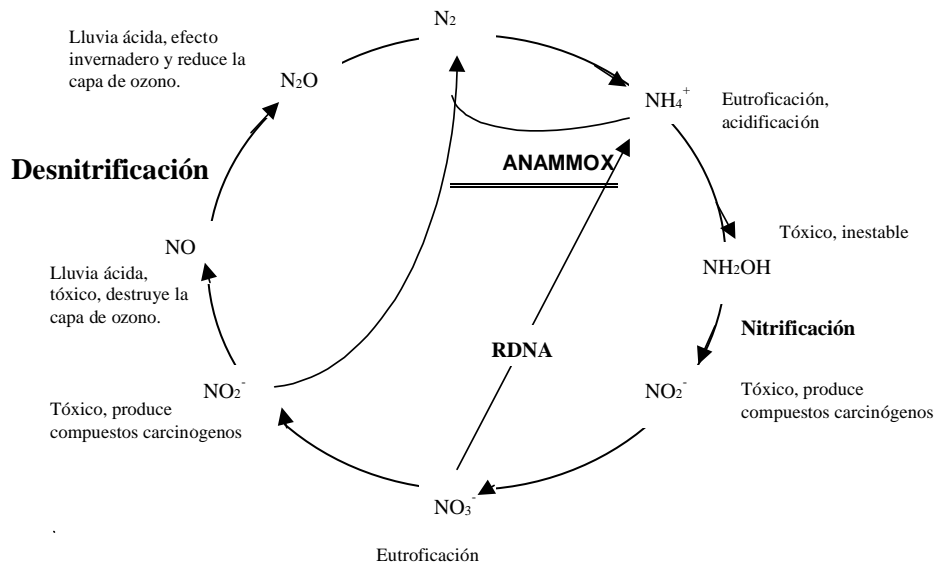


Figura 1. Ciclo global del nitrógeno, los procesos que se llevan a cabo y los problemas que ocasionan estos Compuestos (Scheible y Heidman, 1994).

Revisión bibliográfica

El ciclo del nitrógeno es importante, ya que éste puede mantener una eficiente recirculación del nitrógeno en la naturaleza, transformándolo a nitrógeno atmosférico por medio de la nitrificación y desnitrificación y nuevamente fijado por microorganismos como los *Rizobium* y reintegrado el nitrógeno al ciclo. El ciclo terrestre del nitrógeno, en alguna de sus etapas no es lo suficientemente rápido para transformar el amonio, ya que se pueden alcanzar concentraciones muy altas, como es el caso de algunos suelos donde se han podido determinar concentraciones de hasta 50 g de N-NH_4^+ /Kg de suelo trayendo como consecuencia cambios en el pH del suelo, y la erosión de los suelos (Prosser, 1989). En ecosistemas acuosos se pueden alcanzar concentraciones de 1 g/L N-NH_4^+ causando problemas de eutroficación en estos ríos, ocasionando la muerte de los peces por asfixia (Bock y col., 1986; Prosser, 1989). Por lo tanto, es importante aumentar la velocidad de las etapas limitantes del ciclo del nitrógeno como la nitrificación y desnitrificación, para ayudar a la naturaleza a transformar el amonio y disminuir su impacto del amonio en los ecosistemas.

1.1.4.1 MICROORGANISMOS NITRIFICANTES.

Los microorganismos que llevan a cabo la nitrificación, están agrupados en la familia Nitrobacteriáceae (Wood, 1986). Este grupo de microorganismos presentan características fisiológicas similares, aunque recientemente y debido al estudio de sus características genéticas, no existe la certeza de que en un futuro los microorganismos nitrificantes sigan perteneciendo a la familia Nitrobacteriáceae. Las bacterias nitrificantes son polimórficas, Gram negativas, litoautótrofas, que llevan a cabo la nitrificación de manera adecuada a temperaturas entre 25 a 30°C, y a valores de pH entre 7.5 y 8.0 (Bock y col., 1986).

Revisión bibliográfica

Las bacterias nitrificantes se pueden dividir en dos grupos. En un primer grupo se encuentran las bacterias amonio oxidantes, que oxidan el amonio a nitrito. Estas bacterias cuentan con cinco géneros, los cuales son: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, y *Nitrosovibrio*. El género y especie más comúnmente aislado en los lodos nitrificantes es *Nitrosomonas europaea* (Bock y col., 1991). Sin embargo, cabe señalar que en los diferentes trabajos citados en la literatura, no se lleva a cabo una identificación adecuada de los microorganismos presentes en el proceso nitrificante, por lo que no es conveniente afirmar que en el proceso amoniooxidante sea *Nitrosomonas europaea* el único género responsable de la oxidación del amonio a nitrito.

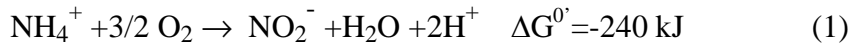
El segundo grupo está constituido por las bacterias nitrito oxidantes que llevan a cabo la oxidación de nitrito a nitrato. En este grupo de bacterias se pueden encontrar cuatro géneros: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitospira* y *Nitrospina*, en donde el género más frecuentemente aislado es *Nitrobacter* (Watson y col., 1989).

1.1.4.2 BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE LA NITRIFICACIÓN

La nitrificación es un proceso en donde la eficiencia en la transformación de amonio a nitrato está determinado por la concentración de oxígeno, el pH y cambios en la temperatura. La amonio oxidación se lleva a cabo en dos pasos enzimáticos, la primera es la conversión de amonio a hidroxilamina por la enzima amonio mono-oxigenasa. En la segunda parte de la reacción, la hidroxilamina es oxidada a nitrito por la enzima hidroxilamina óxido-reductasa. Las dos reacciones en conjunto tienen un ΔG^0 -240 kJ/mol (Hooper y col., 1997), reacción 1. Puede pronosticarse, dado el cambio de ΔG^0 , que la velocidad de crecimiento de la microflora amonio-oxidante será, siempre, muy baja.

Revisión bibliográfica

La reacción de amonio oxidación puede ser inhibida por diferentes compuestos entre los que se encuentra el mismo sustrato (amonio). Concentraciones de amonio entre 10 y 150 mg/L pueden inhibir la amonio oxidación. Los valores de concentración inhibitorios dependen de factores ambientales como la temperatura, pH y oxígeno, ya que valores de 100mg/L N-NH₄⁺ y un pH de 9 inhibe la velocidad de la amonio oxidación casi por completo. Por lo que aun hoy en día se sigue estudiando como puede afectar o favorecer estos factores ambientales a la nitrificación (Anthonisen, y col., 1976; Tanaca y col., 1991).



En la Figura 2 se observa cómo el amonio es óxidado a nitrito, en donde los citocromos c-552, citocromo a y la ubiquinona son importantes en el flujo de electrones a través de la membrana citoplasmica, para la obtención de energía. El flujo de electrones fue propuesto por Wood (1986) y para *Nitrosomonas sp.*

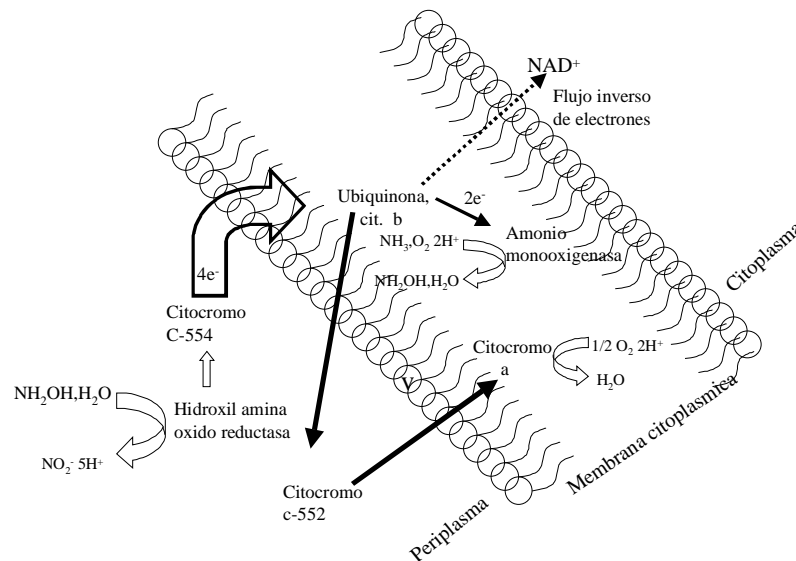


Figura 2. Esquema del transporte de electrones para la obtención de energía, del género *Nitrosomonas sp.* (Wood, 1986).

Revisión bibliográfica

Por otro lado, se ha mencionado la formación de óxido nitroso durante la nitrificación. Esto parece estar relacionado con la presencia de la enzima nitrito reductasa con cobre (CuNIR), que también tiene la capacidad de producir óxido nitroso a partir de nitrito y utilizando la hidroxilamina como fuente reductora (Jackson y col., 1991). De hecho, se ha encontrado que la bacteria nitrificante *Nitrosomonas europaea* cuenta con la CuNIR (Miller y Wood, 1983). El óxido nitroso a su vez, es uno de los agentes causantes del efecto invernadero y puede dar origen a carcinomas en los seres humanos (Lees, 1952; Schlegel, 1988).

En la segunda etapa el nitrito es oxidado a nitrato, esta reacción es catalizada por la enzima nitrito óxido reductasa, presentando un $\Delta G^{0'}$ de -65 kJ/mol (Bock y col., 1986), reacción 2. El cambio de $\Delta G^{0'}$ es menor aquí, que en la amonio oxidación, en consecuencia, el crecimiento microbiano será aún más bajo. La nitrito oxidación podría ser el cuello de botella de la nitrificación. Al igual que en la reacción de amonio oxidación, los factores ambientales y la concentración de oxígeno son determinantes para que la reacción de nitrito oxidación se lleve de manera eficiente. Por ejemplo, en este paso de la reacción, la concentración de oxígeno disuelto es determinante ya que valores por debajo de 0.25 mg/L y valores de pH menores que 5 disminuyen la velocidad de consumo del nitrito. Al acumularse el nitrito en concentraciones 0.22 y 2.8 g/L se inhibe el consumo de nitrito de los microorganismos nitrito oxidantes (Anthonisen, y col., 1976). Hasta el momento se sigue estudiando la manera de cómo optimizar el proceso nitrificante.



Revisión bibliográfica

En la Figura 3.1 se muestra un esquema de la reacción de oxidación de nitrito a nitrato, así como los citocromos implicados en el flujo de electrones a través de la membrana, para la obtención de energía en forma de ATP.

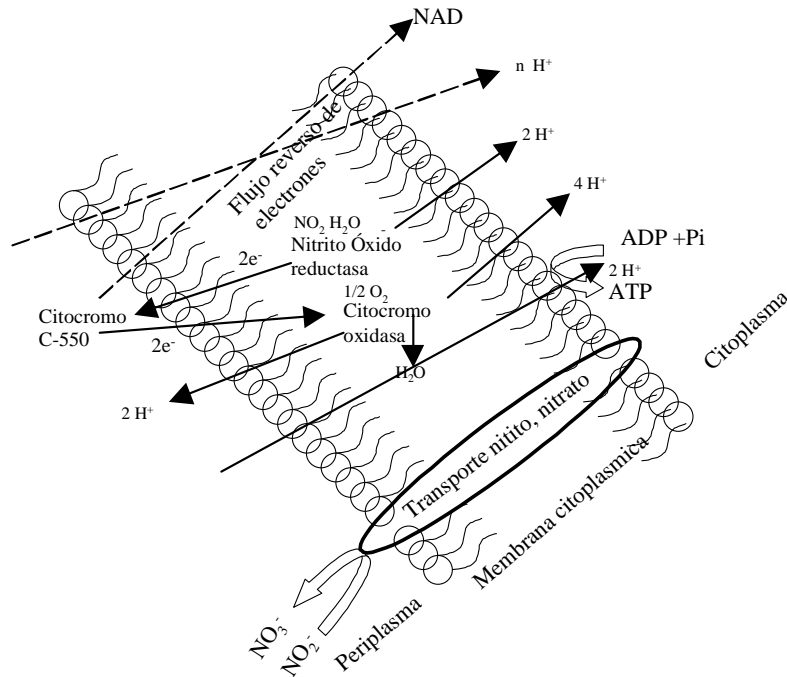


Figura 1.3 Esquema de la reacción de nitrito a nitrato y transporte de electrones para la obtención de energía del género *Nitrobacter* (Wood, 1986).

Si se revisa la energía que se genera de las dos reacciones de oxidación del amonio a nitrato, se observa que la obtención de energía de todo el proceso nitrificante es muy baja, en donde el 80% de la energía generada es utilizada para la fijación del CO_2 (Proser, 1989), por la vía del ciclo de Calvin y la restante puede ser liberada en forma de calor por los microorganismos nitrificantes. Es evidente, entonces, que uno de los factores que limita el proceso, es la baja producción de biomasa.

Los estudios realizados sobre la cinética de la nitrificación han mostrado que la formación de biomoléculas y el crecimiento de los microorganismos es muy lenta y depende del

Revisión bibliográfica

sustrato disponible y su velocidad de transformación para la obtención de energía. La formación de la biomasa en un cultivo cerrado esta dada por la reacción $r_x = dx/dt$ (mg/L*d) pudiéndose relacionar con la velocidad de eliminación de sustrato dS/dt (mg/L*d) mediante la ecuación 1.

$$r_x = \frac{dX}{dt} = Y_{x/s} \bullet \frac{dS}{dt} \quad [1]$$

Donde

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [2]$$

Siendo $Y_{x/s}$ la productividad o coeficiente de rendimiento celular, que indica la biomasa producida por sustrato consumido, en donde como ya se mencionó, diferentes factores ambientales pueden influir en el rendimiento celular, como la temperatura el pH, la concentración de sustrato, entre otros.

Para la nitrificación, son de particular interés las velocidades específicas de crecimiento y de eliminación de sustrato que se obtienen a partir de la ecuación [1] por la concentración de los microorganismos, obteniéndose la ecuación [3].

$$\frac{1}{X} \bullet \frac{dX}{dt} = Y_{x/s} \bullet \frac{dS}{dt} \bullet \frac{1}{X} \quad [3]$$

Donde el primer miembro de la ecuación [3] representa la tasa neta de la velocidad de crecimiento o velocidad específica de crecimiento, generalmente conocida como μ (tiempo⁻¹).

$$\frac{1}{X} \bullet \frac{dX}{dt} = \mu \quad [4]$$

En donde μ también se puede expresar mediante la siguiente ecuación [5].

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad [5]$$

Con la ecuación [6] se define q_s , velocidad específica de utilización de sustrato. La velocidad de consumo de sustrato (r_s), queda relacionada con la actividad (q) mediante la ecuación [7].

$$\frac{1}{X} \bullet \frac{dS}{dt} = q_s \quad [6]$$

$$r_s = \frac{dS}{dt} = q_s X \quad [7]$$

Al relacionar las ecuaciones [1], [5] y [7] se obtiene la siguiente expresión simplificada

$$\mu = Y_{x/s} q_s \quad [8]$$

Se asumen que el rendimiento $Y_{x/s}$ es constante en cultivos puros en donde se utiliza un sólo sustrato, en fase logarítmica de crecimiento. En otros medios como las aguas residuales en donde se tiene una gran variedad de microorganismos no están en fase logarítmica de crecimiento, o una fracción de los microorganismos se encuentran en la fase estacionaria o de muerte. En consecuencia $Y_{x/s} q_s$ debe ser corregida debido a los microorganismos que mueren. La corrección proporcionará el rendimiento celular, el cual será menor al obtenido en la ecuación [8].

$$\mu = Y_{x/s} q_s - k_d \quad [9]$$

Donde k_d es el coeficiente de muerte celular.

Monod mostró empíricamente que la velocidad de crecimiento depende de la concentración del sustrato de acuerdo con la ecuación [10]

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \bullet S}{k_s + S} - k_d \quad [10]$$

Revisión bibliográfica

En este caso μ_{\max} es el máximo valor de μ y K_s es la constante de saturación (o concentración de sustrato) a la cual μ es igual a $\mu_{\max}/2$.

Por otra parte q_s puede expresarse como una ecuación de Monod (ecuaciones [11] y [12]).

$$q_s = q_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad [11]$$

$$q_{\max} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{x/s}} \quad [12]$$

En el tratamiento de aguas residuales, el inverso de μ es el tiempo de retención celular (θ_c).

$$\mu = \frac{1}{\theta_c} \quad [13]$$

en donde

$$\frac{1}{\theta_c} = Yq - k_d \quad [14]$$

Aplicando la velocidad específica de crecimiento en sistemas con dos sustratos limitantes (amonio y oxígeno) como es el caso de los microorganismos nitrificantes se suele expresar de la siguiente manera.

$$\mu_{NH_4^+} = \mu_{\max NH_4^+} \cdot \frac{NH_4^+ - N}{K_s + [NH_4^+ - N]} \cdot \frac{OD}{K_o + OD}$$

Donde:

$\mu_{NH_4^+}$: es la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos amonio-oxidantes

$\mu_{\max \text{ NH}_4^+}$: es la velocidad máxima de crecimiento de microorganismos amonio-oxidantes

Ks: constante de saturación de amonio

Ko: constante de saturación de oxígeno

OD: concentración de oxígeno disuelto

Al aplicar los conceptos anteriores, se ha determinado bajo condiciones experimentales que las velocidades máximas de crecimiento en un cultivo de *Nitrosomona* y *Nitrobacter* puede ser de entre 0.6 a 0.8 (d^{-1}) y de 0.6 a 1.0 (d^{-1}), respectivamente (Wood, 1986; Henze y col., 1996). Estos valores comparados con los obtenidos de los microorganismos desnitrificantes, que oscilan entre 3 y 10 d^{-1} (Henze y col., 1996). En cualquier caso, los valores de velocidad específica dependerán de las condiciones de cultivo y, eventualmente, pueden llegar a ser más bajos.

1.1.4.3 EFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LA NITRIFICACIÓN

Existen propuestas para la eliminación de sustancias que se encuentran disueltas en el agua y que contienen carbono y nitrógeno, en donde se propone un sistema de dos reactores en línea, en el primer sistema se lleva de manera eficiente la eliminación de carbono y en el segundo sistema la nitrificación. La nitrificación es un proceso sensible a la presencia de compuestos orgánicos, como los ácidos grasos volátiles. Cuando no se tiene una alta eficiencia en la eliminación de carbono, éstos pueden pasar al reactor nitrificante e inhibir gradualmente el proceso respiratorio nitrificante. En la década de los 80, se estudió el efecto de la materia orgánica sobre el proceso nitrificante, proponiéndose dos posturas. Una en la que se dice que la materia orgánica favorece el crecimiento de microorganismos heterotróficos (Michael y col 1985; Daigger y col., 1985), encontrando alrededor de 20 géneros de bacterias filamentosas heterotróficas, sugiriendo que estos microorganismos

afectan negativamente la nitrificación. La presencia de la materia orgánica ocasiona la disminución en la eficiencia nitrificante al desviar el proceso respiratorio hacia uno asimilativo. La otra postura propone un efecto directo de la materia orgánica sobre las enzimas nitrificantes, Eilersen y col., (1994); Takai y col., (1997) observan que al adicionar ácidos grasos volátiles al proceso nitrificante, se acumulaba nitrito. La concentración del nitrito acumulado, varió dependiendo de la concentración de la materia orgánica alimentada. Estos resultados sugieren que la materia orgánica tiene efecto sobre las enzimas nitrificantes, pero faltan más evidencias para esclarecer el efecto de la materia orgánica sobre la nitrificación.

1.1.5 REACTORES NITRIFICANTES

Los reactores pueden tener diferentes geometrías. Los reactores nitrificantes están diseñados de tal manera que tengan una buena homogenización de los sustratos y una solubilización eficaz del oxígeno, para tener procesos eficientes. A continuación se dan las características de algunos reactores nitrificantes.

1.1.5.1 REACTORES DE TANQUE AGITADO

Uno de los reactores que tradicionalmente se han usado en el proceso nitrificante, es el de tanque agitado. Este tipo de reactores pueden operar de tres diferentes formas, en forma discontinua, discontinua alimentada (fed-batch) y continua. En la forma discontinua y discontinua alimentada no se puede hablar de operación en estado estacionario, no así en los reactores en continuo en los que sí se puede presentar el estado estacionario del cultivo, esto es, cuando la velocidad de formación o consumo de los componentes del cultivo son constantes. Los reactores de tanque agitado son equipos cilíndricos con un sistema de

Revisión bibliográfica

homogeneización, de tipo mecánico, que garantiza que la composición sea la misma en cualquier punto del reactor. Los reactores de tanque agitado, alimentados en continuo, algunos conocidos como reactores continuos de mezcla completa (CSTR, por sus siglas en inglés), cuando se presenta un volumen de operación constante debido a que los caudales de alimentación y de salida son iguales. En los quimiostatos la velocidad específica de crecimiento microbiano (μ_{\max} , h^{-1}) es igual a la velocidad de dilución (D , h^{-1}), lo que no permite la acumular altas concentraciones de biomasa en el reactor. Los microorganismos nitrificantes presentan tiempos de generación grandes (de 24 horas o más), por tal motivo en un CSTR donde se lleve a cabo el proceso nitrificante, se debe cuidar los caudales de alimentación a fin de evitar el lavado de la biomasa del reactor. Esta desventaja se puede disminuir al implementar la recirculación celular por medio de un decantador, lo que permite aumentar la concentración de las células en el reactor y la posibilidad de operar a velocidades de dilución mayores. Así pues, considerando un reactor nitrificante de tanque agitado con recirculación y un tiempo de residencia hidráulica de 24 horas, se pueden tratar aguas residuales con hasta 3 g/L de amonio. Sin embargo, a pesar de la recirculación, no se pueden emplear caudales tan altos como en los reactores en la que los microorganismos están adheridos a un soporte.

Una variante del reactor de tanque agitado, es el tipo Husmann (Rudling y Solyon 1974), el cual consta de un impulsor de agitación radial, para mantener una buena homogeneización, un serpentín para controlar la temperatura y un pequeño compresor para el suministro de aire. Cuentan con un sedimentador para concentrar y recircular la biomasa por lo cual es posible tratar aguas residuales con altas concentraciones de amonio, con TRH de 24 horas o más. Debido a lo antes expuesto, el reactor Husmann fue seleccionado, ya que favorece la agregación de microorganismo para formar flóculos. En la Figura 3.1 se

presenta el diagrama de las partes que constituyen un reactor tipo Husmann. Puede verse que su configuración es sencilla, lo que hizo que las tareas de mantenimiento y operación fueran simples. El reactor cuenta con dos líneas de aireación, una para el proceso nitrificante y otra para la recirculación de la biomasa, lo cual se hizo desde la base del decantador al reactor.

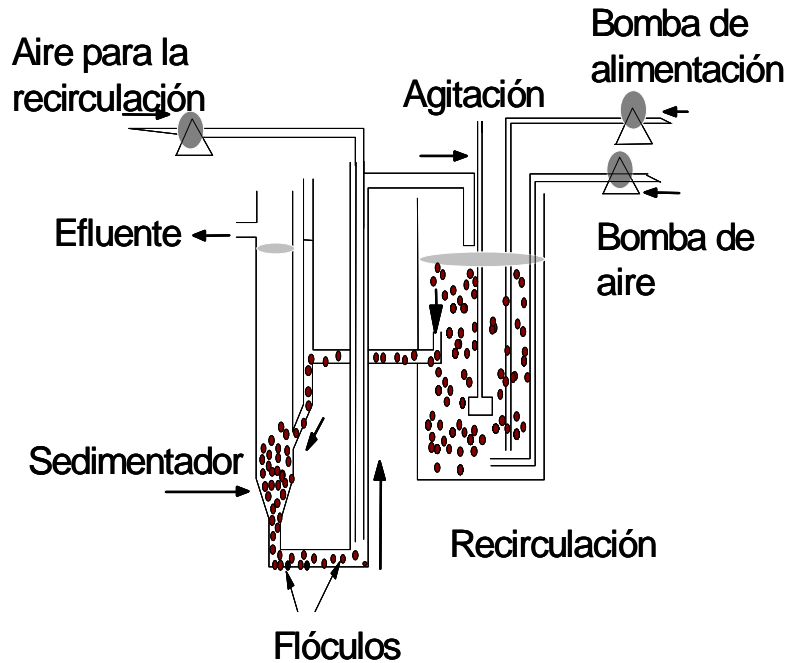


Figura 3.1 Reactor de tanque agitado tipo Husmann, con recirculación de biomasa

1.1.5.2 FILTROS PERCOLADORES

Debido a la simplicidad en su manejo, uno de los sistemas más usados para el tratamiento de aguas residuales y particularmente en la nitrificación, son los filtros percoladores (trickling filter). En estos reactores la biomasa se adhiere a un soporte formando una capa delgada de células (biopelícula). La formación de la biopelícula nitrificante del reactor de filtro percolador depende de varios factores, entre los que se puede destacar el tiempo de

Revisión bibliográfica

generación de los microorganismos y el tipo de soporte utilizado (Lazarova y Manem, 1995). Una vez formada la biopelícula, se pueden alcanzar velocidades de carga muy altas, debido a que se puede trabajar con TRH cortos, tal como lo indican las siguientes ecuación.

$$Q_s = F \cdot C / V_L \quad \text{ecuación 1}$$

$$F / V_L = D = 1 / \text{TRH} \quad \text{ecuación 2}$$

$$Q_s = C / \text{TRH} \quad \text{ecuación 3}$$

Donde

F = caudal de entrada (volumen/tiempo)

C = concentración del sustrato de entrada

V_L = volumen del líquido en el reactor

D = velocidad de dilución

Aunque estos reactores tienen bajos costos de inversión, presentan algunas desventajas, como son: escasos en el área activa y la estabilidad de la biopelícula, la cual depende de factores ambientales como el pH, temperatura, concentración de nutrientes, entre otros. La estabilidad de la biopelícula también puede depender de la concentración de sus componentes exopoliméricos, necesidad de áreas muy grandes para su construcción y baja eficiencia con efluentes con alto contenido de amonio (Lazarova y Manem, 1995). Este tipo de bioreactores frecuentemente genera malos olores.

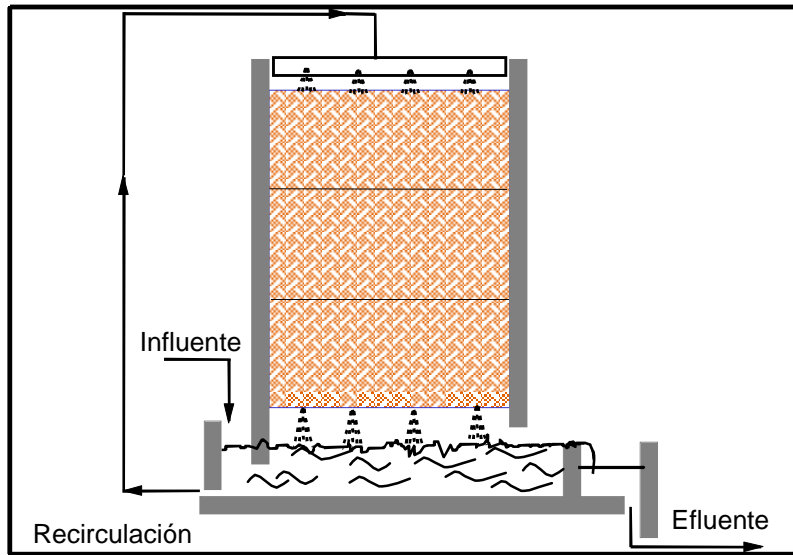


Figura 3.2 Filtro percolador para la oxidación biológica del nitrógeno amoniacal para el tratamiento de aguas residuales.

1.1.5.3 DISCOS ROTATORIOS

Otro sistema donde los microorganismos también forman biopelículas, son los reactores de discos rotatorios, que consisten de una serie de discos de poliestireno o polivinilo y sumergidos en el agua aproximadamente un 40%, que rotan sobre su eje impulsados mediante una flecha mecánica (Figura 3.3). En comparación con otros sistemas de biopelícula el área específica de la biopelícula en este tipo de reactor es menor (Bishop y Kinner, 1986). Para aumentar la biomasa y por tanto, la eficiencia del proceso nitrificante se ha incrementado la rugosidad de los discos, sin embargo, esta solución sólo es eficiente en las primeras etapas de la formación de la biopelícula. Al igual que en los filtros percoladores, el tiempo que tardan en crecer los microorganismos sobre los discos rotatorios es un factor determinante en el arranque del reactor. Entre los problemas más importantes que presentan este tipo de reactores están los de carácter mecánico, siendo el

tiempo de rotación y aireación lo más importante, en relación a la estabilidad fisiológica de biopelícula.

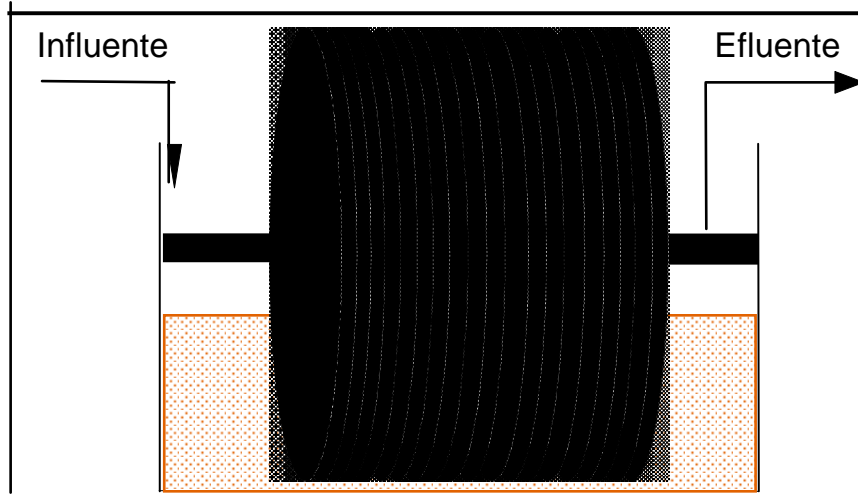


Figura 3.3 Filtro de discos rotatorio biológicos para la nitrificación de aguas residuales

1.1.5.4 FILTROS SUMERGIDOS.

Otro reactor nitrificante que también promueve la formación de biopelícula, es el filtro sumergido. Este reactor es una modificación del reactor de discos rotatorios, en donde los soportes de los microorganismos se encuentran totalmente inmersos en el líquido. En estos reactores, al igual que los reactores de discos rotatorios, los microorganismos nitrificantes se adhieren sobre el soporte. La eficiencia del reactor de filtros sumergidos suele ser similar a la de los discos rotatorios debido al área específica para la formación de la biopelícula. La formación y estabilidad de la biopelícula en el reactor de filtros sumergidos, depende de factores como los ya descritos anteriormente. En los reactores de filtros sumergidos, el aire se suministra por la parte inferior, al igual que la recirculación. En la parte superior se localiza la entrada del influente y la purga del lodo (Figura 3.4). Un problema que se puede

presentar en este tipo de sistema es la transferencia de oxígeno (y en casi todos los de biopelícula, si su espesor es grande), fundamental en el proceso nitrificante, ya que cuando el oxígeno disminuye, a menos de $0.25 \text{ mg de oxígeno disuelto L}^{-1}$, se abate la eficiencia del reactor nitrificante (Shreve, y col.,1991).

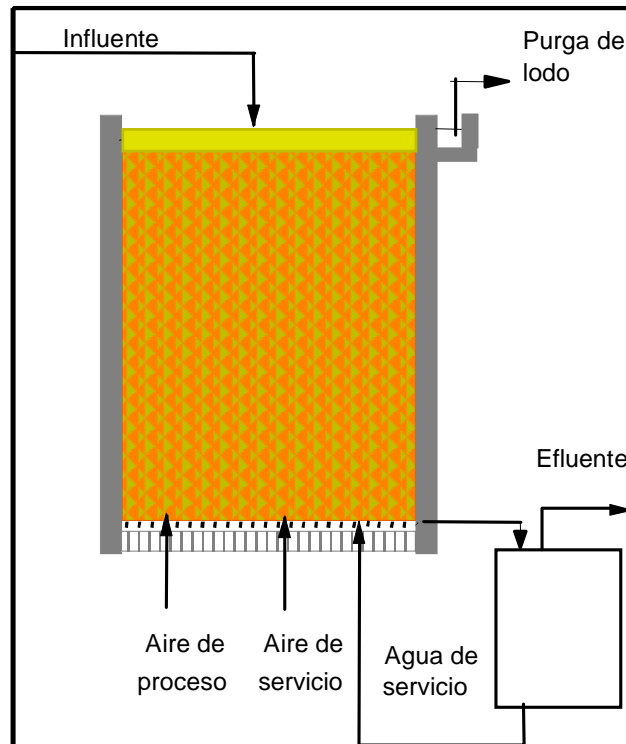


Figura 3.4 Filtro sumergido para la nitrificación de aguas residuales de concentración baja de nitrógeno amoniacal

1.1.5.5 REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO.

Los reactores de lecho fluidizado, consisten de una columna vertical, dentro de la cual se encuentra suspendido un soporte granular de tamaño pequeño, al que los microorganismos se adhieren. En este tipo de reactores el influente puede pasar a través del lecho con una velocidad ascensional suficiente para provocar no sólo la expansión del lecho sino la misma fluidización. Los reactores de lecho fluidizado nitrificantes pueden ser trifásicos, lo que se

logra cuando el efecto de las burbujas de gas ascendentes (aire), así como la corriente del líquido y el desplazamiento vertical de las partículas fluidizadas actúan al mismo tiempo. En el reactor de lecho fluidizado, la biopelícula se forma sobre un soporte de diámetro inferior a los de lecho fijo, que le permiten presentar una mayor relación superficie/volumen. (Trulear y Characklis, 1982; Eighmy y col., 1983). Además de las características del soporte, la velocidad de formación de la biopelícula en el soporte, depende en gran medida de las condiciones fluidodinámicas del reactor, como la velocidad ascensional, de las características bioquímicas del medio de cultivo, así como de los exopolímeros que formen la biopelícula. Dependiendo de la estabilidad de la biopelícula nitrificante en los reactores de lecho fluidizado nitrificantes se pueden tratar grandes caudales. Sin embargo, uno de los principales problemas de estos reactores es lo largo de la puesta en marcha (Atkinson y col., 1979).

1.1.5.6 REACTORES AIRLIFT

Originalmente los reactores airlift se desarrollaron para el postratamiento de aguas industriales. Un reactor airlift, consiste de un recipiente cilíndrico que presenta dos zonas distintas, una denominada zona ascendente y la otra zona descendente. En la zona ascendente se inyecta gas, el cual origina una disminución de la presión favoreciendo la recirculación del fluido en el reactor, circulación que trae como consecuencia la fluidificación de las partículas que contienen la biomasa (Figura 3.5). El reactor es de diseño simple y fácil construcción, presentan un bien definido modelo de flujo y una necesidad baja de energía, lo que los hace muy atractivos para el tratamiento de las aguas residuales. La principal diferencia entre los reactores airlift y los reactores de lecho

fluidificado es que en los reactores airlift la velocidad de circulación del líquido, esta relacionada con el caudal del gas, mientras que en los reactores de lechos fluidificado, el caudal del líquido es independiente del caudal del gas. Esto permite alcanzar velocidades lineales relativamente elevadas sin tener que recurrir a dispositivos de recirculación celular.

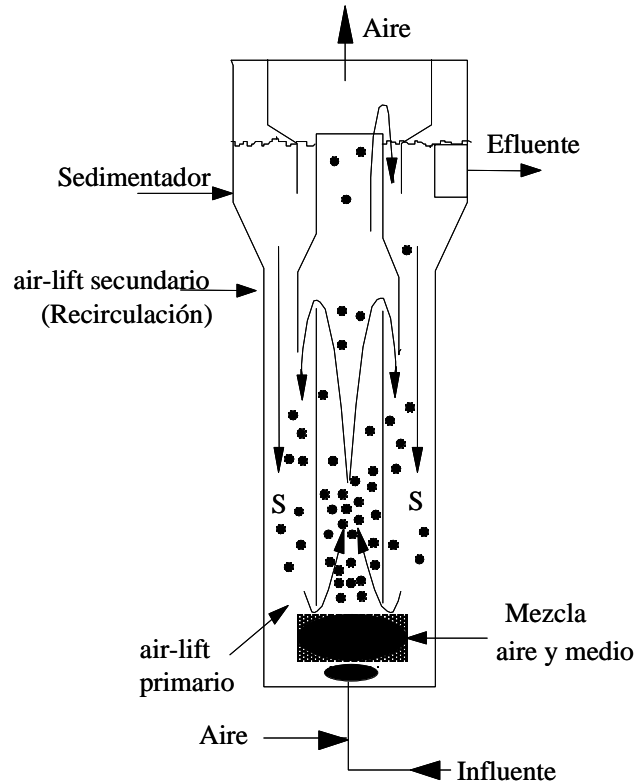


Figura 3.5 Reactor nitrificante airlift de biopelícula.

Una ventaja destacable de los reactores airlift sobre los de lecho fluidificado, parece que el mezclado es más eficiente y que, por efecto de las elevadas velocidades de circulación, se alcanzan coeficientes de transferencia de O_2 mayores, que en los reactores de lecho fluidificado. Otras ventajas que presentan es una buena homogeneización y pequeños esfuerzos cortantes. En estos reactores, el soporte presenta altas concentraciones de

Revisión bibliográfica

biomasa (alrededor de 50 g SSV/L), que en este caso, está relacionada con la elevada superficie específica ($3000 \text{ m}^2/\text{m}^3$), lo que depende del tamaño de la partícula, representando un área superficial muy grande (Van Loodsdrecht y Heijnen, 1993). También en los reactores airlift el arranque es muy lento, aunque una vez funcionando, pueden llevar a cabo la nitrificación en forma estable y con concentraciones de sustrato mayores que en otros reactores de biopelícula, principalmente debido a la gran cantidad de biomasa activa que se encuentra adherida a la superficie del soporte. Los reactores airlift, no pueden fácilmente tratar concentraciones de amonio altas, debido a que estos sistemas operan a TRH cortos, lo que ocasionaría velocidades de carga alta, propiciando la inhibición de la nitrato oxidación y del proceso nitrificante (Prosser, 1989). Los reactores airlift han sido preferentemente utilizados para el desarrollo del trabajo experimental.

En general los reactores de biopelícula tienen en común una desventaja, con respecto al de tanque agitado, y parece ser que la homogeneidad no es tan buena, ya que se pueden formar gradientes de nutrientes y oxígeno. Asimismo, el grosor de la biopelícula tampoco suele ser homogéneo, lo cual podría dar lugar a que el comportamiento metabólico de la biopelícula no sea uniforme, que la proporción de exopolímeros tampoco sea igual en toda la superficie del soporte.

1.1.5.7 ESTADO ESTACIONARIO DEL CULTIVO

Durante la puesta en marcha de un reactor en continuo, puede presentarse inestabilidad a esta etapa se le considera como el periodo de transición del cultivo. Entre algunas de las causas de la transición se han mencionado la interacción del cultivo con el ambiente, la interacción entre mecanismos de regulación metabólica, la inhibición por sustrato o sustancias exógenas, la presencia de fuentes múltiples de nutrientes y microorganismos

que compiten por el mismo sustrato. Sin embargo, hoy en día se siguen llevando a cabo una gran cantidad de estudios encausados a entender estos estados transitorios. Se dice que un reactor se encuentra en estado estacionario estable cuando resiste una perturbación externa de magnitud moderada. El estado estacionario en los reactores en continuo está delimitado por la velocidad en la utilización del sustrato y la velocidad de formación de los productos. La biomasa juega un papel importante, ya que cuando ésta aumenta en el reactor, no se puede hablar de un estado estacionario sino de un estado semiestacionario. El estado estacionario puede permanecer indefinidamente si no es perturbado con cambios bruscos. Las definiciones actuales del estado estacionario no son compartidas por algunos investigadores, ya que consideran que el estado estacionario en un reactor es algo mucho más complejo. Para este trabajo, los reactores que serán utilizados se operan con recirculación de biomasa, por lo tanto, habrá acumulación de biomasa, y el cultivo estará en estado semiestacionario. Sin embargo, si la velocidad de formación del producto no presenta variaciones significativas, se puede hablar del régimen estacionario para el producto. Por ejemplo, si la velocidad de producción de nitrito no registra cambios significativos, es posible decir que el cultivo está en régimen estacionario nitrificante.

1.1.5.8 ARREGLO DE LOS LODOS NITRIFICANTES

Se ha mencionado cómo la geometría y la operación de los diferentes reactores pueden influir en la formación de los flóculos y las biopelículas. Un tema que está poco estudiado, es el de cómo actúan las fuerzas cortantes en la formación de los flóculos, biopelículas y gránulos. Así, se sabe que al desplazarse el fluido en capas el movimiento genera un efecto de corte sobre las partículas que se encuentran en suspensión, lo cual afecta la unión entre las partículas, y en consecuencia, debe ser estudiado. Se ha observado que dependiendo de

Revisión bibliográfica

la magnitud de las fuerzas cortantes, los microorganismos podrán agruparse para formar estructuras estables, como las biopelículas o flóculos. Parece ser que ésto se logra al modificar los microorganismos su metabolismo, sintetizando y excretando nuevos compuestos, como los exopolímeros (Mikkelsen y Nielsen, 2001). Se señala que los exopolímeros presentan cargas negativas que unen al Ca^{2+} , formando enlaces iónicos que contrarrestan las fuerzas cortantes, permitiendo a los microorganismos agruparse (Claus y col., 1998).

Una vez formada la biopelícula y si los esfuerzos cortantes se incrementan de manera significativa, la biopelícula puede desestabilizarse, separándose del soporte y los microorganismos salen del reactor. De hecho se cuenta con evidencias que en los reactores en régimen turbulento, las fuerzas cortantes dificultan la adhesión de los microorganismos al soporte (Mikkelsen y Keiding, 1999; Mikkelsen y Nielsen, 2001).

Las consecuencias prácticas son previsibles, el sistema biológico se pierde. En años recientes se ha observado que los exopolímeros, como las proteínas y carbohidratos, pueden ser el sistema de aglutinación o anclaje de los microorganismos. De ser cierto, la concentración de los exopolímeros, podría ser determinante (Echeverría y col., 1985; Urbain y col., 1993; Martínez y col., 2000). Las condiciones ambientales en los reactores, las condiciones de operación de los reactores, y el tipo de nutriente que se suministra, posiblemente induzcan cambios en la concentración de los compuestos exopoliméricos del lodo, que a su vez pueden modificar las propiedades de sedimentabilidad y estabilidad de los lodos nitrificantes (Lazarova y Manem 1995; Cuervo-López y col., 1999). Por lo tanto, deben aportarse más evidencias que muestren cuál es el papel de las proteínas y polisacáridos exopoliméricos.

1.1.6 CONSTITUCIÓN DE LOS LODOS NITRIFICANTES

Los lodos nitrificantes están formados por microorganismos nitrificantes y heterotróficos. Las sustancias exopoliméricas son otros componentes de los lodos nitrificantes (Flemming y Wingender, 2001; Characklis, 1990). Las sustancias exopoliméricas están constituidas principalmente por macromoléculas características de los organismos vivos (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas y gluco-fosfatos principalmente). Estos compuestos son parte importante en la integridad funcional del lodo, determinando sus propiedades físico-químicas y biológicas (Urbain y col., 1993; Mitteelman y col., 1990; Applegate y Bryers 1991; Ford y col., 1991).

Los lodos son ecosistemas en donde parece haber una perfecta simbiosis. Cuando las condiciones ambientales favorecen alguno de los microorganismos, el equilibrio se rompe y algún o algunos de ellos podría crecer sin control.

Los microorganismos heterotróficos no intervienen en la nitrificación y actualmente no se sabe específicamente su función dentro del lodo. Entre de los microorganismos heterótrofos se tiene a bacterias, hongos filamentosos, protozoarios y algunos tipos de algas unicelulares. Se propone que pueden obtener sus nutrientes a partir de los microorganismos autótrofos, aunque todavía no se determina de qué manera. De entre los microorganismos heterótrofos, se puede encontrar a las algas verdeazules, que son células fotosintéticas que utilizan la luz como fuente de energía para su metabolismo. Los géneros que se han aislados son: *Lyngbya*, *Phormidium* y *Schizothrix*. Cuando este tipo de microorganismos crece excesivamente, pueden cambiar las propiedades de sedimentabilidad de los lodos (Eikelboom, 1975).

Las bacterias filamentosas son otro grupo de microorganismos frecuentemente encontrados en los lodos. Se han encontrado entre 20 y 30 tipos diferentes de ellas, donde *Spharotilus*,

Revisión bibliográfica

Thiotrix y *Vitreoscilla* son los géneros aislados con mayor recurrencia. Estos microorganismos son Gram negativos, y suelen ser pleomórficos (Eikelboom, 1975). Los actinomicetos son otro tipo de microorganismos que pueden estar en los lodos. Estos forman colonias compactas con una gran cantidad de ramificaciones, y cuando aumenta su proporción en el lodo se observa una consistencia viscosa, *Nocardia amaraes* es el género y especie más usualmente aislado (Pipes, 1978). Los hongos son microorganismos heterótrofos que forman filamentos y suelen ser los parte de la flora normal en los lodos nitrificantes (Eikelboom, 1975), los géneros más comunes son: *Geotrichum*, *Candida* y *Rhodotorula*. Al igual que los hongos, los protozoarios y metazoarios, son microorganismos que se encuentran de manera natural en los lodos nitrificantes. En años recientes se han caracterizado a *Vorticella sp.*, *Tetrahymena sp.*, *Aspidisca sp.*, y *Bodo sp.* Y se les ha asociado, junto con los hongos filamentosos con cambios en la sedimentabilidad de los lodos floculentos (Ratsak y col., 1996). Los metazoarios son organismos pluricelulares que pueden encontrarse como parásitos o de vida libre en la naturaleza, pero para algunos autores su presencia en los lodos nitrificantes puede ser indicio de que el lodo tiene una buena sedimentabilidad. Sin señalar que estos organismos son sensibles a cambios ambientales lo que puede modificar su metabolismo y, en caso extremo, provocar su muerte, alterando negativamente la sedimentabilidad del lodo. Uno de los metazoarios más asiduamente encontrado en lodos nitrificantes es *Rotaria sp.* (Cybis y Horan, 1997).

Desde el punto de vista químico, los lodos están formados por una fracción inorgánica y otra orgánica y ambas pueden ser influenciadas por la composición del medio de cultivo. Se ha llegado a señalar que la fracción orgánica puede representar del 10 al 90%, del peso seco del lodo (Alphenaar y col., 1992, Ahring y col., 1993), aunque la última cifra podría estar sujeta a verificación. Los exopolímeros son un componente fundamental de los lodos

y podían representar del 10 al 20 % de la materia orgánica total en el lodo (Urbain y col., 1993; Frolund y col., 1994; Nielsen y col., 1997; Martínez y col., 200). La composición de los exopolímeros ha sido ampliamente estudiada, determinándose tres compuestos exopoliméricos principales que se encuentran en mayor concentración, a saber, los carbohidratos, lípidos y proteínas. También se pueden encontrar compuestos como los ácidos húmicos, ácidos urónicos y algunos productos de la lisis celular como los ácidos nucleicos (Horan y Eccles, 1986; Echeverría y col., 1992; Urbain y col., 1993; y Dignac y col., 1998; Flemming y Wingender, 2001). Dentro de los exopolímeros no se descarta la posibilidad de encontrar otros compuestos orgánicos del influente. Se puede hablar metafóricamente de que los exopolímeros son la casa de los microorganismos, en donde los polisacáridos son las paredes y piso, siendo las proteínas los muebles de la casa, aunque en este caso no se conoce una disposición espacial exacta de los exopolímeros (Flemming y Wingender, 2001).

Los iones divalentes como el fierro, calcio y magnesio no son menos importantes, ya que parecen ser el enlace entre las diferentes macromoléculas que forman los exopolímeros (Forster, 1985). Sin embargo, actualmente no se tiene evidencia clara de cómo se encuentran dentro del flóculo, biopelícula y gránulo, o bien cual es su papel. Experimentalmente, se ha observado que el Ca^{++} puede aumentar la sedimentabilidad del lodo (Gómez, 1994).

1.2 ESTRUCTURAS QUE FORMAN LOS LODOS

Los microorganismos que llevan a cabo los diferentes procesos de depuración de las aguas residuales, se pueden asociar para llevar de manera adecuada el proceso de depuración. El por qué y cómo se asocian, todavía está en discusión, aunque las hipótesis apuntan a que puede existir algún tipo de cooperación positiva, que favorezca el proceso metabólico. Los

microorganismos puede formar estructuras características como biopelículas, gránulos y flóculos.

1.2.1 FORMACION DE LOS LODOS

Los microorganismos agrupados forman estructuras como los flóculos, gránulos y biopelículas, (Gray, 1989). Los factores ambientales como la temperatura, pH, concentración de nutrientes, productos metabólicos y sustancias tóxicas, pueden influir en la adhesión, agrupación o aglutinación de los microorganismos a la superficie del soporte o entre ellos (Pedersen, 1990). Sin embargo, hasta el momento no se tiene un panorama claro sobre cómo afecta cada uno de estos factores la adhesión, por lo que se siguen llevando a cabo estudios para poder entender el fenómeno. En la formación de los flóculos, gránulo y biopelículas la adhesión microbiana sucede cuando las células se acercan a una superficie, o a otras células. Se ha sugerido que el contacto de las células a una superficie, o entre ellas, puede estar dado por el movimiento browniano, la sedimentación y el movimiento de los microorganismos por medio de los flagelos (Bryant, 1987). Estos contactos o agrupamientos entre las células puede definirse en términos de la energía involucrada en la formación del lodo (Ruter y col., 1984).

Se cree que las características electrostáticas de la superficie microbiana, así como las propiedades químicas de la superficie del soporte pueden ser determinantes para la formación de la biopelícula (Bryers y Characklis, 1981; Samuelsson y Kirchman 1990). Los datos de cómo se llevan a cabo las interacciones entre los microorganismos y la superficie sólida, no son precisos, por lo que se siguen estudiando las características del

Revisión bibliográfica

soporte y de la superficie de los microorganismos para determinar el aporte de cada uno, en la formación de la biopelícula

En el flóculo, como en las biopelículas, la adhesión bacteriana puede ser crucial y se puede llevar en dos pasos. En el primer paso los microorganismos se agrupan uniéndose de manera reversible y en el segundo paso en la formación del flóculo, se puede dar una agregación de tipo irreversible. En el primer paso se involucran una gran variedad de fuerzas, como las interacciones de Gibbs, que se dan entre dos superficies en función a su distancia de separación; los factores electrostáticos son usualmente fuerzas de repulsión, que se dan por el traslapamiento eléctrico de superficies negativas de las bacterias (Hunter y Liss, 1982), las cargas de los microorganismos y las superficie del soporte en el caso de las biopelículas son importantes en este tipo de interacciones, ya que a medida que se acercan las bacterias sus interacciones son más evidentes y la formación de los flóculos y biopelículas se favorece, cuando los microorganismos se alejan la formación de los flóculos es más lenta (Marshall y col., 1971). Algunos autores incluyen las interacciones por fuerzas de van der Waals, aunque faltan más evidencias. Una forma de describir la adhesión bacteriana es por medio de la teoría de Derjaugin, Landau, Verwey, y Oberbeek (DLVO) analizada por Marshall y col., (1971) para agrupaciones bacterianas. Esta teoría fue desarrollada para partículas coloidales, las cuales pueden diferir de las características de los microorganismos. Por tal motivo, se ha requerido de modificaciones que puedan describir la adhesión microbiana. La teoría DLVO modificada se puede utilizar para pronosticar la floculación y adhesión bacteriana, que involucran a las fuerzas electrostáticas y las fuerzas de London-van der Waals. La fuerza que se necesita para llevar a cabo la adhesión en estos sistemas complejos puede cambiar con respecto a lo calculado, ya que puede existir otro tipo de interacciones, como los puentes de hidrógeno que no están contemplados y pueden

Revisión bibliográfica

influir en el cálculo de la energía de interacción para que las células se agrupen, o se adhieran en una superficie. El cálculo de la energía de interacción según la teoría DVLO se lleva a cabo de la siguiente manera (Hermansson, 1999).

$$\text{Energía de interacción} = \text{Energía London-van der Waals} + \text{Energía electrostática}$$

En donde la magnitud de fuerzas de London-van der Waals y las fuerzas electrostáticas y la distancia de separación determinan el grado de unión de los microorganismos. De esta manera, cuando los microorganismos se encuentran muy cercanos, la atracción por este tipo de fuerzas es máxima. Cuando la separación es grande o máxima la atracción de los microorganismos suele ser baja. Esta teoría puede predecir dos posibles formas de atracción entre microorganismos, la primera toma en cuenta las cargas en la superficie de los microorganismos. La segunda toma en cuenta su geometría, lo que puede permitir que presenten una mayor o menor área de contacto, lo que favorecería a esta fuerza de interacción. La constante dieléctrica de los líquidos es otro factor implicado en la adhesión de los microorganismos, que puede influir en la fuerza de interacción de los microorganismos para la formación de los flóculos. La teoría DLVO sugiere que la interacción de los microorganismos es reversible, por tal motivo, esta teoría en un inicio puede ayudar a entender la formación de los flóculos y biopelículas, pero no en su totalidad.

En el segundo paso para la formación del flóculo, se piensa que pueden involucrarse interacciones de algunas estructuras celulares como las fimbrias y flagelos, además de sustancias exopoliméricas que son secretadas por los microorganismos. Dentro de los exopolímeros de los flóculos y las biopelículas se incluyen a los polisacáridos neutros y ácidos, lipopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y ácidos húmicos, entre otros (Horan

Revisión bibliográfica

y Eccles, 1986; Morgan y col., 1990; Urbain y col., 1993; Lazaroba y Manen 1995; Frolund y col., 1996). Aún no se tiene un panorama claro de cómo los exopolímeros favorecen la formación de los flóculos, pero se tiene la evidencia que la disminución de algunos de estos exopolímeros determina la formación y estabilidad de los flóculos y biopelículas (Goodwin y Forster, 1985; Urbain y col., 1993; Lazarova, y col., 1992; Lazaroba y Manen 1995).

Forster y Lewin, (1972) y Forster (1985) señalan que en el fenómeno de floculación, los iones divalentes como el Ca^{++} , Mg^{++} , y Fe^{++} son considerados como agentes de unión, ya que las cargas negativas de las bacterias y de algunos exopolímeros pueden complementarse con las cargas positivas de los iones divalentes. Hasta el momento no se ha confirmado esto, ni se sabe cómo se lleva a cabo esta unión, ni tampoco con qué tipo de exopolímeros se unen a los iones divalentes. Lo que se ha podido comprobar es que la presencia de estos iones en el flóculo pueden modificar sus características de sedimentabilidad, por ende, su estabilidad (Kakii y col., 1985). La importancia de estos iones en la formación del lodo, se ha podido poner de manifiesto, ya que cuando el lodo se pone en contacto con compuestos quelantes como es el caso el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el lodo pierde su fuerza de unión y en algunas ocasiones llega a desintegrarse (Grotenhuis y col., 1988, Grotenhuis y col., 1991). A qué compuestos exopoliméricos se une los iones y cómo se desintegra el lodo en ausencia de estos aún no es claro. Aún sigue siendo motivo de nuevos estudios.

Otra de las características importante en la formación y estabilidad de los flóculos son las propiedades de hidrofobicidad, en donde el balance de hidrofiliidad y la hidrofobicidad pueden ser considerado como un factor relevante en la estabilidad del flóculo (Eriksson y Axberg 1981). Estas características no han sido totalmente valoradas y en realidad no se

sabe como este tipo de factores se involucra en la formación del lodo. La evidencia de que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la organización y cohesión de los agregados bacterianos del lodo, es soportada por seis observaciones, aunque en su conjunto no son concluyentes:

1. La presencia de zonas hidrofóbicas en las células (Jorand y col., 1994).
2. La adhesión preferencial de bacterias hidrofóbicas en el flóculo (Zita y Hermansson, 1997).
3. La evidencia espectroscópica muestra la presencia de grandes y pronunciadas zonas hidrófobas (Ganaye y col., 1997).
4. El hecho que la actividad del lodo flocular retenga algunos compuestos orgánicos poco solubles en agua (Struijs y col., 1991).
5. La relación entre la sedimentabilidad del lodo y la hidrofobicidad del flóculo (Urbain y col., 1993).
6. El incremento significativo en la floculación cuando son adicionadas pequeñas cantidades de álcali, además de polímeros sintéticos (Chausset, 1989).

El análisis de estos seis enunciados, es difícil ya que se ha estudiado las características de la superficie bacteriana y se ha determinado que presenta una carga negativa (Goodwin y Forster 1985). Por otro lado, el hecho de que la adhesión de las bacterias hidrofóbicas sea preferencial, no esta enteramente determinado. Lo que sí se ha podido observar es que algunos lodos absorben compuestos hidrofóbicos, pero no es una regla. En consecuencia los seis puntos anteriores sólo son propuestas que podrían ayudar a entender las características físico-químicas de los lodos. Jorand y col., (1998) se estudiaron las características de hidrofobicidad e hidrofiliidad de los flóculos, disgregándolos por medio de sonicación a

Revisión bibliográfica

37 W. Después de disgregar el flóculo la fracción soluble se ajustó a pH de 2.0. A este pH se presentó un precipitado de compuestos insolubles en donde los autores señalan que correspondió al 50% de los exopolímeros. Por haber precipitado a este pH sugirieron que presentan características hidrofóbicas, lo que tendría que corroborarse, ya que todas aquellas proteínas que puedan protonarse podrían precipitar a este pH, Sin embargo, esto no indicaría que fueran hidrofóbicas al pH en el que se encuentra normalmente el lodo (pH 7.0). Por otra parte, la fracción soluble después de ajustar el pH a 2.0, se hace pasar por columnas hidrofóbicas reteniéndose el 7% de los exopolímeros solubles. Debido a estos resultados los autores refieren que los exopolímeros del lodo flocular presentan característica hidrofóbicas, lo que les referiría una buena sedimentabilidad. Como la evidencia es escasa no se puede decir si esto es aplicable a todos los lodos. Este tipo de característica de hidrofobicidad no es aplicable a los carbohidratos exopoliméricos, ya que estos por obvias razones no presentan esta característica. En consecuencia, algunos autores refieren a las proteínas exopoliméricas como las responsables de la fracción hidrofóbica e hidrofílica y jugar un papel destacado en la sedimentabilidad y estabilidad de los flóculos. Se puede suponer que las características hidrofóbicas juegan un papel importante en el flóculo, refiriéndole características de estabilidad y sedimentabilidad lo que permitiría a los flóculos permanecer en el reactor y llevar a cabo los procesos de depuración. No obstante, es necesario utilizar técnicas más confiables, para determinar con mayor precisión, como se modifican los exopolímeros con respecto al tiempo y el porcentaje de exopolímeros hidrofóbicos.

1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD Y SEDIMENTABILIDAD DEL LODO

Un primer intento por explicar, los cambios en la estabilidad y sedimentabilidad de los lodos fue descrito por Jenkins y col. (1986), mencionando que el crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos genera problemas de esponjamiento, el lodo presenta una pobre compactación, aumenta el volumen y tiende a flotar. Se han mencionado a un gran número de microorganismos filamentosos como los responsables de este tipo de problema, entre los que se encuentran frecuentemente a *Microthrix*, *Nocardia Actinomyces*, *Sphaerotilus*, *Trhiothrix* (tipo 021N, y el tipo 0961), entre otros (Eikelboom, 1975). En años recientes esta teoría ha entrado en desuso ya que autores como Eikeboom y van Buijsen (1981) y Novak y col., (1993) analizaron lodos en donde no se contaba con la presencia de microorganismos filamentosos, pero sí se presentaba el fenómeno de esponjamiento. Estos autores reportan la presencia de microorganismos conocidos como poly-P, que producen una sustancia que produce el mismo efecto que el observado en el esponjamiento filamentoso.

Van Leeuwen, (1988) observa en lodos activados que la composición del agua residual puede influir en el esponjamiento del lodo. Sugieren que una alta concentración de ácido oleico en el influente produce una disminución de sedimentabilidad del lodo. Por otra parte Cuervo-López y col., (1999), determinan que cambios de fuente de carbono en el influente de un reactor pueden también ser un factor determinante en la sedimentabilidad los lodos desnitrificantes. Wood y Tchobanoglous (1974) refieren que una disminución de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y el fierro, además de una alta concentración de microorganismos, pueden desencadenar el fenómeno de esponjamiento. No dan argumentos

Revisión bibliográfica

que expliquen a que se puede deber este tipo de fenómeno. Stichová, (1990) encontró que la disminución de oxígeno disuelto en el sistema aerobio, da como resultado el crecimiento de microorganismos como *Acinetobacter sp.* que produce un material mucilaginoso que afecta la sedimentabilidad del lodo. Todos los estudios anteriores son casos específicos, que no tienen una explicación en común del fenómeno de esponjamiento, por lo que se sigue buscando un en factor que pueda explicar este tipo de fenómeno.

Son muchos los autores que sugieren la participación de los exopolímeros sobre la estructura y sedimentabilidad del lodo (Forster, 1985; Goodwin y Forster, 1985; Horan y Eccles, 1986; Morgan y col., 1990; Echevería y col., 1992; Urbain y col., 1993, Dignac y col., 1998; Bura y col., 1998; Flemming y Wingender 2001; Jang y col., 2001; Shin y col., 2001). Los microorganismos están embebidos en los exopolímeros proporcionándole protección frente al ambiente (Li y Ganczarczyk, 1990).

Finalmente, la materia orgánica es otro factor que puede influir en los cambios de sedimentabilidad de los lodos. Se ha propuesto que su presencia estimula el crecimiento de los microorganismos filamentosos, provocando el esponjamiento del lodo. Por otra parte, se ha encontrado que cuando un lodo es alimentado con diferentes tipos de materia orgánica, se presentan cambios en la composición de las proteínas celulares (Huber y col., 1998), así como en la concentración de las proteínas exopoliméricas (Cuervo-López y col., 1999). Si los exopolímeros tienen efecto sobre la sedimentabilidad de los lodos, es necesario estudiar con mayor detalle el efecto de la adición de materia orgánica sobre la producción de exopolímeros en un lodo nitrificante.

1.4 EXOPOLÍMEROS DE LOS LODOS NITRIFICANTES

1.4.1. PROTEÍNAS EXOPOLIMÉRICAS

En la naturaleza tenemos 20 aminoácidos que se encuentran formando parte de todas las proteínas de los seres vivos. Las funciones de las proteínas pueden ser diversas, por ejemplo, formar estructuras celulares, catalizar las reacciones químicas. Pueden actuar como transportadoras en la membrana, o bien, mantener la integridad del organismo contra agentes extraños (anticuerpos), entre muchas otras funciones.

En los lodos nitrificantes las proteínas exopoliméricas se presentan como el componente mayoritario según algunos autores (Eriksson y Alm 1991; Urbain y col., 1993; Jorand y col., 1995; Dignac y col., 1998; Jahn y Nielsen, 1998; Flemming y Wingender 2001). La presencia de una alta concentración de proteínas en la fracción exocelular, sugiere que estas juegan un papel importante en la formación de la estructura del lodo, que hasta el momento no se conoce con certeza. Asimismo, el número y el peso molecular de las proteínas exopoliméricas encontradas en la literatura es aún incierto. Al respecto Forster (1985) ha encontrado que los exopolímeros pueden tener un peso molecular de entre 30 y 100 kDa. El análisis fue llevado a cabo con lodos activos, con un detector de luz ultravioleta a 279 nm, infiriendo que se trataba de proteínas, aunque no se mencionó el número de éstas. En contraste, Higgins y Novak (1997) al utilizar un lodo activado y realizarle una identificación de proteínas exopoliméricas, en gel de poliacrilamida, que tiñeron con azul de Comassie, solamente encontraron una proteína de 15 kDa. Flemming y Wingender (2001) refieren que las proteínas exopoliméricas se presentan en un intervalo de pesos moleculares que van de 5 y 150 kDa. Sin embargo, no mencionan su número ni cómo fueron obtenidos. Lo relevante de todos estos resultados es que indican lo importante de

Revisión bibliográfica

realizar estudios que conlleven a esclarecer el número y peso molecular de las proteínas exopoliméricas que constituyen los lodos.

En la literatura se habla de que existen diferentes tipos de proteínas exopoliméricas, pero hasta el momento los estudios realizados para identificarlas no son contundentes. Se ha determinado la existencia de exoenzimas como proteasa o carbohidrasas, pero en la mayoría de los casos, se trata de enzimas que normalmente son intracelulares, por lo que su presencia en los exopolímeros puede deberse a la lisis celular (Nielsen y col., 1992).

También se ha propuesto la presencia de lectinas, proteínas producidas por bacterias, virus y algunas plantas, que poseen residuos de azúcares y no presentan actividad enzimática. Parece ser que las lectinas pueden estar involucradas en la biofloculación, puesto que tienen un papel destacado en la agregación y colonización (Mirelman y Ofek, 1986). Las lectinas producidas por bacterias se localizan en apéndices como los pilis y fimbrias y son sinónimo de adhesión y aglutinación (Sharon y Ofek 1986; De Graaf y Mooi 1986), Sin embargo, dentro de la matriz de exopolímeros, no se ha determinado claramente que se trate de esta proteína (Higgins y Novak, 1997).

En años recientes se han realizado estudios con la finalidad de establecer cuáles son los aminoácidos que conforman las proteínas exopoliméricas. Estudios realizados por Higgins y Novak, (1997); Dignac y col., (1998) en los activados indicaron que los aminoácidos que se encuentran en mayor concentración son aspartato y glutamato. También indican que en menor concentración están la alanina, leucina, glicina, lisina, treonina, arginina, serina, tirosina, histidina, valina, prolina, isoleucina, fenil alanina y metionina. Estos autores mencionan que los aminoácidos en mayor concentración determinan las propiedades de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las proteínas. Si el aspartato y glutamato son los más abundantes quiere decir que los lodos y por lo tanto del lodo serían hidrofílicos. Estos

Revisión bibliográfica

resultados difieren de los encontrados por Jorand y col., (1998) quienes determinan que el 57% proteínas exopoliméricas de los lodos activados tienen características hidrofóbicas. Cabe mencionar que estos dos resultados son producto de una determinación no sistematizada, por lo que no es posible determinar si las proteínas y la proporción de aminoácidos permanecen o no constantes en los lodos. Higgins y Novak, (1997) comparó los 16 aminoácidos encontrados en las proteínas exopoliméricas de lodos activados con los aminoácidos encontrados en la lectina de las fimbrias de *E. coli.*, observó muchas coincidencias entre ellas. Es importante realizar nuevos y sistemáticos estudios con la finalidad de confirmar los resultados anteriores.

1.4.2 CARBOHIDRATOS EXOPOLIMÉRICOS

Los carbohidratos están ampliamente distribuidos en los organismos vivos como parte de los microorganismos, o pueden estar formando polímeros exocelulares. Pueden asociarse a otros compuestos como los lípidos y proteínas para formar carbohidratos complejos como los glicolípidos y glicoproteínas. Los carbohidratos exopoliméricos pueden tener diferentes funciones en las células y en los organismos vivos, como son los estructurales y de regulación del transporte a través de la membrana. Su peso molecular, ha sido reportado entre 3×10^5 y 3×10^6 dalton (Horan y Eccle, 1986). Sin embargo, no hay muchos datos y los que se presentan son resultados preliminares.

Revisión bibliográfica

Tabla 1 Monosacáridos encontrados en los carbohidratos exopoliméricos

Autores	Monosacáridos en lodos de tratamiento de las aguas residuales
Takiguchii, (1972)	Glucosa, manosa, arabinosa, ramnosa, desoxiribosa y fucosa
Stainer y col., (1976)	Galactosa, fucosa, manosa y ácido galacturónico
Sato y Ose (1980)	En mayor proporción la glucosa, galactosa y arabinosa
Sutherland (1985)	Azúcares neutros y una pequeña cantidad de ácido urónico
Horan y Eccles (1986)	Glucosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico
Dignac y col.,(1998)	Glucosa, manosa y galactosa, además de xilosa, arabinosa, ribosa, fucosa y ramnosa

En todos los estudios de la Tabla 1 destacan tres monosacáridos (glucosa, manosa y galactosa) que se pueden encontrar como constituyentes mayoritarios de los carbohidratos exopoliméricos (Sutherland, 1971). Dignac y col., (1998) encuentran que a pesar de que la glucosa es uno de los principales componentes en la naturaleza, en el lodo sólo representa el 2% de total de los azúcares en los lodos. En cambio, se ha encontrado que en los carbohidratos exopoliméricos constituye más del 30% del total de los azúcares. Al respecto, estos autores piensan que la glucosa se ha incorporado de los polisacáridos presentes en las aguas residuales. Esto no es aplicable a todos los casos, puesto que en los lodos nitrificantes alimentados con medios litoautotróficos, también se puede encontrar a la glucosa formando parte de los carbohidratos exopoliméricos. La ramnosa y ribosa por su parte son constituyentes de las células bacterianas. La primera forma parte de la pared celular mediante lipopolisacáridos (Fox y col., 1990). La segunda es un componente de los ácido desoxiribonucleicos (ARN), que al ser un componente intracelular, la presencia de ribosa en los exopolímeros se relaciona con lisis celular. En cultivos axénicos, la ribosa y la

Revisión bibliográfica

desoxiribosa son reportadas raramente como constituyente de los exopolisacáridos (Surherland, 1977). Sin embargo, aunque en bajas concentraciones, estos dos monosacáridos se encuentran formando parte de los exopolisacáridos de los lodos (Morgan y col., 1990, Dignac y col., 1998). Su presencia se puede deber a la muerte por envejecimiento de las células del lodo. Los ácidos urónicos y galacturónico son constituyentes de la pared celular, por lo que estos azúcares pueden provenir de la lisis celular de bacterias. Como se puede apreciar, los tipos de monosacáridos de los carbohidratos exopoliméricos no varían grandemente, por lo que sería importante determinar su función dentro del lodo nitrificante.

Los exopolisacáridos de los lodos son necesarios para la agregación de los flóculos. Estos componentes están relacionados con el área superficial que puede tener el lodo, pero este factor es dependiente del peso molecular y la composición de los polisacáridos, ya que dependiendo de su tamaño y de las características bioquímicas del polisacárido, sería el número de cargas en su superficie y las uniones que puede formar en los agregados (Harris y Mitchel, 1973). Se cree que los exopolisacáridos son los responsables de formar enlaces o puentes con ayuda de los iones divalentes, lo que sería el inicio de la floculación que da origen al lodo. La superficie bacteriana juega un papel importante, ya que puede orientar las cargas de los iones y la de los exopolímeros para la formación de los agregados (Forster, 1971; Goodwin y Forster 1985; Horan y Eccles, 1986; Higgins y Novak, 1997), aunque hoy en día no se sabe si son exopolisacáridos, o las proteínas exopoliméricas, los implicados en la estructura flocular.

Parece ser que las glicoproteínas exopoliméricas, son de particular relevancia en los lodos, ya que existen datos en donde *Flexibacter sp.*, presenta una glicoproteína que tiene propiedades de adhesividad. Esta glicoproteína está constituida principalmente por los

Revisión bibliográfica

siguientes monosacáridos: glucosa, galactosa, fucosa y ácido urónico, además de la fracción proteica que no puede ser separada (Humprey y col., 1979). Las glicoproteínas también fueron identificadas por Goodwin y Forster (1985), sugiriendo que son el principal componente de los exopolímeros y que están relacionadas con la sedimentabilidad del lodo. A la fecha no hay estudios recientes que avalen estos resultados.

Los carbohidratos exopoliméricos son importantes en la formación de los lodos. Experimentalmente se ha observado que cuando disminuye su concentración en los lodos, se tiene como consecuencia una pobre sedimentabilidad. Por el contrario, cuando se tiene una alta concentración de carbohidratos exopoliméricos la sedimentabilidad es buena, por lo que se les ha considerado como las cadenas que forman el lodo (Goodwin y Forster, 1985, Urbain y col., 1993)

1.4.3 LÍPIDOS EXOPOLIMÉRICOS

Los lípidos en los organismos vivos se encuentran principalmente constituyendo la membrana de la célula. Pueden ser compuestos anfipáticos, ya que presentan una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, pero existen lípidos que sólo son hidrofóbicos. Estos suelen ser compuestos de almacenamiento de energía.

En los lodos nitrificantes los lípidos se pueden encontrar como biomoléculas exopoliméricas con característica netamente hidrofóbicas, que pueden influir fuertemente en las características físico-químicas del lodo (Jorand y col., 1998). Los lípidos exopoliméricos están poco estudiados, pero se ha podido determinar la presencia en lodos activados de poli- β - ácido hidroxibutírico (Wallen y Davis, 1972). Estudios realizados por Magara y col. (1976), con lodos activados mostraron, por medio de espectroscopía de infrarrojo, que el poli- β - ácido hidroxibutírico no se encontraba formando los lípidos

Revisión bibliográfica

exopoliméricos. En todo caso, los resultados indicaron la presencia de triglicéridos exocelulares. Dignéac y col. (1998), trabajando con lodos activados, confirmaron la presencia de monoglicéridos, diglicéridos, y triglicéridos, además de fosfolípidos y esteroides. Estos últimos representan menos del 1% de los lípidos extraídos, coincidiendo parcialmente con los resultados anteriores. Costerton y Colwell, (1979) encontraron lipopolisacáridos formando a los exopolímeros. Se sabe que estos son parte de la membrana celular de las bacterias Gram negativas, por lo que autores como Watson y Hobbie (1979) recomendaron considerar la presencia de los lipopolisacáridos exocelulares como un indicador de la lisis de bacterias Gram negativas. Hoy en día no se conoce con exactitud el tipo de lípidos exocelulares que forman el lodo, pero lo que sí se ha determinado es que éstos no son utilizados por los microorganismos como reserva de energía, ya que después de ser liberados por las bacterias o por lisis de éstas, los lípidos son fácilmente degradados (Dignéac y col., 1998). Puede verse, entonces, que deben realizarse nuevos estudios con la finalidad de esclarecer la función de los lípidos exopoliméricos en los lodos nitrificantes.

1.4.4 IONES

Los iones metálicos divalentes como el calcio, fierro y magnesio, pueden unirse a los exopolímeros de los lodos, para formar la estructura de los flóculos gránulos y biopelículas, aunque no se sabe con exactitud a cuál de ellos. Los iones divalentes se incorporan al lodo, dependiendo del número de sitios de unión disponibles en las moléculas exopoliméricas. El número de interacciones entre los iones y los exopolímeros puede ser determinado por medio de un análisis del equilibrio químico (Rudd y col., 1983). Una forma de determinar la proporción de iones en el lodo es por medio de la conductividad de la corriente eléctrica,

Revisión bibliográfica

ya que a medida que aumenta los iones en los lodos, su conductividad eléctrica aumenta. De esta manera pudo verse que cuando la concentración de los iones disminuye drásticamente en el lodo, se observó una pérdida de la sedimentabilidad. (Smidsrod, 1974). La cantidad de iones que se incorporan a los lodos puede determinar los arreglo y estructura de los lodos. El tamaño de los iones es importante. Se ha visto que el magnesio con un mayor radio atómico que el calcio influye, por impedimento estérico, en su unión con las cargas negativamente de los exopolímeros, lo que podría explicar por el calcio se encuentra en mayor proporción que los demás iones (Rudd y col., 1983; Forster, 1985). Los iones metálicos y los exopolímeros podrían formar la matriz del lodo. Se cree que los carbohidratos juegan un papel medular en la absorción de los iones metálicos (Rudd y col., 1983; Forster, 1985), aunque otros autores encuentran una fuerte correlación de los iones metálicos con las proteínas exopoliméricas (Urbain y col., 1993). Existen evidencias que las lipoproteínas, o las glicoproteínas, pueden ser las responsables de las uniones con los iones metálicos (Goodwin y Forster, 1985). Forster y Lewin (1972) han encontrado que el calcio es el ión que se une principalmente a los exopolímeros del lodo en comparación con magnesio y fierro. Eriksson y Alm (1991) observan que el calcio es el más abundante en el lodo seguido por el magnesio y el fierro. Por otra parte, Bruus y col.,(1992) han puesto de manifiesto la función del calcio en los agregados microbianos, puesto que al utilizar las propiedades del etilenglicol-bis (β -aminoetil eter)-N,N-ácido tetraacético (EGTA), un quelante específico para los iones calcio, encuentran como resultado la disgregación y la pérdida de la sedimentabilidad del lodo. Urbain y col., (1993) encuentran una fuerte correlación entre los ácidos nucleicos y el magnesio. Aunque los ácidos nucleicos son el resultado de la lisis celular y se encuentran en menor concentración que las proteínas y

carbohidratos exopoliméricos, por lo que hace difícil que estos dos componentes sean los responsables de la formación del lodo.

Iyo (1992) ha relacionado también al calcio con la sedimentabilidad de los lodos, a través del Índice Volumétrico del Lodo (IVL). Encontró que a medida que la concentración del calcio aumenta, la sedimentabilidad del lodo se incrementa. Todos estos resultados pueden dar idea de la importancia de los iones divalentes en el lodo nitrificante. No obstante, son sólo indicios, dado que no se cuenta con evidencias suficientes y claras que permitan mayor grado de certidumbre.

1.4.5 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO EXOPOLIMÉRICO

En los lodos nitrificantes, el ácido desoxirribonucleico exopolimérico (ADNEP) proviene de la lisis de los microorganismos, debida al envejecimiento y muerte microbiana, o podría estar también relacionado con los métodos de extracción de los exopolímeros (Zhang y col., 1999). Este tipo de compuestos se encuentra dentro de los exopolímeros de los lodos y, en todo caso, es sólo indicio de la cantidad de células lisadas. En general no se ha encontrado que el ADNEP juegue un papel importante en la sedimentabilidad o en la agregación de los lodos (Urbain y col., 1993), aunque se hace referencia frecuente a su presencia.

1.4.6 OTROS EXOPOLÍMEROS PRESENTES EN LOS LODOS

Existen algunos exopolímeros que han sido poco estudiados y que comprenden entre el 20 y 40% de los compuestos exopoliméricos totales. Entre ellos se encuentran los ácidos húmicos, ácido urónico y el alginato (Kintner y Van Buren 1982, Eriksson y Alm, 1991, Frolund y col., 1995).

Revisión bibliográfica

Los ácidos húmicos presentan una estructura polifenólica y están formados principalmente por ácidos fúlvicos o ligninas. Su procedencia y función en los lodos aún no ha sido determinada. Se cree que estos tipos de compuestos son incorporados al lodo de las aguas residuales (Jahn y Nielsen 1995; Jahn y Nielsen 1998), aunque también pueden ser encontrados formando los lodos nitrificantes, que son alimentados con medios litoautotróficos (Dignac y col., 1998).

Los ácidos urónicos son compuestos que forman la pared celular de algunos microorganismos y son parte de la estructura de los algínatos. Se encuentran en baja concentración en los lodos y no se han relacionado con la formación ni estabilidad de los lodos (Jahn y Nielsen 1995; Frolund y col., 1996; Jahn y Nielsen 1998; Dignac y col., 1998; Flemming y Wingender 2001).

Otro de los grupos contenidos en los exopolímeros son los algínatos, están constituidos por dos sustancias monoméricas el L-ácido glucurónico y el β -D ácido manurónico unidas por enlaces α 1-4. Los algínatos presentan grupos carboxilato que parece se unen selectivamente con el ion calcio (Smidsrod, 1974), pero en realidad no se ha comprobado de manera certera que esto suceda en el lodo. Aunque desde el punto de vista estrictamente químico, es posible, pero no se tienen evidencias que lo confirmen.

1.5 RELACION ENTRE LOS EXOPOLIMEROS Y LA SEDIMENTABILIDAD DE LOS LODOS

Los carbohidratos exopoliméricos han sido los más estudiados por diversos autores (Forster, 1985; Goodwin y Forster, 1985; Horan y Eccles, 1986; Morgan y col., 1990; Echevería y col., 1992; Urbain y col., 1993, Dignac y col., 1998; Bura y col., 1998;

Revisión bibliográfica

Flemming y Wingender 2001; Jang y col., 2001; Shin y col., 2001). Se cree que estos se unen a los iones divalentes (Forster, 1985). Cuando disminuye la concentración de los carbohidratos exopoliméricos en el lodo, su sedimentabilidad también disminuye (Magara y col., 1976; Goodwin y Forster, 1985; Horan y Eccles, 1986; Morgan y col., 1990; Echeverría y col., 1992; Urbain y col., 1993). Se ha considerado que los carbohidratos exopoliméricos son las cadenas (especie de columna vertebral) que conglomeran a los microorganismos en el lodo (Bura y col., 1998; Flemming y Wingender 2001; Jang y col., 2001; Shin y col., 2001), pero autores como Higgins y Novak, (1997) encontraron que cuando se utilizan enzimas para hidrolizar los carbohidratos exopoliméricos y proteínas exopoliméricas del lodo, la ruptura de estas últimas da como resultado una pérdida mayor de la sedimentabilidad del lodo, lo que podría indicar que las proteínas exopoliméricas son necesarias en la matriz del lodo. Sin embargo, hasta el momento, no existen reportes que les asignen funciones específicas. En años recientes se les ha encontrado una fuerte correlación con la sedimentabilidad de los lodos (Urbain y col., 1993; Flemming y Wingender 2001; Shin y col., 2001). Lo que ha motivado que varios estudios se enfoquen a la identificación de su posible papel en la sedimentabilidad y estabilidad de los lodos.

Los lípidos exopoliméricos se han relacionado también con la sedimentabilidad de los lodos, pero desde los estudios realizados por Goodwin y Forster, (1985), no hay evidencias que reafirmen la importancia de los lípidos exopoliméricos con la sedimentabilidad de los lodos. No obstante relevante entender cuál es el papel de los lípidos exopoliméricos en el lodo.

1.6 DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS EXOPOLÍMEROS

En la actualidad uno de los puntos críticos en la cuantificación de los exopolímeros es el método de extracción, a pesar de que se cuenta con una gran variedad de ellos con la finalidad de disgregar la estructura del lodo (flóculos, gránulos y biopelículas). Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas, por lo que hoy en día todavía no se cuenta con un método idóneo.

Los métodos de extracción se pueden agrupar en químicos, físicos y físico-químicos. Los químicos suelen ser muy drásticos, como los que se mencionan a continuación: extracción con ácido tricloroacético (Davies, 1955), hidróxido de amonio (Pavoni y col., 1972), con benceno caliente (Wallen y Davis, 1972), con hidróxido de sodio (Tezuka, 1973), con EDTA (Brown y Lester, 1980), y la más drástica de todas es la extracción con ácido sulfúrico (Sandford y Conrad, 1966). La mayoría de estos métodos tienen el inconveniente de que pueden también lisar las células del lodo. Dentro de los métodos físicos se encuentra la ultrasonificación (Friedman y col., 1968), la centrifugación (Jia y col., 1996), ultracentrifugación (Pavoni y col., 1972 Brown y Lester, 1980) y por calor o autoclave (Forster, 1971; Brown y Lester, 1980). Algunos de los métodos, como la centrifugación, suelen ser muy suaves para disgregar los lodos. Sin embargo, otros son más drásticos, como las temperaturas altas lo cual implica una probabilidad muy alta de rompimiento celular, dando como resultado que no se pueda comparar la concentración los exopolímeros de los diferentes lodos. También se emplearon métodos físico-químicos, entre los que se encuentra la centrifugación con formaldehído (Jia y col., 1996). Brown y Lester (1980), Zhang y col. (1999) llevaron a cabo un estudio comparativo encontrando diferencias en cuanto a la concentración de los exopolímeros extraídos (en el mismo lodo) y el grado de lisis provocado en las células, concluyéndose que la concentración de los exopolímeros

Revisión bibliográfica

varía dependiendo del método de extracción empleado. A partir de estos estudios se ha intentado encontrar un método de extracción para los exopolímeros con una lisis celular mínima y las concentraciones de exopolímeros sean homogéneas. Así, Frolund y col. (1994), utilizaron resinas de intercambio iónico para separar los exopolímeros; Azeredo y col. (1998) encuentran que una extracción con resinas de intercambio iónico y glutaraldehído libera una mayor cantidad de proteínas exopoliméricas del lodo con una menor lisis celular, que la extracción por medio de resinas de intercambio iónico propuesta por Frolund y col., (1994). Sin embargo, la técnica no ha sido ampliamente utilizada para la separación de exopolímeros. Un método que parece dar mejores resultados en la disgregación del lodo, y sin presentar evidente rompimiento celular, es el que utiliza quelantes como el EDTA, que quela al Ca^{++} , Mg^{++} y Fe^{++} (Nishicawa y Kuriyama, 1968). Como consecuencia de la utilización de los diversos métodos de extracción, los resultados encontrados en la literatura sobre caracterización y cuantificación no pueden ser plenamente comparados, siendo este un problema serio a resolver. A pesar de ello, utilizando el mismo método de extracción para el análisis de los exopolímeros, permite hacer comparaciones entre lodos distintos y entre sí mismos.

1.7 BIBLIOGRAFÍA

- Ahring, B.K., Schmidt, J. E. Winther-Nelsen, M., Macario, A.J. L., Conway de Macario, E. (1993) Effect of medium composition and sludge removal on the productions, composition, and architecture of thermophilic (550C) acetate-utilizing granule from an upflow anaerobic sludge blanket reactor . *Appl Environ Microbiol.* **59**. 2538-2545.
- Alphenaar, P.A., Perez, M.C., van Barkel, W. J.H. and Lettinga, G. (1992) determination of the permeability and porosity of aerobic sludge granules by size exclusion chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**. 795-799.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. and Srinath, E. G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **48**. 835-852.
- Applegate, D. H. and Bryers, J.D. (1991) Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilms removal processes. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 17-25
- Atkinson, B., Black, G. M., Lewis, P. J. S. and Pinches, A. (1979) Biological particles of given size, shape and density for use in biological reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **21**.193-199.
- Azeredo, J., Oliveira, R. and Lazarova, V. (1998) A new method for extraction of exopolymers from activated sludge *Wat. Sci. Tech.* **37**: 367-370.
- Bishop, P. L. and Kinner, N. E. (1986) Aerobic fixed-film process. *In: Biotechnology Microbial degradation*, Vol. **8**: pp.116-176. Schönborn W.ed. VCH Publisher, N. Y.
- Bock, E., Koops, H. P. and Harms, H. (1986) *In* "Nitrification" Vol **20** pp 17-38.(J. I. Prosser ed.). Especial publications of the Society for General Microbiology.
- Bock, E., Koops, H. P., Harms, H. and Ahlers, B. (1991) The biochemistry of nitrifying microorganism. *In: Variations in: Autotrophic Life*, Vol. **15** pp 171- 200, ed. Academic Press London.
- Brayer, J. D. (1981) Biological activate surfaces: Processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnol. Progr.* **3**. 57-68.
- Brayers, J. and Characklis, W (1981) Early fouling biofilm formation in a turbulent flowsystem: overall Kinetics. *Wat. Res.***15**. 483-491.
- Brown, M. J. and Lester, J. N. (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology.* **40**. 179-185.

Revisión bibliográfica

- Bruus, J.H., Nielsen, P.H. and Keiding, K. (1992) On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering . *Wat. Res.* **2**. 1597-1604.
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J. and Wolfe, R. S. (1967) Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.* **59**. 20-31.
- Bura, R., Cheung, M., Liao, B., Finlayson, J. Lee, B. C. Droppo, I. G., Leppard, G. G. and Liss, S. N. (1998) Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge flocs matrix. *Water Sci. Tech.* **37**. 325-333.
- Characklis, W. G. (1990) Laboratory biofilm reactors. In Biofilms (Edited by Characklis W. G. and Marshall K. C.). pp 55-89. Wiley, New York.
- Chausset, M. N. (1989) Synthèse et étude physico-chimique de polymères amphiphiles: application á la dépollution des eaux. DEA report. *Université Pierre et Marie Curie, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Paris, France.* Pp.45
- Clauss, F., Helaine, D., Balavoine, C. and Bidault, A. (1998) Improving activated sludge floc structure and aggregation for enhanced settling and thickening performances. *Wat. Sci. Tech.* **38**: 35-44.
- Cole, J. A. and Brown, C. M. (1980) Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* **7** 65-72.
- Costerton, J. W. and Colwell, R. R. (1979) Native aquatic bacteria: unenumeration, activity, and ecology. *ASTM Special Tech. Publ., Minneapolis.* pp. 65-68.
- Cuervo-Lopez, F. M., Martinez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Noyola, R. A. And Gómez, J.(1999) Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* **40**: 123-130
- Cybis, L. F De A. and Horan, N. J. (1997) Protozoan and Metazoan populations in sequencing batch reactors operated for nitrification and/or denitrification. *Water Sci. Tech.***35**. 81-86.
- Dahab, M. F. and Lee, Y. W. (1988) Nitrate removal from water supplies using biological denitrification. *J. Water Poll. Control Fed.* **60**. 1670-1674.
- Davies, D. A. L. (1955) The specific polysaccharides of some gram negative bacteria *Biochem J.* **59**. 696-704.

Revisión bibliográfica

- De Graaf, F. K. and Mooi, F. R. (1986) "The fimbrial adhesions of *Escherichia coli*." Advances in microbial physiology, A.H. Rose and D. W. Tempest, eds., Academic Press Inc., London, England.
- Digger, G.T., Robbins, M. H. and Marshall, B. R. (1985) The design of a selector to control low F/M filamentous bulking. *J. Pollut. Control Fed.* **57**. 220-2226.
- Dignac, M. F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D. and Scribe, P., (1998) Chemical description of extracellular polymers: Implications on activated sludge floc structure. *Water Sci. Tech.* **38**, 45-53.
- Echeverria E., Seco A. and Ferrer J. (1992) Study of factors affecting activated sludge settling in domestic wastewater treatment plants. *Water Science Tech.* **25**. 273-279.
- Eighmy, T., Maratea, D. and Bishop, P. (1983) Electron microscopic examination of Waste Water biofilm formation and structural componentes. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**. 1921-1931.
- Eikelboom, D. H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Wat. Res.* **9**. 365-388.
- Eikelboom, D. H. and Van Buijsen, H. J. J. (1981) "Microscopic sludgeinvestigation manual" TNO Research Institute for Environmental Hygiene. The Netherlands.
- Eilersen, A., Henze, M. and Kloft, L. (1994) Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Wat. Res.* **28**, 1329-1336.
- Eriksson, L. and Alm, B. (1991) Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. *Wat. Sci. Tech.*, **24**. 21-28.
- Eriksson, L. and Axberg, C. (1981) Direct influence of wastewater pollutants on flocculation and sedimentation behavior in biological wastewater treatment. I Modelsystem *Escherichia coli* B. *Water Res.* **15**. 421-431.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects. *Water Sci. Tech.* **43**. 9-16.
- Ford, T., Sacco, E., Black, J., Kelly, T., Goodacre, R., Berkeley, R. C. W., and Mitchel, R. (1991) Characterization of exopolymers of aquatic bacteria by pyrolysis-mass spectrometry. *Appl. Evir. Microbiol.* **57**. 1595-1601.
- Forster, C. F. (1971) Activated sludge surfaces en relation to the sludge volume index. *Wat. Res.* **5**. 861-870.
- Forster, C. F. (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge-I. *Wat. Res.* **19**. 1259-1264.

- Forster, C. F., (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge-II : The binding of polyvalent metals *Water Res.* **19**. 1265-1271.
- Forster, C. F. and Lewin, D. C. (1972) Polymer interactions at activated sludge surfaces. *Effl. Wat. Treat. J.* **12**, 520-525.
- Fox, A., Gilbert, J. and Morgan, S. L. (1990) Analytical microbiology: a perspective. In: *Analytical Microbiology Methods*. Plenum Press. 1-17.
- Friedman, B. A., Dugan, P. R., Pfister, R. M. and Remsem, C. A. (1968) Fine structure and composition of the zoogloal matrix surrounding *Zoogloea ramigera*. *J. Bacteriol.* **95**. 2144-2153.
- Frolund, B., Keiding, K. and Nielsen, P. H. (1994) A comparative study of biopolymers from a conventional and an advanced activated sludge treatment plant. *Water Science Tech.*, **29**. 137-1441.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nilsen, P. H., (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res.* **30**. 1749-1758.
- Frolund, B., Griebe, T. and Nielsen, P. H. (1995) Enzymatic activities in the activated sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**. 755-761.
- Ganaye, V. A., Keiding, K., Viriot, M. L., Vogel, T. M. and Block, J. C. (1997) Evaluation of soil organic matter polarity by pyrene fluorescence spectrum variations. *Environ. Sci. Tech.* **31**. 2701-2706.
- García, G. M. (1982) Relations between acidogenesis and the utilization of lactate sulfate and nitrate, during anaerobic digestion. Segundo Simposio Panamericano de combustibles y Productos Químicos Vía Fermentación. "Avances en digestión Anaerobia" Octubre. México.
- Gómez, H. G. J. (1994) Obtención de microflora nitrificante: nitrificación en diferentes condiciones de cultivo. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Goodwin, J. A. S. and Forster, C. F. (1985) A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Wat. Res.* **19**. 527-533.
- Grant, M.A., Cronin, S. E., and Hochstein, L. I. (1984) Solubilization and resolution of the membrane-bound nitrite reductase from *Paracoccus halodenitrificans* into nitrite and nitric oxide reductases. *Arch. Microbiol.* **140**. 183-186.
- Gray, N. F. (1989) Biology of wastewater treatment. Oxford University, Oxford.

Revisión bibliográfica

- Grotehuis, J. T. C., Koornneef, E., and Plugge, C. M. (1988) Immobilization of anaerobic bacteria in methanogenic aggregates. Pp42-47. In G. Lettinga, A. J. B., Zehnder, J. T. C., Grotehuis, J. T. C., and Hulshoff Pol, L. W. (eds). Granular anaerobic sludge; microbiology and technology, Puduc Wageningen. The Netherlands.
- Grotehuis, J. T. C., Smit, M., van Lammeren, A.A. M., Stams, A. J. M., Zehnder, A. J. B. (1991) Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**. 115-119.
- Harris, R. H., and Mitchell, R. (1973) The role polymers in microbial aggregation. *A. rev. Microbiol.* **27**. 27-50.
- Guyot, J. P., and Ramirez, F. (1989) Inhibition of acetate degradation by formate. *Biotechnol. Lett.* **11**. 365-368.
- Guyot, J. P. (1992) Introducción a la microbiología de la digestión anaerobia, en bioprocesos anaerobios para el tratamiento de efluentes industriales. Mayo UAM-I. México.
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J. C. and Arvin, E. (1996) Basic biological processes. In: Wastewater treatment: Biological and chemical processes. 2^a eds, Springer-Verlang, Berlin.
- Hermansson, M. (1999) The DLVO theory in microbial adhesion *Colloids Surf. : Biointerfaces.* **14** 115-119.
- Higgins, M. J. and Novak L.T. (1997) Characterization of exocellular protein and its role in biofloculation. *J. Envir.Engineering.* **123**. 479-485.
- Hooper, A. B., Vanelli T., Bergmann D. J., Arciero, D. M. (1997) Enzymology of the oxidation of amonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**. 59-67.
- Horan, N. J. and Eccles, C. R. (1986). Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Wat. Res.* **20**. 1427-1432.
- Huber, S., Minnebusch, S., Wuertz, S., Wilderer, P.A. and Helmreich B., (1998) Impact of different substrates on biomass protein composition during wastewater treatment investigated by two-dimensional electrophoresis. *Water Sci Technol* **37**. 363-366.
- Humphrey, B. A.,m Dickson, M. R. And Marshall, K. C. (1979) Physicochemical and in situ observations of gliding bacteria to surfeces. *Arch. Microbiol.* **120**. 231-238.
- Hunter, K. and Liss, P. (1982) Organic matter and the surface charge on suspended particles in estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* **63**. 263-279.

Revisión bibliográfica

- Iyo, T., Yoshino, T. and Ohno, S. (1992) Suppressive effects on filamentous bulking by addition of corn cob flour and divalent metal ions. *Water Sci. Tech.* **26**. 2493-2496.
- Jackson, M. a., Tiedje, J. M. and Averrill, V. A. (1991) Evidence for an NO-rebound mechanism for production of N₂ from nitrite by the cooper-containing nitrite reductase from *Archromobacter cycloclastes*. *FEBS Lett.* **291**. 41-44.
- Jahan, A. and Nielsen, P. H. (1995) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Water Sci. Tech.* **32**. 157-164.
- Jahn, A. and Nilsen, P. H., (1998) Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci. Tech.* **37**. 17-24.
- Jang, A., Kim, S. M., Kim S. Y., Lee, S. G. and Kim, I.S. (2001) Effect of Heavy metals (Cu, Pb and Ni) on the compositions of EPS in biofilms. *Water Sci. Tech.* **43**. 41-48.
- Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G.T. (1986) Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming. *Wat. Res, Commission Pretoria*.
- Jia, X. S., Furumai, H. and Fang, H. H. P. (1996) Extracellular polymers of hydrogen-utilizing methanogenic and sulfate-reducing sludge. *Wat. Res.* **30**. 1439-1444.
- Jorad, F., Boue-Bigne, F., Block, J. C. and Urbain, V. (1998) Hidrophobic/hidrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci. Tech.* **37**. 307-315.
- Jorand, F., Guicherd, P., Urbain, V., Manem, J. and Block, J.C. (1994) Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory grown bacteria. *Water Sci. Tech.* **30**. 211-218.
- Jorand, F., Zartarian, F, Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G, Urbain, V. and Manem, J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Wat. Res.* **29**. 1639-1647.
- Kakii, K., Kitamura, S., Shirakashi, T. and Kuriyama, M. (1985) "Effect of calcium ion on sludge characteristics." *J. Fermentation technol.* **63**. 263-270.
- Kintner, P. K. and van Buren, J. P. (1982) Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using m-hydroxydiphenyl method. *J. food Science.* **47**. 756-760.
- Lazarova, V. and Manem, J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res.* **29**. 2227-2245.
- Lazarova, V., Capdeville, B. and Nikolov, L. (1992) Biofilm performance of fluidized bed biofilm reactor for drinking water denitrification. *Water Sci. Tech.* **26**. 555-566.
- Lees, H. (1952) Hydroxylamine as an intermediate in nitrification. *Nature (London)* **169**. 156-157.

- Li, D. H. and Ganczarczyk, J. J. (1990) Structure of activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*. **35**. 57-65.
- Magara, Y., Nambu, S. and Uotosawa, K. (1976) Biochemical and physical properties of an activated sludge on settling characteristics. *Water Res.* **10**. 71-77.
- Marshall, K.C., Stout, R. and Mitchell, R. (1971) Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surface. *J. Gen. Microbiol.* **68**. 337-348.
- Martinez, F., Favela-Torres, E. and Gomez, J., (2000) Oscillations of exopolymeric composition and sludge volume index in nitrifying flocs. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **87**. 177-187.
- Michael, G.R., Shimizu, G. P. and Jenkins, D. (1985) The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57**. 1152-1162.
- Mikkelsen, L. H. and Keidind, K. (1999) Equilibrium aspects of the effects of shear and solids content on aggregate deflocculation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **80**: 151-182.
- Mikkelsen, L. H. and Nielsen, P. H. (2001) Quantification of the bond energy of bacteria attached to activated sludge floc surfaces. *Wat. Sci. Tech.* **43**. 67-75.
- Mirelman, D. and Ofek, I. (1986) "Introduction to microbial lectins and agglutinins." Microbial lectins and agglutinins. D. Mirelman, ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Mitteelman, M. W., Nivens, D.E., Low, C. and Whit, D. C. (1990) Differential adhesion, activity, and carbohydrate: protein ratios of *Pseudomonas atlantica* monoculture attaching to stainless steel in a linear shear gradient. *Microbiol. Ecol.* **19**. 269-278.
- Monroy, O., Fama, G., Meraz, M., Montoya, L. and Macarie, H. (2000) Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. *Wat. Res.* **34**. 1803-1816.
- Morgan, J.W., Forster C. F. and Evison L. (1990) A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludge. *Water Res.* **24** 743- 750.
- Nilsen, P. H., Jahn, A. and Palmgren, R. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci. Tech.* **36**. 11-19.
- Nilsen, P.H., Raunkjaer, K., Norsker, N. H., Jensen, N. A. and Hvitved-Jacobsen, T. (1992) Transport of wastewater in sewer systems. *Water Sci. Tech.* **25**. 17-31
- Nishicawa, S. and Kuriyama, M. (1968) Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge. *Water Res.* **2**. 811-812.

Revisión bibliográfica

- Novák, L., Larrea, L., Wanner, J. and Garcia-Heras, J. L. (1993) Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Wat. Res.* **27**. 1339-1346.
- Pavoni, J. L., Tenney, M. W. and Echelberger, W. F. (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation *J. Water Pollut. Control Fed.* **44**. 414-431.
- Pedersen, K. (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Wat. Res.* **24**. 239-243.
- Perez, J.T. (1998) Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis de maestria. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico.
- Pipes W. (1978) Microbiology of activated sludge bulking. *Adv. Appl. Microbiol.* **24**. 85-127.
- Prosser, J. I. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**. 125-181.
- Ratsak, C. H., Maarsen, K. A. and Kooijman, S.A.L.M. (1996) Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. *Wat. Res.* **30**. 1-12.
- Rudd, T. Sterrit, R. M. and Lester, J. W. (1983) Extraction of extracellular polymers from activated sludge. *Biotech. Lett.* **5**. 327-332.
- Rudling, L. and Solyon, P. (1974) The investigation of biodegradability of branched nonyl phenol ethoxilates. *Wat. Res.* **8**. 115-119.
- Ruter, P. R., Dazzo, F. B., Freter, R., Gingell, D., Jones G. W., Kjelleberg, S., Marshall, K. C., Mrozek, H., rades-Rohkohl, E., Robb, I. D., Silverman, M., Tylewska, S. (1984) Mechanisms of adhesion. Pp. 5-20. In: K. C. Marshall (ed) Microbial adhesion and aggregation. Springer-Verlag. Berlin.
- Samuelsson, M. O. and Kirchman, D. L. (1990) Degradation of adsorbed protein by attached bacteria in relationship to surface Hidrophobicity. *Appl. Envir. Microbiol.* **56**. 3643-3648.
- Sandford, P. A. and Conrad, H. E. (1966) The structure of *Aerobacter aerogenes* A3 (S1) polisaccharide. I. A. Re-examination using improved procedures for methylation analysis. *Biochemistry.* **5**. 1508-1517.
- Sato, T. and Ose, Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Wat. Res.* **14**. 333-338.
- Schlegel, H. G. (1988) General microbiology. 6th edition. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

- Scheible O.K. and Heidman, (1994) Nitrogen control. U. S. Environmental Protection Agency, Washington D. C., Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pennsylvania, U. S. A.
- Sharon, N. and Ofek, I. (1986) Mannose specific bacterial surface lectins. “ *Microbial lectins and agglutinins*, D. Mirelman, ed., John Wiley & Sons, Inc., New York. N. Y.
- Shin, H. S., Kang, S. T., and Nam, S. Y. (2001) Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics *Water Sci. Tech.* **43**, 193-196.
- Shreve, G. S., Olsen, R. H. and Vogel T. M. (1991) Development of pure culture biofilms of *P. Putida* on solid supports. *Biotechnol. Bioengng.* **37**. 512-518.
- Smidsrod, O. (1974) Molecular basis for some physical properties of alginates in the Gel state. *Faraday Discuss. Chem, Soc.* **57**. 263-274.
- Steiner, A. E., McLaren, D. A. and Forster, C. F. (1976) “ The nature of activated sludge flocs.” *Water Res.* **10**. 25-30.
- Stichová, O. (1990) Study of the mechanism of biological enhanced phosphorus removal in SBRs. M. Sc. Thesis, *Prague Institute of Chemical Technology*, Prague
- Struijs, J., Stoltenkamp, J. and Forster C. F. (1991) A spreadsheet-based model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant. *Wat. Res.* **25**. 891-900.
- Sutherland, I. W. (1977) Microbial exopolysaccharide synthesis. *Am Chem. Soc. Symp. Ser.* **45**. 40-56.
- Sutherland, I. W. and Wilkinsin, J. F. (1971) Chemical extraction methods of microbial cell. *Methods in Microbiology*. Vol. 5B Chap. 5 Academic Press. London.
- Tacana, K., Tada, M., Kimata T., Harada, S., Fujii, Y. (1991) Development of new nitrogen removal system using nitrifying bacteria immobilized in synthetic resin pellets. *Water Sci. Tecnol.* **23**. 681-690.
- Takai, T., Hirata, A., Yamauchi, K. and Inamori, Y. (1997) Effects of temperature and volatile fatty acids on nitrification-desnitrification activity in amall-scale anaerobic-aerobic recirculation biofilm process. *Water Sci. Tech.* **35**. 101-108.
- Takiguchi, Y. (1972) Purification of the mucilage in activated sludge and its physico-chemical properties. *J. Ferment. Technol.* **50**. 331-340.
- Tezuka, Y. (1973) A Zoogloea bacterium with gelatinous mucopolysaccharides matr. *J. Water Pollut. Control. Fed.* **45**. 531-536.

- Trulear, M. G. and Characklis, W. G. (1982) Dynamics of Biofilm process. *Journal Water Pollut. Control fed.* **54**. 1288-1301.
- Urbain, V., Block, J. C. and Manem, (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach., *Wat. Res.* **27**. 829-838.
- Van Leeuwen, J. (1988) Ozonation for non-filamentous bulking control in a activated sludge plant treating fuel synthesis waste water. *Water S.A.* **15**. 127-132.
- Van Loostrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. (1993) Biofilm bioreactors for wastewatertreatment. *Trends Biotechnlo.* **11**. 39-46.
- Wallen, L. L. and Davis, E. N. (1972) Biopolymers of activated sludge. *J. Environ. Sci. Technol.* **6**. 161-164.
- Watson, S. W. and Hobbie, J. E. (1979) mesurement of bacterial biomass as lipopolysaccharide. In *Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity and Ecology* (Edited by Costerton J. W.). ASTM Spec. Tech. Publ., pp 82-88. University of Calgary. Md.
- Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.P. and Hooper, A. B. (1989) Nitrifying bacteria. Secc. 20: Aerobic chemolitotrophic bacterias an associated organims. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*. Volume 3. 8^a ed. 1807-1834.
- Wood, D. K. and Tchobanoglous, G. T. (1974) Trace elements in bilogical waste treatment with specific reference to the activated sludge process. Presented at the 29th *Industrial Waste Conference, Purdue University, IN.*
- Wood, P. M., (1986) In "Nitrification" (J. Y. Prosser, ed.). Special Publications of the Society for General Microbiology., Vol. 20 pp39-62. IRL. Press Oxferd Washington DC.
- Zehnder, A. J. B., Huser, B. A., Brock, T. D., and Wihrman, K. (1980) Characterization of an acetate-descarboxylating non-hydrogen oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.* **124**. 1-11.
- Zhang, X., Bishop, P. L. and Kinklr B. K. (1999) Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Wat. Sci. Tech.* **39**. 211-218.
- Zita, A. and Hermansson, M. (1987) Effects of bacterial cell surface structure and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**. 1168-1170.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo se dividió en dos secciones.

En el primero se describe la metodología que se utilizó, en donde se describen las acciones experimentales y su secuencia. En la segunda sección se describe en forma detallada los métodos analíticos utilizados durante todo el trabajo experimental.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. INÓCULO

El inóculo fue obtenido a partir de excremento de bovino y adaptado durante dos años en reactores de tanque agitado, en condiciones nitrificantes. La concentración de sólidos suspendidos (la biomasa) en el lodo adaptado, al momento de inocular los reactores, fue 0.41 g/L. El mismo inóculo fue utilizado para todos los reactores (tres reactores de tanque agitado y dos reactores airlift).

2.2 MEDIO DE CULTIVO

Se diseñó un medio de cultivo quimiolitotrófico para la nitrificación, dividido en dos disoluciones por separado para evitar la precipitación de algunos de sus componentes. En uno (medio A) se incluyó la fuente de nitrógeno y en el otro (medio B) la fuente de carbono. Ambos medios fueron utilizados sin esterilizar. La composición de ambos medios se muestra en la Tabla 2.1. Los medios (A y B) fueron empleados para la alimentación continua de los reactores, de tanque agitado y los reactores airlift.

Tabla 2.1 Composición química del medio de cultivo para un proceso nitrificante.

MEDIO A (g/L)		MEDIO B (g/L)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.16	CaCl	0.4
KH ₂ PO ₄	1.38	NaHCO ₃	40
MgSO ₄	0.57	FeSO ₄	0.15
NaCl	0.99		
NH ₄ Cl	0.90		

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LOS REACTORES EN CONTINUO

Se trabajó con tres reactores de tanque agitado con recirculación y dos reactores airlift. Los reactores de tanque agitado se operaron con un volumen de trabajo de 2 litros a los reactores se acopló un sedimentador de un litro. El tiempo de residencia hidráulica (TRH) fue de tres días. La temperatura se controló a 28⁰C por medio de un serpentín metálico dentro del reactor, el cual fue conectado a un recirculador con agua a temperatura constante. La agitación, fue por medio de impulsión a 300 rpm. Los reactores de tanque agitado fueron aireados a 65% de saturación. El pH se mantuvo a 7.0 por la adición de NaHCO₃ (medio B). La relación C/N para la alimentación de los reactores de tanque agitado fue de 1.5.

En los reactores airlift se tuvo un volumen de trabajo de 2.3 L. El TRH fue de 0.115 días. La temperatura fue controlada dentro de una incubadora a 28⁰C. El flujo de aire fue de 20 mL/min. El pH se mantuvo a 7.0 por la adición de NaHCO₃ (medio B). La relación C/N en los reactores airlift fue de 1.5. Todos los reactores fueron operados durante un periodo de por lo menos 150 días.

En los cinco reactores se llevó a cabo el proceso nitrificante. Uno de los reactores de tanque agitado fue tomado como referencia (RNR) y se operó bajo condiciones litoautotróficas, alimentándolo con bicarbonato como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno y de energía. El RNR se alimentó con una velocidad de carga de N-NH₄ 0.15 g/L*d. Los dos reactores de tanque agitado restantes fueron conectados, cada uno, en línea a un reactor desnitrificante, con el objeto de determinar el efecto de la materia orgánica sobre el proceso respiratorio nitrificante (Figura 2.1) y bajo estas condiciones establecer el régimen estacionario nitrificante.

El segundo reactor nitrificante de tanque agitado (RNA), fue puesto en línea con un reactor desnitrificante alimentado con acetato. El reactor desnitrificante se alimentó a una velocidad de carga de C-acetato ($Q_{(i)c-acet}$) 1.2 ± 0.1 g/L•d.

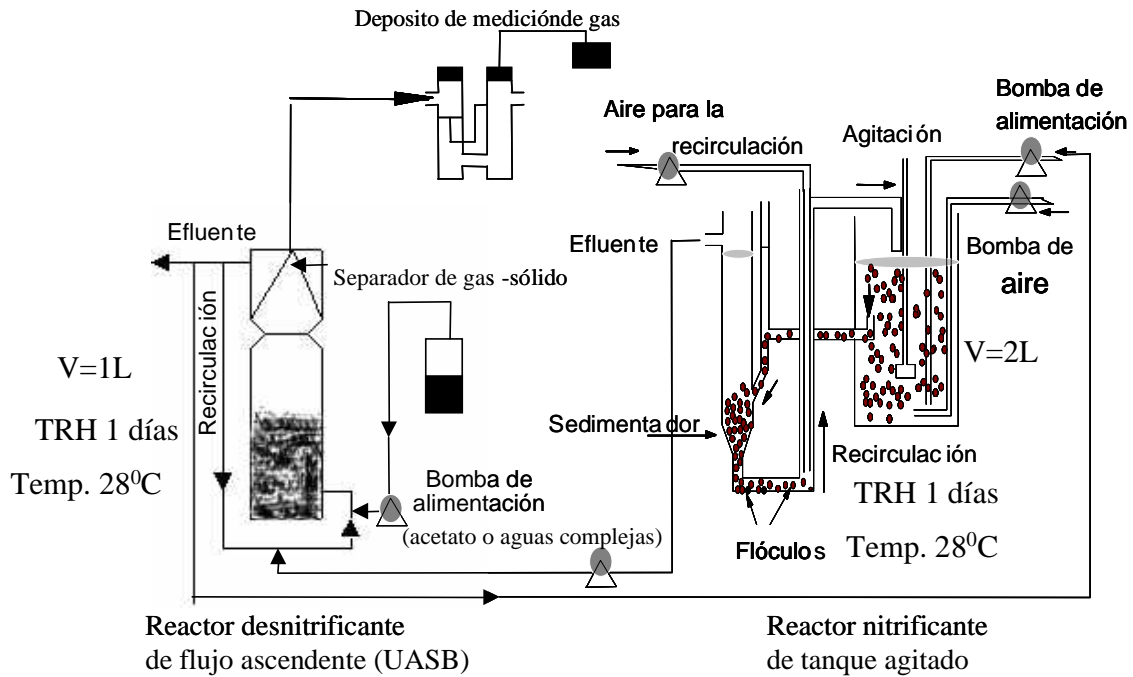


Figura 2.1 Esquema del acoplamiento del reactor desnitrificante con un reactor nitrificante

El tercer reactor nitrificante de tanque agitado (RNOC), fue acoplado a un reactor desnitrificante alimentado con agua residual compleja (provenientes de una industria conservera), el cual fue alimentado con una velocidad de carga ($Q_{(i)carb}$) de 1.15 ± 0.15 .

La diferencia entre los dos reactores airlift fue la formación de la biopelícula. En uno de ellos la biopelícula se obtuvo utilizando como soporte basalto (RNAB). En el otro la biopelícula se obtuvo a partir de flóculos (RNAF). Ambos reactores trabajaron a una

velocidad de carga de 3.8 g/L*d de N-NH₄. Los dos reactores fueron operados hasta establecer el régimen estacionario nitrificante.

2.3.2 TOMA DE LA MUESTRA

Del reactor completamente homogenizado se tomaron 100 mL de muestra (diariamente) y se determinó:

- a) Exopolímeros
- b) Amonio
- c) Nitrito y nitrato
- d) SST, SSF y SSV
- e) IVL
- f) Proteína
- g) Carbohidratos
- h) Lípidos

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 MEDICIÓN DE AMONIO

El electrodo de amonio es un intercambiador de electrones, dispositivo que es sensible a cambios de potencial electroquímico. Estos cambios de potencial son generados al poner en contacto el electrodo en una solución de cloruro de amonio al 0.53%, separado de la muestra por una membrana selectiva. Ambas soluciones producen un potencial a través de la membrana, que es detectado por el electrodo y medido en milivots por un potenciómetro. Esta técnica de electrodo selectivo (pHonenix Electrode Co.), se usó para determinar el amoniaco, cuya respuesta de linealidad se produce en un intervalo de 0.01 a 1000 mg/L de

amoníaco. Las lecturas en milivolts se hicieron con un potenciómetro Cole-Parmer (DigiSense), bajo una agitación magnética constante y a temperatura ambiente. El electrodo se colocó con una inclinación de 45° para evitar la formación de burbujas que interfieran con la lectura.

2.4.1.1 Procedimiento

Preparación de muestras para cuantificar amonio. A 49.5 ml de muestra se alcalinizan con 0.5 ml de hidróxido de sodio 10M. El electrodo se calibra con soluciones estándar de 25, 50, 100, 250 y 500 mg/L de amonio. Las muestras deben medirse inmediatamente después de prepararse. Se sugiere no almacenar muestras de cultivo en refrigeración, pues aún a bajas temperaturas puede presentarse actividad por los microorganismos, de manera que el valor medido de amonio puede ser incorrecto. Las lecturas se toman cuando el valor en milivolts del potenciómetro es estable (unos tres minutos). Este valor es proporcional al logaritmo de la concentración (ASTM,1992). La curva de calibración se observa en la Figura 2.2.

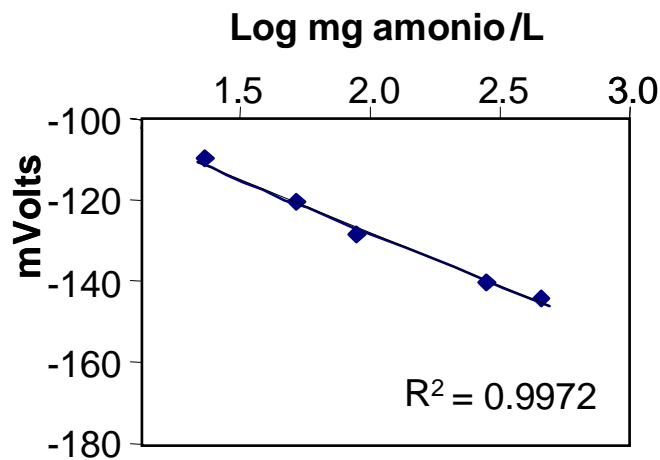


Figura 2.2 Curva calibración para amonio—línea de ajuste \blacklozenge valor experimental, con pendiente (m), -0.111 ± 0.006 e intersección (b), -93.650 ± 2.81 . El valor de la dispersión corresponde a 15 calibraciones.

2.4.2. CUANTIFICACIÓN DE NITRITO Y NITRATO

La electroforesis capilar es un proceso en el cual las especies cargadas (iones) se separan en función a sus distintas velocidades de migración en un campo eléctrico. Las separaciones electroforéticas se originan por las diferentes movilidades de los solutos. La movilidad electroforética es proporcional a la carga del soluto e inversamente proporcional a la fuerza de fricción o retraso, las cuales dependen de la forma y tamaño del analito, así como de la viscosidad del medio. Las propiedades del disolvente, tales como la fuerza iónica, pH y la constante dieléctrica, influyen sobre la carga efectiva del soluto, y en el caso de moléculas grandes, sobre su forma y tamaño hidrodinámico (Li, 1993).

La detección y cuantificación de nitrato y nitrito se llevó a cabo por medio de electroforesis capilar (Wang y col., 1985). Este método se realizó con un analizador de iones (CIA 4000, de Millipore). Se usó una columna de sílice fundida de 60 cm de largo y 70 μ de diámetro interno, bajo una corriente de 30 mA y un voltaje de 20 KV. El tiempo de toma de muestra por el equipo fue de 4 segundos y el tiempo de corrida de 3 minutos. Se utilizó un tiempo de 2 minutos de purga para lavar el capilar con electrolito nuevo. La absorbancia se midió en la región del ultravioleta a 212 nm. La temperatura a la cuál se realizó la electroforesis fue de 26⁰C (Gómez, y col., 1996).

2.4.2.1 Procedimiento

Para la electroforesis capilar se preparó un electrolito de Na₂SO₄ 0.1 M para transmitir la corriente eléctrica. Se tomaron 10 mL de la solución de Na₂SO₄ 0.1 M y se le agregaron 3 mL de OFM Anion-BT (Waters), y se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Se preparó una solución de nitrito y nitrato de sodio a 500 ppm (cada uno) en agua desionizada. Se hicieron disoluciones con diferentes concentraciones de nitrito y nitrato en

Material y Métodos

un intervalo de 5 a 500 ppm para determinar la linealidad de la respuesta, se encontró que el área bajo la curva fue directamente proporcional a la concentración. La reproducibilidad de la medida fue siempre mayor que 95%.

Preparación de la muestra para el análisis en el CIA: Se filtran 1 ml de muestra con ayuda de una membrana de 13 mm de diámetro y con 0.45μ de tamaño de poro. Del filtrado se tomaron 0.5 mL y se depositaron en un vial Eppendorf, evitando la formación de burbujas.

Cada tres muestras, se midió un estándar de concentración conocida para determinar el estado de calibración del equipo. Los análisis se hicieron al menos por duplicado. Para la programación del equipo y el análisis de los resultados se usó el paquete de software *Máxima*. La concentración del nitrato en la muestra se midió haciendo una dilución 1: 10 con agua desionizada, para obtener una lectura dentro del intervalo de la curva de calibración.

2.4.3 MEDICIÓN DE LOS SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES (SST), SÓLIDOS SUSPENDIDOS FIJOS (SSF) y SÓLIDOS SUSPENDIDOS VOLÁTILES (SSV).

La medición de SST se realizó por gravimetría, (APHA, 1985). Se usaron muestras de 20 mL (por duplicado). Se emplearon filtros de fibra de asbesto, los cuales se colocaron en una mufla a 550°C durante una hora, posteriormente en una estufa a 105°C (15 min). El proceso se repitió hasta tener un peso constante de los filtros de asbesto. La muestra fue filtrada con la ayuda de una bomba de vacío. Los filtros con la muestra se pasan a una estufa a 105°C (una hora) y después se llevaron a un desecador (15 min). Esto se repite hasta tener un peso constante. Los sólidos suspendidos totales (SST) se obtienen de la siguiente manera (peso en gramos):

$$\text{SST (g/L)} = \text{PM} - \text{PF} / \text{V}$$

PM = Peso en gramos del filtro más muestra (g)

PF = Peso en gramos del filtro (g)

V = Volumen de la muestra (L)

Los sólidos suspendidos fijos (SSF) se obtienen calcinando el filtro más la muestra, en la mufla a 550⁰C (30 min).

$$\text{SSF g} = \text{PMC} - \text{PF} / \text{V}$$

PC = Peso en gramos del filtro más la muestra calcinados(g)

PMF = Peso en gramos del filtro (g)

V = Volumen de la muestra en litros (L)

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se calculan de la siguiente manera.

$$\text{SSV} = \text{g SST} - \text{gSSF}$$

2.4.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE VOLUMÉTRICO DEL LODO (IVL)

El IVL se define como el volumen en mililitros ocupado por un gramo de lodo en suspensión después de 30 minutos de sedimentación (APHA 1985). Este parámetro es usualmente utilizado para determinar características de sedimentabilidad del lodo. Aunque este método no tiene un soporte teórico, la experiencia ha mostrado que puede ser útil como un proceso de rutina y de comparación entre diferentes lodos, siempre que en todos los casos se siga el mismo procedimiento. En este trabajo se realizó una modificación del método estándar, la cual consistió en emplear un cono de Imhoff, en lugar de un cilindro graduado. Para calcular el IVL se necesita determinar el volumen de sedimentabilidad del

lodo. Para esto se usó el cono de Imhoff y un volumen de 100 mL del lodo del reactor en suspensión. El volumen sedimentado se midió después de 30 minutos. Con los SST se procedió a determinar el IVL, de la siguiente manera

$$\text{IVL (ml/g)} = \text{SV}_{30} \text{ (ml L)} / \text{SST (g/L)}$$

SV_{30} = Volumen sedimentado del lodo en 30 minutos

SST = Sólidos suspendidos totales

2.5. EXTRACCIÓN DE LOS EXOPOLÍMEROS

De los 50 mL de muestra extraídos del reactor, se tomaron 15 mL y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos, separando el sobrenadante del sedimento. El sobrenadante se filtra por medio de una membrana de celulosa regenerada de 0.45 μ de poro. Al filtrado se le determina proteína (Lowry y col., 1951) y carbohidratos (Dubois y col., 1956). Al sedimento se le agrega 15 mL de EDTA 0.1M, se agita con ayuda de un vortex durante 10 minutos, se centrifuga nuevamente a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Del sobrenadante que representa la fracción exopolimérica, se toman 3 mL para determinar carbohidratos y 3 mL para medir los lípidos (Frings y Dunn, 1970). El sobrenadante restante, se dividen en dos fracciones de 4 y 5 mL. Ambas se colocan en bolsas de diálisis de 12 kDa de tamaño de corte para separar el EDTA y eliminar interferencias y poder medir proteína, y hacer el análisis electroforético. La diálisis se llevó a cabo con agua desionizada y en refrigeración durante tres días, recambiando diariamente el agua desionizada. Terminada la diálisis, a la bolsa con 4 mL, se le determina proteína. Por último, la bolsa de diálisis que contienen los 5 mL se concentra para llevar a cabo la electrofóresis en gel de poliacrilamida. La bolsa cerrada de 5 mL, se pone en un recipiente y se cubre con goma arábiga para que absorba el

agua de la bolsa de diálisis, hasta llegar a un volumen de 0.5 mL. El concentrado se extrae de la bolsa, se deposita en un tubo Eppendorf y se almacena en congelación hasta su análisis.

2.6 MÉTODOS PARA DETERMINAR EXOPOLÍMEROS

2.6.1 MÉTODO PARA MEDIR PROTEÍNAS

Método de Lowry (Lowry 1951)

Es un método clásico. Para esta técnica se requiere de péptidos relativamente grandes con grupos fenólicos que puedan enlazarse con el Cu^{++} . En la reacción se necesita del reactivo de Folin-Ciocalteu formado por molibdato, fosfato y tungstato de sodio, que produce un color azulpúrpura con un máximo de absorción en la región del visible a 750 nm. El método es sensible a concentraciones de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$. La técnica está sujeta a interferencias, entre otros, por Tris o EDTA. La reacción depende en gran medida del intervalo de pH al que se trabaje, siendo el recomendado el de 10.5. Esta condición es esencial para la formación de un complejo Cu-Proteína y la posterior reducción con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un color azul. Este método tiene ventajas de ser confiable para cuantificar proteínas, además de sólo presentar pequeñas variaciones en la determinación de la concentración cuando se miden diferentes proteínas. Las desventajas que puede presentar son la baja velocidad de reacción (por lo menos 40 minutos), inestabilidad de ciertos reactivos y desnaturalización irreversible de las proteínas.

2.6.1.1 Procedimiento

Se prepara una curva de calibración con las siguientes concentraciones 0, 120, 180, 240 y 300 mg/L con albúmina serica bobina (Sigma). Una de las curvas de calibración se muestra

en la Figura 2.3. A un mL de muestra del reactor, perfectamente homogenizado, se le agrega 0.1 mL de hidróxido de sodio 10 N, se calienta durante 30 minutos a baño María, posteriormente se le agregan 5 ml de una solución de Na_2CO_3 0.19 M en NaOH 0.1N. CuSO_4 al 1% y Tartrato de Sodio y Potasio al 2%. Se deja reposar por 20 minutos en la oscuridad y, por último se le adiciona 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. La muestra se lee a 750 nm.

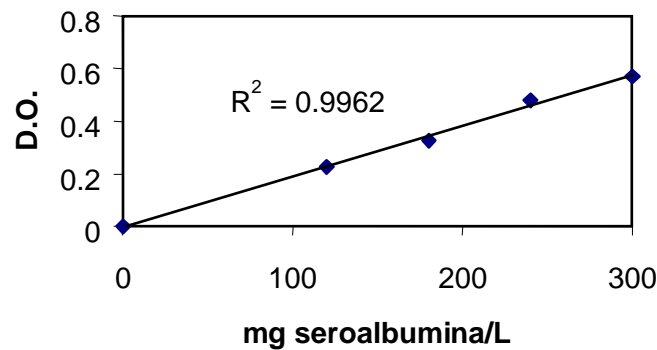


Figura 2.3 Curva calibración para proteína—línea de ajuste \blacklozenge valor experimental, con pendiente (m), 0.00170 ± 0.0003 y intersección (b), 0.00885 ± 0.0007 . El valor de la dispersión corresponde a 20 calibraciones.

2.6.2 MÉTODO PARA MEDIR CARBOHIDRATOS

Método del Fenol Sulfúrico (Dubois 1956)

Por este método se pueden determinar, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, incluyendo los metil éteres con grupos reductores libres. El método se basa en la hidrólisis de los azúcares con ácido sulfúrico, que con ayuda del fenol y el sulfato de hidracina se forma furfural o hidroximetilfurfural dando un color amarillo que se lee a 490

nm (Dubois y col., 1956). La reacción es sensible hasta 10 $\mu\text{g/mL}$ y el color es estable durante 3 horas.

2.6.2.1 Procedimiento

Se prepara una solución estándar de 100 mg de glucosa por litro, y de ésta se hacen diluciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L. Las muestras se tratan de la misma manera que los estándares.

Un mL de muestra se deposita en un tubo de ensaye y se le agrega 1 ml de solución de fenol al 5%. Posteriormente se le agrega por las paredes del tubo y muy lentamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, con sulfato de hidracina 0.5%, se deja enfriar y se lee a 490 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado. Una de las curvas de calibración se observa en la Figura 2.4.

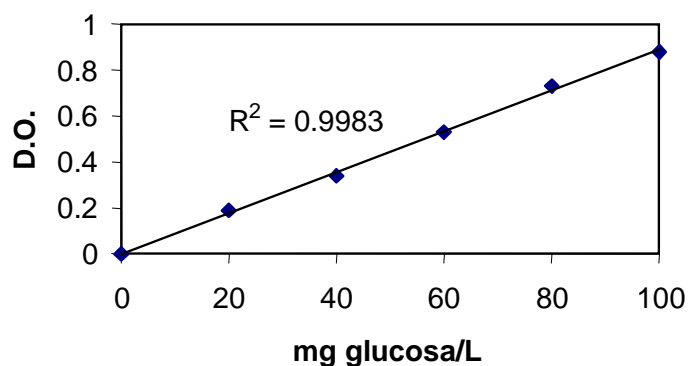


Figura 2.4 Curva calibración para la cuantificación de carbohidratos - línea de ajuste \blacklozenge valor experimental, con pendiente (m), 0.00844 ± 0.0013 y intersección (b), $- 0.00230 \pm 0.0012$. El valor de la dispersión corresponde a 20 calibraciones.

2.6.3 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS (Frings y Dunn, 1970)

La determinación se basa en la reacción dada por los lípidos que presentan dobles enlaces, con la sulfo-fosfo-vainillina para dar una solución colorida que presenta su máxima absorbancia a 540 nm, siendo estable el color por lo menos 10 minutos. Este método de la sulfo-fosfo-vainillina presenta una sensibilidad parecida a los métodos gravimétricos, pero con de una mayor especificidad.

2.6.3.1 Procedimiento

Para la determinación de los lípidos exopoliméricos se utilizó una curva de calibración de 0 a 100 mg/L de aceite de oliva en etanol. A la curva de calibración y las muestras, se les agregaron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y se calentó a baño María por 10 minutos. Se puso en agua fría durante 5 minutos y finalmente se le agregó 5 mL de fosfo-vainillina la cuál se formó por la adición de 800 mL ácido fosfórico concentrado y 200 mL vainillina al 0.6%. Se incubó a 37⁰ C durante 15 minutos, se dejó enfriar 5 minutos y se le a 540 nm. La curva de calibración se observa en la Figura 2.5.

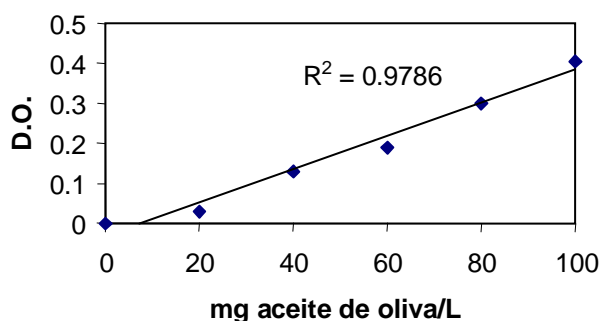


Figura 2.5 Curva calibración para la cuantificación de lípidos - línea de ajuste \blacklozenge valor experimental, con pendiente (m), 0.00388 ± 0.0007 y intersección (b), -0.0191 ± 0.0016 . El valor de la dispersión corresponde a 20 calibraciones.

2.7 ELECTROFÓRESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (Laemmli, 1970)

Esta técnica de electroforesis preferentemente se usa en la separación de ácidos nucleicos y de proteínas. El término electroforesis implica el movimiento de especies cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. La combinación de carga y tamaño de la muestra, así como la porosidad del gel, las características de la solución amortiguadora y de las condiciones específicas de separación de la muestra, pueden influir para una buena resolución de la muestra.

Para revelar las bandas de proteínas, normalmente se usa azul de Coomassie R-250 que colorea las bandas. En este trabajo se optó por la técnica de tinción con plata descrita por Marril y col., (1979), que es más sensible, ya que se pueden determinar concentraciones de hasta 0.02 ng/mm^2 del gel.

El método de tinción se basa en la reacción de los iones metálicos de la plata con los sitios de las moléculas cargados negativamente. Sin embargo, esta técnica de tinción tiene el inconveniente de que puede reaccionar inespecíficamente con algunas otras macromoléculas como los ácidos nucleicos, glicoproteínas y lipoproteínas.

2.7.1 PREPARACIÓN DEL GEL

Preparación de reactivos.

Solución de acrilamida y Bis-acrilamida al 30%

Se pesan 29.2 g de acrilamida más 0.8 g de Bis-acrilamida y se disuelvan en 100 mL de agua desionizada.

Solución amortiguadora del tanque

(Tris-base 0.024 M, glicina 0.190 M y SDS 0.1 %)

Material y Métodos

Se pesan 15.1 g de Tris base, se adicionan 72 g de glicina, más 5 g de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se disuelven en un litro de agua desionizada. En caso necesario, se ajusta el pH a 8.3, y se guarda en refrigeración. Antes de usar la solución amortiguadora, se hace una dilución 1:5 con agua desionizada

Solución amortiguadora para la formación del gel separador (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8)

Se pesan 185 g de Tris base y se disuelven en un litro de agua desionizada, se ajusta el pH a 8.8 con HCl concentrado y se guarda en refrigeración.

Solución amortiguadora para la formación del gel concentrador (Tris-base 0.49 M, pH 6.8).

Se pesan 60 g de tris base y se disuelven en un litro con agua desionizada, se ajusta el pH a 6.8 con HCl concentrado y se guarda en refrigeración.

Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Se pesan 10g de SDS y se afora a 100mL con agua desionizada. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

Solución de persulfato de amonio al 10%

Esta solución se prepara al momento, se pesa 0.1 g de persulfato de amonio y se lleva a 1 mL con agua desionizada.

Solución desnaturizante para la muestra (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20 %, y mercaptoetanol al 1%)

Se toman 2.5 mL de la solución amortiguadora a pH de 6.8. Se le adicionan 4mL de SDS al 10%, 2mL de glicerol, 1 mL de mercaptoetanol grado reactivo y finalmente 0.25 mL de azul de bromofenol al 1% y se afora a 10 mL con agua desionizada. Esta solución se guarda en refrigeración.

Tabla 2.2 Formación del gel separador al 8% y del gel concentrador al 4.5%

Solución	Gel separador	Gel concentrador
	mL	mL
Acrilamida	2.66	0.85
Amortiguador pH 8.8	2.5	1.5
Agua desionizada	4.7	2.0
SDS	0.1	0.04
Persulfato	0.05	0.009
Temed	0.005	0.005

2.7.2 Formación del gel

Se prepara el gel separador como se indica en la Tabla 2.2. Se depositan 3.6 mL de esta mezcla entre dos placas de vidrio de 10 cm², limpias y desgrasadas. Posteriormente se agrega 0.2 mL de alcohol isobutílico par eliminar las burbujas y para que el borde del gel sea homogéneo. Se deja que el gel polimerice por alrededor de 30 minutos. Ya polimerizado el gel, se elimina el alcohol isobutílico y se lava la superficie del gel con agua desionizada. Por último, se prepara la solución del gel concentrador y, antes de que polimerice, se pone el peine para formar los pozos donde se pone la muestra que va analizarse.

2.7.3 Preparación de la muestra

Se toman 0.1 mL de la muestra y se depositan en un tubo de ensaye, a la cual se le agregan 0.040 mL de solución desnaturalizante, se pone a baño María por 3 minutos y se deja enfriar.

2.7.4 Electroforesis

En los pozos de la placa electrofóretica, se ponen 0.1 ml de muestra desnaturalizada. Se aplica un voltaje constante de 150 V por 1.30 horas, o un centímetro antes de que salga el azul de bromofenol de la placa del gel.

2.7.5 Método de tinción y Fijación del gel

Terminada la electroforesis. Se saca el gel de los vidrios y se deposita en platos de plástico para la tinción. El gel se pone en una solución de metanol 40% y ácido acético al 10% durante 45 minutos, repitiéndolo dos veces. Después se lava con agua deionizada por tres ocasiones durante 10 minutos, cada una. La placa del gel se pone en una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.0012M, durante 1 min. Se lava dos veces con agua desionizada durante 20 segundos. Se agrega una solución de AgNO_3 al 0.2 % durante 20 minutos. Se lava con agua desionizada durante 20 segundos, tres veces. Se agrega la solución reveladora que consta de Na_2CO_3 al 3% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 0.0003% y 0.05 mL de formaldehído al 37%, hasta que aparezcan las bandas de proteínas. Por último, el revelado se detiene con una solución de ácido cítrico 2.3 M por 10 minutos. Los geles teñidos se pueden guardar entre dos acetatos a temperatura ambiente.

2.7.6 Marcadores de peso molecular para proteínas

Para determinar el peso molecular de las proteínas exopoliméricas, se utilizaron dos diferentes marcadores de peso molecular comerciales, el primero (Sigma) contiene macroglobulina, galactosidasa, fructosa 6 fosfato cinasa, piruvato cinasa, fumarasa, lactato

Material y Métodos

dehidrogenasa y 1-triose fosfato isomerasa, a una concentración de 2 mg/ L. El intervalo de peso molecular de los marcadores de peso molecular fue de 43 a 91 kDa. El segundo marcador de pesos moleculares se utilizó un marcador Dalton Mark VI, (Sigma) contiene albúmina bobina, albúmina de huevo, lactoglobulina, lisosima, tripsinogeno y pepsina a una concentración final de 2 mg/L. El intervalo de peso molecular de estas proteínas fue de 14 a 66 kDa.

2. 8 CONCLUSIONES.

Los métodos descritos y empleados durante todo el desarrollo experimental de este trabajo mostraron alta confiabilidad y reproducibilidad. Debe destacarse que una contribución al análisis de los exopolímeros de los lodos fue la utilización del método de disgregación con EDTA, así como la posterior eliminación del quelante por medio de diálisis.

2.9 BIBLIOGRAFÍA.

APHA, (1985) Standard methods for examination of water and wastewater 17th edition, *American Public Health Association*, New York. USA.

ASTM-D 1426-89, (1992) Estándar methods for amonia nitrogen in water test method B: Selective ion electrode. *Annual Book of Amercan Society for Testing and Materials Standars ASTM 11.01*: 331-333.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Roberts, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. chem.*, **28**: 350-356.

Frings, C. S. and Dunn, R. T., (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *J. Clin. Path.* **53**: 89-91.

Gómez, J., Mendez, R. and Lema, J. (1996) The effect of antibiotics on nitrification process. Batch assays *Appl. Biochem Biotechnol.* **57**: 869-876.

Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature (London)*, **227**, 680-683

Li, S. F. Y. (1993) Capillary electrophoresis principle practice and applications. *Elsevier Netherlands* pp797.

Lowry, O. H., Rosen Brough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Marril, C. R., Switzer, R. C. and van Keuren, M. L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detectedby two-dimesional electrophoresis and a highly sensitive silver stain *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **76**: 4335-4339.

Wang, J. H., Baltzis, B. C., Lewandoski, G. A. (1985) Reduction of nitrate and nitrite in a cyclically operated continuous biological reactor. *Biotech Bioeng.* **46**: 159-171.

CAPÍTULO 3

SISTEMAS NITRIFICANTES

3.1 RESUMEN

Se trabajó con cinco reactores tres de tanque agitado y dos reactores airlift. Uno de los reactores de tanque agitado fue tomado como referencia (RNR) y se operó bajo condiciones litoautotróficas. El RNR presentó un rendimiento 0.95 de N-NO₃ y una eficiencia en el consumo de N-NH₄ del 99 %. Los dos reactores de tanque agitado restantes fueron conectados, cada uno, en línea a un reactor desnitrificante, con el objeto de determinar el efecto de la materia orgánica sobre el proceso respiratorio nitrificante. El segundo reactor nitrificante de tanque agitado (RNA), se alimentó con acetato a una velocidad de carga de C-acetato de 0.16 g/L•d. La eficiencia en el consumo de C-acetato fue del 86%, un rendimiento de 0.82 de N-NO₃, con una eficiencia en el consumo del N-NH₄ de 75%. El tercer reactor nitrificante de tanque agitado (RNOC), se alimentó con aguas residuales provenientes de una industria conservera, el cual presentó una velocidad de carga de 0.19 g/L•d. El reactor RNOC presentó un rendimiento de 0.85 de N-NO₃, con una eficiencia en el consumo de N-NH₄ del 93%. Se trabajó con dos reactores de biopelícula, en uno de ellos la biopelícula se obtuvo utilizando como soporte basalto (RNAB). En el otro la biopelícula se obtuvo a partir de flóculos (RNAF), en donde el rendimiento para el RNAB fue de 0.94 de N-NO₃, con una eficiencia en el consumo de N-NH₄ del 97% y para el RNAF el rendimiento fue de 0.92 de N-NO₃ y una eficiencia en el consumo de N-NH₄ del 99 %. Los cinco reactores fueron operados hasta establecer el régimen estacionario nitrificante.

3.2 OBJETIVO

Determinar, evaluar y analizar el régimen estacionario nitrificante de cinco reactores nitrificantes. Tres de mezcla completa, uno alimentado litotróficamente, dos en presencia de materia orgánica, y dos reactores nitrificantes tipo airlift.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 REACTOR NITRIFICANTE DE REFERENCIA (RNR)

Existen diferentes factores que pueden afectar el proceso respiratorio nitrificante, entre los que se encuentran la temperatura, pH, concentración de oxígeno y concentración de amonio en el reactor (Prosser, 1989). Se ha encontrado en la literatura que en reactores nitrificantes de tanque agitado (pH cercano a 8.0 y temperatura de 28⁰C), se pueden alcanzar velocidades de carga de hasta 0.5 g/L*d de N-NH₄⁺, sin presentar inhibición de la nitrificación, con rendimientos mayores de 0.9 y eficiencia en el consumo de sustrato de mas del 90% (Gómez, 1994).

En la Figura 3.6 se presenta la velocidad de carga entrada y de salida del N-NH₄⁺, así como la velocidad de formación de producto (como N-NO₃⁻) del RNR. Las velocidades presentaron una variación menor al 10 %, en consecuencia es posible decir que RNR alcanzó el régimen estacionario nitrificante. La velocidad de formación de producto fue muy alta en comparación con la velocidad de salida de N-NH₄⁺, que fue cercana a cero (Tabla 3.1), lo que indicó que el amonio fue completamente transformado a nitrato. Es importante señalar que dadas las condiciones de operación, como pH alcalino y fuerte aireación, factores que favorecen el arrastre del amoniac, este fenómeno no fue significativo, ya que la velocidad de producción de nitrato fue alta (Tabla 3.1). En el RNR la concentración de amonio dentro del reactor fue cercana a cero, lo que descarta problemas de inhibición de la nitrificación por sustrato. En el RNR tampoco se acumuló nitrito lo que significa que el proceso nitrificante no estuvo limitado por oxígeno, dando como resultado, la oxidación completa del amonio a nitrato (Anthonisen y col.,1976).

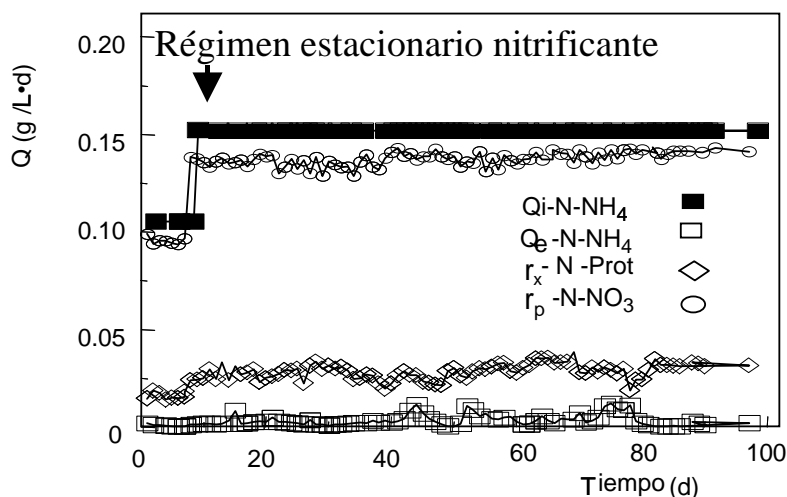


Figura 3.6 Reactor nitrificante alimentado con medio litoautotrófico en donde se presenta ($Q_{(i)}$ y $Q_{(e)}$) velocidades de carga de entrada y salida N-NH₄⁺. $r_{(x)}$ y $r_{(p)}$ velocidad de formación N-proteína y de N-NO₃⁻.

En el RNR se presentó un rendimiento ($Y_N = \text{mg N-NO}_3^- \text{ producido} / \text{mg N-NH}_4^+ \text{ consumido}$), de 0.95 lo que se tradujo en un proceso netamente respiratorio, con una vía metabólica nitrificante. Asimismo, el Y_N es alto como se esperaba, debido a la limitación de carbono (C/N 1.5), lo que dio como resultado un proceso fisiológico con una baja asimilación de N-NH₄⁺. En el régimen estacionario nitrificante la eficiencia en el consumo de amonio ($E_C = \text{N-NH}_4^+ \text{ consumido} / \text{N-NH}_4^+ \text{ alimentado} \times 100$) fue cercana al 99%. (Tabla 3.1). La alta eficiencia del proceso podría explicar en termino de lo señalado por Anthonisen y col., (1976) encontraron que concentraciones de 10 a 100 mg/L de amonio inhibieron significativamente la nitrificación. Estas condiciones no se observaron durante toda la nitrificación del RNR.

Tabla 3.1 Condiciones de operación en el régimen estacionario nitrificante de los cinco reactores nitrificante

Tipo de reactor	$Q_{(i)}$ g N/L*d	$Q_{(e)}$ g N/L*d	r_p g N/L*d	r_x g N/L*d	Y_N	E_C %
RNR	0.15±0.01	0.0007±6×10 ⁻⁵	0.14±0.003	0.018±0.003	0.95±0.03	99
RNA	0.95±0.03	0.12±0.01	0.7±0.05	0.12±0.04	0.82±0.06	75
RNOC	0.99±0.03	0.004± 0.0005	0.85±0.02	0.22±0.012	0.85±0.02	93
RNAB	3.8±0.002	0.04± 0.005	3.42±0.07	0.29±0.06	0.94±0.03	97
RNAF	3.8±0.02	0.045±0.004	3.43±0.07	0.33±0.06	0.92±0.02	99

$Q_{(i)}$ velocidad de carga de N-NH₄⁺, $Q_{(e)}$ velocidad de salida en el efluente de N-NH₄⁺, r_p velocidad de formación de N-NO₃⁻, r_x velocidad de formación de N-Proteína, Y_N Rendimiento, E_C Eficiencia en el consumo de N-NH₄⁺.

3.3.2 REACTOR NITRIFICANTE ALIMENTADO CON ACETATO (RNA)

En la Figura 3.8 se presenta el comportamiento del RNA, en donde se presentó una velocidad de carga de C-acetato fue de 0.16± 0.2 g/L•d. Bajo estas condiciones después del día 56 se inició el régimen estacionario nitrificante. Durante el régimen estacionario nitrificante, la velocidad de carga de entrada y salida de N-NH₄⁺, así como la velocidad de sustrato se señalan en la Tabla 3.1. El rendimiento fue del 0.82, con una eficiencia en el consumo de N-NH₄⁺ del 75 %, valor que pudo deberse a que en efluente la velocidad de salida de N-NH₄⁺ fue del 12.5 %, con respecto a la velocidad de carga de N-NH₄⁺, ocasionando cierta inhibición de la nitrificación, se notaron cambios en el pH, permaneciendo entre valores de 5 y 6, lo que podría provocar que parte del amonio no se encontrara como amoniaco y de esta manera no ser utilizado por la enzima amonio monooxigenasa (Anthonisen, y col., 1976).

Sistemas nitrificantes

En la literatura se han encontrado varias teorías que tratan de explicar el efecto de la materia orgánica sobre la nitrificación, una de estas es la reportada por Michael y col., (1985) quienes sugirieron que la presencia de la materia orgánica en los reactores nitrificantes, favorece crecimiento de los microorganismos filamentosos y, en consecuencia, disminuye la eficiencia nitrificante. En este trabajo no se determinó el aumento de los microorganismos filamentosos, ya que está no era la finalidad, sino los cambios bioquímicos de los exopolímeros en los lodos. Otra posible explicación, es el papel que puede jugar la materia orgánica (el acetato) en el proceso respiratorio nitrificante, donde valores mayores que 200 mg/L tienen efecto sobre la actividad de la enzima nitrito oxidasa, acumulándose nitrito (Takai y col., 1997; Gómez, y col., 1996). En el RNA, sin embargo, no se acumuló nitrito, por lo que se descarta que el acetato influyera negativamente sobre la ruta nitrificante.

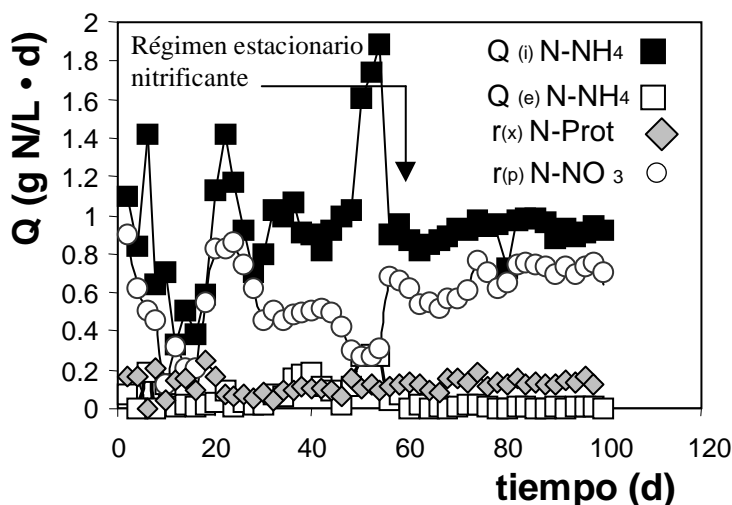


Figura 3.8 Reactor nitrificante alimentado con acetato. $Q_{(i)}$ y $Q_{(e)}$ son las velocidades de carga de entrada y salida N-NH_4 . $r_{(x)}$ y $r_{(p)}$ son las velocidades de formación de N-proteína y de N-NO_3 .

Sistemas nitrificantes

En el RNA, a pesar de que la materia orgánica no tuvo un efecto marcado sobre la formación de nitrato el pH pudo ser la causa de que el proceso respiratorio nitrificante pudiera bajar un poco la eficiencia en el consumo de amonio y el rendimiento.

3.3.3 COMPARANDO LOS REACTORES RNR y RNA

En el RNA la velocidad de formación de N-NO_3^- fue mayor en un 80%, debido a la velocidad de carga del RNR fue 85% menor. Hay evidencias que muestran que en este intervalo, la velocidad de producción de nitrato es lineal a la velocidad de carga de nitrógeno amoniacal (Gómez, 1994). De ser así, a $0.95 \text{ g N-NH}_4^+/\text{Ld}$ la velocidad de producción de nitrato el RNA tuvo que presentar una velocidad de formación de N-NO_3^- de $0.87 \text{ g N-NO}_3^-/\text{Ld}$. Debido a la presencia de acetato en la entrada del RNA, la velocidad de producción fue $0.7 \text{ N-NO}_3^-/\text{Ld}$, es decir, 20% menor a la esperada. Una forma de entender esta diferencia, sería debido a la disminución en la eficiencia de consumo N-NH_4^+ , la cual fue menor en 24% en el RNA, con respecto al RNR (75/99, ver Tabla 3.1). Sin embargo, y a pesar de la disminución en la eficiencia de consumo, el rendimiento en el RNA sólo fue 13% ($0.82/0.95$) menor, respecto del RNR. De aquí, se podría decir que la ruta nitrificante del RNA no se vio tan afectada por el acetato, como su velocidad de formación de N-NO_3^- y eficiencia de consumo N-NH_4^+ . Metabólicamente el lodo en ambos reactores tuvieron un comportamiento similar y fueron esencialmente respiratorios, desasimilativos. En general, considerando las eficiencias y rendimientos en los dos reactores, la formación de la biomasa fue baja.

3.3.4 REACTOR NITRIFICANTE CON MATERIA ORGÁNICA COMPLEJA (RNOC)

En este reactor la velocidad de carga de carbono orgánico fue de 0.19 g/L•d, en este sistema se presentaron problemas de operación en el reactor (en la recirculación y la alimentación de la materia orgánica). El régimen estacionario nitrificante se presentó después del día 111 (Figura 3.9). Los resultados del régimen estacionario nitrificante se muestran en la Tabla 3.1. Pudiendo verse que las velocidades de carga y salida de N-NH₄ y la velocidad de producción de N-NO₃ presentaron una variación menor que el 10%. Por lo tanto, el reactor operó en régimen estacionario nitrificante. La velocidad de salida de N-NH₄, fue cercana a cero, por lo que no hubo problemas de inhibición por amonio. Takai y col., (1997) sugieren que la presencia de la materia orgánica inhibe la velocidad de la nitrato reductasa. No obstante haber alimentado materia orgánica compleja al RNOC, no hubo acumulación de nitrito, ya que no fue detectable en el influente. De hecho el resultado, era el esperado dado que la concentración de la materia orgánica en el reactor fue baja.

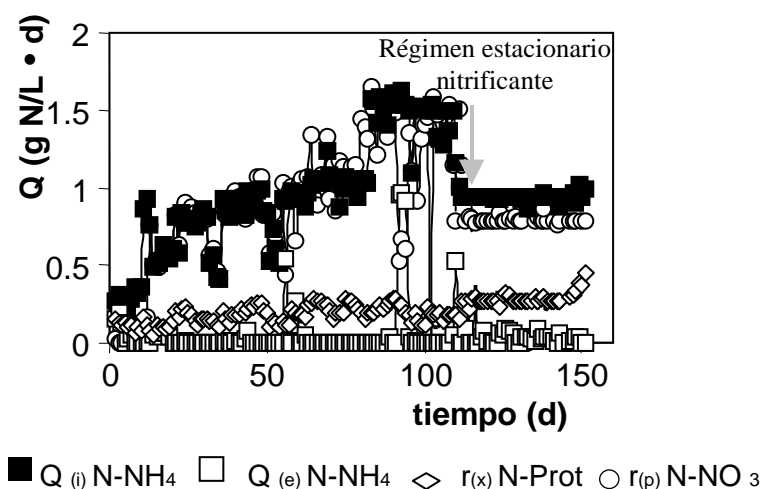


Figura 3.9 Reactor nitrificante alimentado con aguas residuales complejas, en donde se presenta ($Q_{(i)}$ y $Q_{(e)}$) velocidades de carga de entrada y salida N-NH₄. $r_{(x)}$ y $r_{(p)}$ velocidad de formación N-proteína y de N-NO₃.

3.3.5 COMPARACIÓN ENTRE EL RNOC y EL RNR

La velocidad de carga de nitrógeno de amonio en el RNOC fue 85% (0.15 / 0.99 g N-NH₄⁺/L) mayor que en el RNR. La velocidad de producción de nitrato en el RNOC fue sólo menor en un 8% a la esperada. De aquí se desprende que la alimentación de la materia orgánica compleja, no afectó significativamente la velocidad de formación de nitrato.

3.3.6 REACTOR NITRIFICANTE AIRLIFT NUCLEADO A PARTIR DE BASALTO (RNAB)

Se probó la estabilidad de la biopelícula a tres velocidades de carga de N-NH₄⁺: 3.8, 7 y 15 g/l*d, encontrándose que en las tres velocidades de carga, la biopelícula del reactor quedó adherida al soporte de manera estable, ya que no se observó salida de proteína microbiana en el efluente. Una vez comprobada la estabilidad de la biopelícula, la velocidad de carga de N-NH₄⁺ se disminuyó gradualmente hasta alcanzar 3.8 g/l*d, momento en el cual se permitió que el lodo nuevamente alcanzara el estado estacionario nitrificante (Figura 3.10). Los resultados bajo estas condiciones se presentan en la Tabla 3.1. En estas condiciones la eficiencia y rendimiento fueron similares al RNR, netamente desasimilativos, por lo cual, la biomasa (y su acumulación) no aumentó. Si se compara la velocidad de formación de N-NO₃⁻ de este reactor fue proporcional a la velocidad de carga de N-NH₄⁺ (considerando que esta es lineal), se puede decir que el comportamiento fue similar al RNR

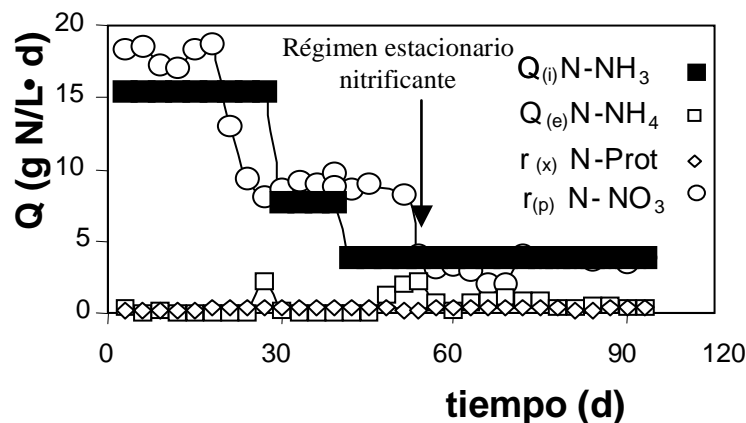


Figura 3.10 Reactor airlift nucleado a partir de basalto en donde se presenta ($Q_{(i)}$ y $Q_{(e)}$) velocidades de carga de entrada y salida N-NH_4 . $r_{(x)}$ y $r_{(p)}$ velocidad de formación N -proteína y de N-NO_3 .

3.3.7 REACTOR NITRIFICANTE AIRLIFT NUCLEADO A PARTIR DE FLÓCULOS (RNAF)

En este reactor se aumentó gradualmente la velocidad de carga de N-NH_4^+ a fin de igualarla al RNAB (Figura 3.11), situación que sucedió a los 55 días. En la Tabla 3.1 se presenta la velocidad de carga de entrada y salida de N-NH_4 junto con la velocidad de formación de N-NO_3 , durante el régimen estacionario nitrificante.

3.3.8 COMPARACIÓN DE LOS REACTORES RNAB y RNAF

El comportamiento del reactor RNAF no fue diferente al RNAB. Dado que las diferencias en la formación de la biopelícula (a partir del mismo lodo) posiblemente no fueron significativas. Pero sí en la estructura mecánica de la partícula nitrificante. En ambos reactores de biopelícula la eficiencia y el rendimiento fueron muy altos y similares. La velocidad de consumo y formación de nitrato no presentó cambios, con respecto al RNR, a pesar que las velocidades de carga, en los reactores de biopelícula fueron muy altas. En

ambos reactores de biopelícula si no hubo acumulación de amonio y nitrito, es por que no se presentaron problemas de inhibición según lo indica Anthonisen, y col., (1976). Dada la velocidad de consumo y eficiencia del proceso, es posible decir que el O_2 no fue un factor limitante, en el proceso respiratorio nitrificante.

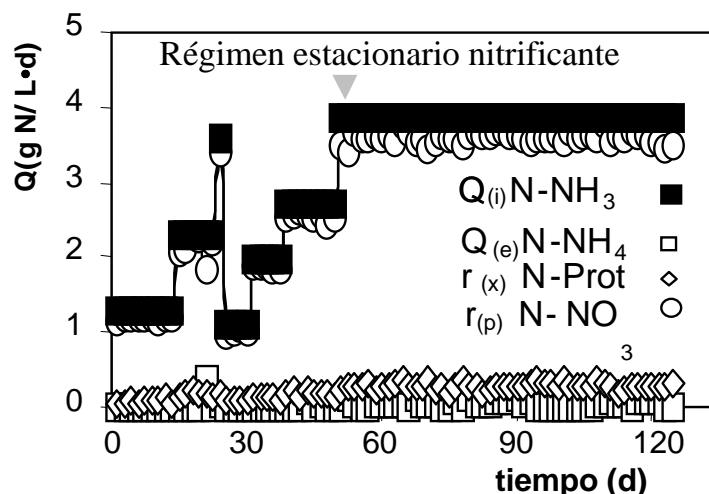


Figura 3.11 Reactor airlift nucleado a partir de flóculos, en donde se presenta ($Q_{(i)}$ y $Q_{(e)}$) velocidades de carga de entrada y salida, $N-NH_4$. $r_{(x)}$ y $r_{(p)}$ velocidad de formación N-proteína y de $N-NO_3$.

3.4 CONCLUSIONES

Los cinco reactores descritos en este capítulo fueron caracterizados tomando en cuenta la velocidad de formación de producto, la eficiencia y rendimiento, como variables de respuesta, las cuales fueron calculadas cuando el cultivo estuvo en régimen estacionario nitrificante, esto es, cuando desde el punto de vista metabólico, el lodo (los microorganismos) observa un comportamiento fisiológico uniforme. Los resultados obtenidos mostraron, que en todos los casos, el proceso fue netamente desasimilativo de modo, entonces, que la formación de biomasa fue poco significativa, la acumulación fue muy baja lo que podría llevar a la conclusión que no sólo el proceso nitrificante operó en

Sistemas nitrificantes

régimen estacionario sino, en general, el proceso biológico completo. Asimismo, el tipo de reactor, las condiciones hidráulicas y el tipo de alimentación, parece no que no tuvieron una influencia sobre el metabolismo nitrificante del lodo.

Todo lo anterior es de particular importancia, dado que el estudio de la sedimentabilidad de los lodos bajo diferentes condiciones y el estudio de los exopolímeros de los lodos se han hecho sobre lodos sin explicitar el origen o condiciones metabólicas de los microorganismos que constituyen el consorcio microbiano del lodo. Se han descrito intentos por caracterizar el tipo de exopolímeros de los lodos, pero lo han llevado a cabo sobre muestras puntuales, sobre consorcios que no tienen un perfil metabólico bien definido.

En este trabajo, la variable metabólica, la respiratoria, está definida. Bajo estas condiciones de régimen estacionario, será realizado el estudio de la sedimentabilidad y bioquímico de los exopolímeros de lodos activados nitrificantes.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam T. B. S. and Srinath E. G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **48**. 835-852.
- Gómez, J., Mendez, R. and Lema, J. M., (1996) The effect of antibiotics on nitrification process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**. 869-876.
- Gomez, H. G. J. (1994) Obtención de microflora nitrificante: nitrificación en diferentes condiciones de cultivo. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Michael, G.R., Shimizu, G. P., Jenkins, D. (1985). The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57**. 1152-1162.
- Prosser, J. I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**. 125-181.
- Takai, T., Hirata, A., Yamauchi, K. and Inamori, Y. (1997) Effects of temperature and volatile fatty acids on nitrification-desnitrification activity in small-scale anaerobic-aerobic recirculation biofilm process. *Water Sci. Tech.* **35**. 101-108.

CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LOS EXOPOLÍMEROS EN UN REACTOR NITRIFICANTE ALIMENTADO CON MEDIO LITOAUTOTRÓFICO

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

4.1 RESUMEN

En este capítulo se describe un reactor nitrificante alimentado con medio litoautotrófico (RNR), en el que se estudió la relación de la concentración de exopolímeros con el Índice Volumétrico del Lodo (IVL). En el reactor nitrificante se estudiaron los cambios de concentración de los carbohidratos (CE), lípidos (LE) y proteína exopoliméricas (PE) y su relación con el IVL, en un periodo de 30 días. En este intervalo la concentración de las PE con respecto al tiempo presentó un comportamiento de onda, razón por la cual, se analizó la concentración de PE de varias ondas. Aquí se presentan los resultados de dos de ellas. Una con una concentración de PE máxima de 50 mg/L, denominada primera etapa, y, otra con un máximo de 114 mg/L, denominada como segunda etapa. Al igual que la concentración de la PE, el IVL también presentó un comportamiento de onda. Por lo contrario, la concentración de los CE y LE presentaron variaciones menores al 10%, y no se observó una relación con el comportamiento del IVL.

También se llevó a cabo un análisis de las proteínas exopoliméricas por medio de electrofóresis en gel de poliacrilamida. En el estudio electroforético, el número de PE varió en el periodo de treinta días, presentándose un total de 23 bandas con un intervalo de peso molecular de 32 a 97 kDa.

Se estudió el efecto de la adición de la PE al reactor nitrificante. En el mismo reactor nitrificante, se siguió determinando el comportamiento de onda de las PE y cuando ésta presentó su punto máximo de la concentración, se tomaron 100 mL de lodo y se extrajeron los exopolímeros. Posteriormente se adicionaron al mismo reactor cuando la concentración de PE fue mínima. Se observó que el IVL aumentó un 7.3 %.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

4.2 OBJETIVO.

Determinar, evaluar, analizar el comportamiento de los exopolímeros de los flóculos de un lodo nitrificante (proteínas, lípidos y carbohidratos) con respecto al tiempo y su relación con el IVL. Asimismo, obtener información del número y peso molecular de las proteínas exopoliméricas y su relación con el IVL.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

4.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.3.1 Comportamiento de las sustancias exopoliméricas (Primera etapa)

Se determinó el coeficiente de correlación entre las proteínas, carbohidratos, lípidos exopoliméricos, SSV y el IVL. Se pudo constatar que la proteína exopolimérica y el IVL presentaron una correlación de 0.783. Este valor fue el más alto, en comparación con los carbohidratos y lípidos exopoliméricos (0.255 y 0.177, respectivamente), lo cual también fue observado por Urbain y col., (1993). Con este análisis estadístico puede concluirse que las proteínas exopoliméricas están relacionadas con los cambios del IVL. Es posible decir que no todos los componentes que forman el lodo nitrificante (flóculos), están relacionados con los cambios del IVL o influyen de igual forma.

4.3.1.1 CARBOHIDRATOS EXOPOLIMÉRICOS (CE) Y SU RELACIÓN CON EL IVL

Para este trabajo se utilizó el reactor nitrificante alimentado con medio litoautotrófico (RNR), en estado estacionario nitrificante. De los lodos del reactor fueron extraídos los exopolímeros con etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA). Se observó que el EDTA interfiere con la cuantificación de las PE. Con la finalidad de eliminar el EDTA los exopolímeros fueron dializados durante tres días. Al determinar la concentración de los exopolímeros después de la diálisis, se observó que sólo los CE disminuyeron en un 80%. Para saber si la disminución en la concentración de los CE fue debida a la acción enzimática, se puso nuevo extracto de los exopolímeros en bolsas de diálisis, para formar dos baterías con 7 muestras cada una. Una de las baterías se sometió a 121⁰C por 15 minutos para desactivar las posibles carbohidrasas presentes. La segunda batería, se dejó sin tratamiento térmico. De cada una de las baterías se tomó una muestra diariamente y se determinó la concentración de CE. Pudo verse que, tanto la batería calentada a 121⁰C,

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

como la que se dejó a temperatura ambiente, presentaron el mismo comportamiento. En ambas baterías la concentración de los CE dentro de las bolsas de diálisis disminuyeron en un 80%. Con estos resultados es posible descartar la acción enzimática. Es probable pensar entonces, que los CE presentes en el lodo podrían ser de bajo peso molecular y de esta manera salir de la bolsa de diálisis. Considerando esta posibilidad, la concentración de los CE se determinó antes de dializar los exopolímeros para evitar su pérdida. Los CE se cuantificaron en un periodo de 30 días, encontrándose una concentración media de 30 ± 4 mg/L, es decir, la variación fue del 13 %. Los CE fueron comparados con el IVL, apreciándose que, mientras el IVL cambia y tiene un comportamiento de onda, los CE permanecen constantes, aunque autores como Goodwin y Forster (1985), Jahan y Nielsen, (1998) han relacionado a los CE con cambios en el IVL.

4.3.1.2 ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS EXOPOLIMÉRICOS (LE) Y SU RELACIÓN CON EL IVL

Los LE del lodo nitrificante, tampoco presentaron cambios significativos en su concentración. Los LE fueron relacionados con el IVL, apreciándose que, mientras el IVL cambia y tiene un comportamiento de onda, los LE permanecen constantes. Contrario a estos resultados otros autores, como Goodwin y Forster (1985), Finlayson y col., (1998), han relacionado a los LE con cambios en el IVL. Las diferencias podrían ser explicadas en términos de las características de la alimentación y estado fisiológico del lodo, mismas que en esos trabajos no están definidas.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

4.3.1.3 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EXOPOLIMÉRICAS Y SU RELACIÓN CON EL IVL

El análisis de la concentración de las PE en treinta días, mostró un comportamiento de onda, que no ha sido reportado en la literatura, posiblemente debido a que la PE sólo se ha cuantificado en forma puntual (de una sola muestra), y no de manera sistemática con respecto al tiempo. El comportamiento de onda presentó un valle y cresta con una duración de diez días. La concentración de la PE varió de 5 a 45 mg/L, esto es, presentó una variación cercana al 90%. La cuantificación de las PE mostró que son el componente principal de los exopolímeros (siendo el 12% de la proteína total del lodo). Considerando que si el comportamiento de onda de las PE pudiese ser debido a la acción de proteasas exopoliméricas, se extrajeron éstas del lodo y se mantuvieron a temperatura de 28⁰C durante siete días, observándose que en este periodo de tiempo, la concentración de proteína exopolimérica disminuyó menos del 10%, lo cual indicó una baja actividad proteolítica y no explica la disminución del 90% en las PE. Goel y col., (1998) mencionaron que algunas PE podrían presentar actividad enzimática, que podrían actuar sobre las proteínas exopoliméricas, disminuyendo su concentración y modificando la sedimentabilidad de los lodos. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado actividad de proteasas específicas en los lodos. Por otra parte, durante la extracción (separación) de las proteínas del lodo tuvo que adicionarse, a la suspensión de lodo EDTA. Si hubiera habido un efecto lítico sobre la biomasa microbiana, la concentración de proteínas totales, habría aumentado, pero no fue así. Esto es no hubo lisis celular por la adición de EDTA, como algunos mencionan (King y Forster, 1990).

Se comparó el comportamiento de la proteína exopolimérica y el IVL con respecto al tiempo (donde el IVL presento valores de 12.2 ± 2.2), apreciándose que ambos presentan

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

un comportamiento similar. A medida que la proteína exopolimérica aumentaba, el IVL mostraba el mismo comportamiento. Dado este comportamiento, podría decirse que la concentración de las PE podría jugar un papel importante en los cambios del IVL del lodo nitrificante.

Autores como Goodwin y Forster, (1985); Echeverría y col., (1992); Urbain y col., (1993); Dignac y col., (1998); Jahn y Nielsen, (1998); Flemming y Wingender (2001); Shin y col., (2001) encontraron que la concentración de las proteínas exopoliméricas en diferentes lodos no es la misma, pero indican que su concentración puede estar relacionada con cambios del IVL y la sedimentabilidad de los lodos, aunque no mencionan como pueden estar relacionadas. A diferencia de los resultados anteriores donde la concentración de las PE podría estar involucrada con los cambios de IVL, autores como Jorand y col., (1998) mencionan que las características de hidrofobicidad o hidrofiliicidad de las PE podrían influir en los cambios de IVL. Las PE hidrofóbicas al estar en una solución acuosa puede conferirle a los lodos mayor sedimentabilidad, aunque esta teoría no puede relacionarse con los cambios en concentración de la proteína exopolimérica dentro del lodo y su relación con el IVL, por lo menos no en este trabajo.

Hasta el momento, no se ha planteado una posible respuesta de por qué se relaciona a las proteínas exopoliméricas y al IVL con argumentos contundentes, por lo que este tema es aún objeto de nuevos estudios

También se comparó a los sólidos suspendidos volátiles (SSV) con el IVL, pero estos no presentaron cambios significativos, a lo largo del tiempo como los de la PE.

Para más detalles de este estudio se presentan en el apéndice 1

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

4.3.1.4 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS EXOPOLIMÉRICAS DEL LODO DEL REACTOR NITRIFICANTE DE REFERENCIA. (Segunda etapa)

Como previamente se había determinado el comportamiento de onda de la PE, se procedió a tomar muestras del lodo en los días en donde se presentó la concentración máxima (cresta) y mínima (valle) de las PE, con la finalidad de realizar la electrofóresis en gel de poliacrilamida y conocer el número y peso molecular de éstas. Durante la cresta y el valle se realizó un estudio comparativo del número de bandas y el peso molecular las PE, en el gel de poliacrilámida. El análisis electroforético se llevó a cabo con muestras que se tomaron un día antes y un día después de los puntos de máxima y mínima concentración de la PE. En estos puntos se encontró que el número de bandas no fue el mismo, puesto que cuando se presentó la concentración más baja, sólo se observaron 9 bandas en donde sólo 6 parecen estar siempre en el lodo. En los días donde las proteínas exopoliméricas presentaron la concentración máxima (cresta), se encontraron 23 bandas de PE (Tabla 4.1), donde sólo 14 no se presentaron el día de mínima concentración de la PE, en donde las principales presentaron pesos moleculares de 31, 34, 42, 44, 59, 63, 70, 82, y 89 kDa.

Para determinar que las bandas identificada en el gel de electrofóresis fueran de naturaleza protéica, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática. Para esto, al extracto de PE se le adicionó una proteasa (Sabinasa^{MT}) incubándose a 50⁰C por 10 minutos, posteriormente se inactivó a 100⁰C. Finalmente, el extracto hidrolizado se sometió a electrofóresis. Los resultados de este ensayo mostraron que las bandas de proteínas exopoliméricas desaparecieron, con lo cual podría concluirse que las bandas fueron de naturaleza protéica.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

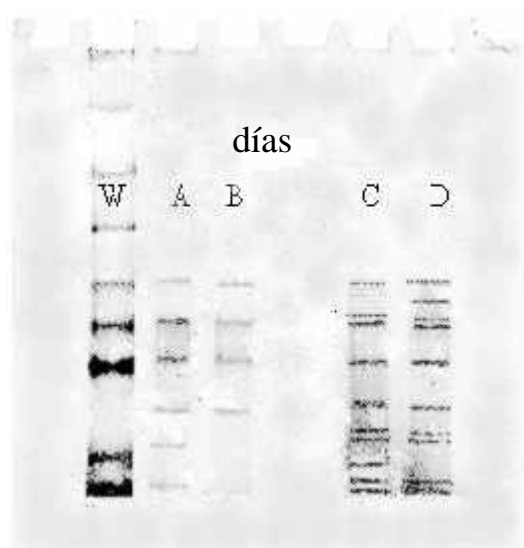


Figura 4.1 Gel en poliacrilamida de la proteína exopolimérica de un lodo nitrificante, en donde W son los marcadores de peso molecular, A y B (15 y 19) días de mínima concentración, C y D (7 y 10) días de máxima concentración.

Los resultados de la electrophoresis en gel de poliacrilamida mostraron que en el lodo (flóculos), hubo un número cambiante de PE a lo largo de los 30 días de estudio. Estos resultados contrastan con los de Higgins y Novak, (1997) ya que ellos encontraron una sola proteína de 15 kDa, después de extraer los exopolímeros del flóculo y realizar la electrophoresis en gel de poliacrilamida. Cabe destacar que los autores citados no usaron las mismas condiciones para la electrophoresis, ni tampoco el mismo método de tinción.

Estos resultados muestran por primera vez que los cambios de concentración de la proteína y el IVL, se acompañan con cambios en el tipo de proteínas exopoliméricas.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

Tabla 4.1 Pesos moleculares de las proteínas exopoliméricas durante los días de máxima concentración (C y D, días 7 y 10) y el día de la mínima concentración (A y B, días 15 y 19).

Proteína	Día A kDa	Día B kDa	Día C kDa	Día D kDa
I	97450	97450	97450	97450
II	93480		93480	
III			89673	
IV	86020		86020	86020
V			82680	
VI	76082	76082	76082	76082
VII	72983	72983	72983	72983
VIII			70010	
IX			63158	
X	61921	61921	61921	61921
XI			59399	
XII	52432	52432	52432	52432
XIII	48344	48344	48344	48344
XIV			44486	44486
XV			42674	42674
XVI	37743		37743	
XVII			34731	
XVIII			31960	31960

4.3.2 ADICIÓN DE PROTEÍNA EXOPOLIMÉRICA AL REACTOR NITRIFICANTE DE REFERENCIA

Con el propósito de ahondar más sobre el papel de las PE sobre la estabilidad estructural del lodo, se llevó a cabo un ensayo en donde se le adicionó la PE al reactor nitrificante. Conociendo el comportamiento de ondas de las PE, en este caso, cuando las PE presentaron su mayor concentración en el lodo (Figura 4.2). Se tomaron 100 mL del lodo y se extrajeron los exopolímeros con EDTA, el extracto se agregó al mismo reactor, cuando la concentración de PE presentó su valor mínimo (Figura 4.3), después se tomaron muestras a los 30 minutos, una hora y dos horas después, para saber si la PE adicionada al reactor modifican substancialmente el valor del IVL. Para obtener el número y el peso molecular de las PE en el punto máximo de concentración y dos horas después de haber adicionado el

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico extracto, se hizo el análisis electrofóretico en gel de poliacrilamida, para comparar con la muestra del mismo lodo, pero sin adicionarle el extracto.

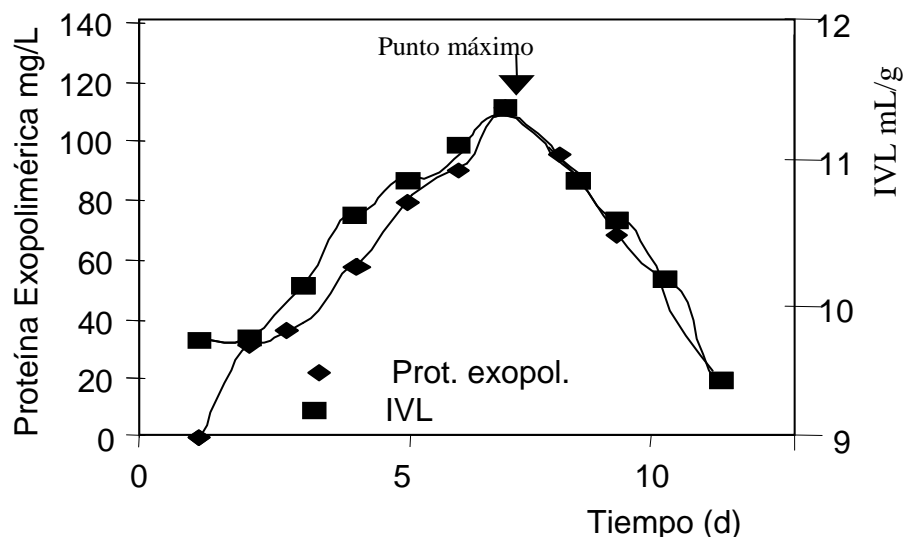


Figura 4.2 Perfil de la proteína exopolimérica y del IVL en los días de máxima concentración.

El punto máximo de la concentración de la PE se presentó el día 7. La concentración de PE fue de 114 mg/L en el lodo y 11mg/L de soluble (Figura 4.2). En el punto mínimo (día 37) la concentración de PE fue de 10 mg/L en el flóculo y de 14mg/L la soluble (Figura 4.3). Después de la adición del extracto al reactor nitrificante la concentración de la proteína exopolimérica soluble aumentó en 40%. El IVL fue medido a los 30 minutos, una hora y dos horas después de agregado el extracto. Los resultados obtenidos señalan que la PE en el lodo no aumentó y el IVL se incrementó un 7.3%. Dado el aumento en el IVL se podría concluir que las PE que constituyen el lodo (flóculo), son las que podrían tener efecto sobre el IVL.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

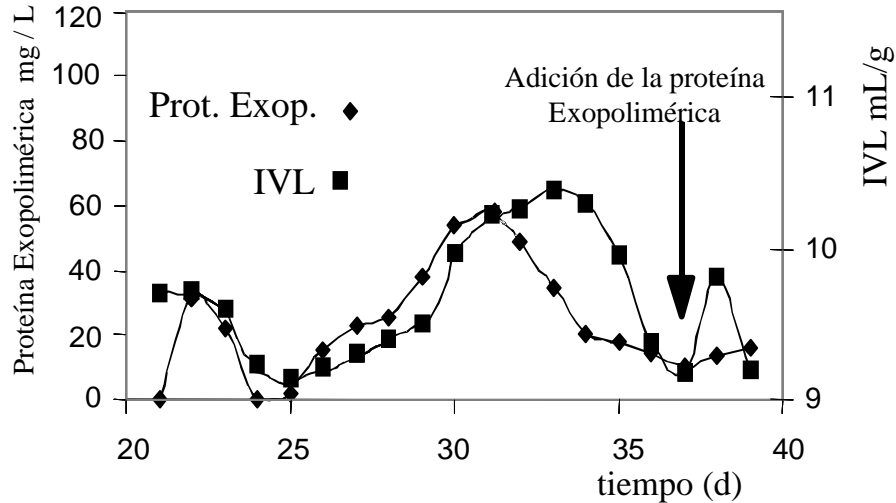


Figura 4.3 Efecto de la adición de la proteína exopolimérica en un reactor en régimen estacionario

4.3.3 ANÁLISIS DE ELECTROFÓRESIS DE LA ADICIÓN DE LA PROTEÍNA EXOPOLIMÉRICA

El análisis electroforético en el gel de poliacrilamida mostró que el número de las proteínas exopoliméricas cambió (Figura 4.4). En el momento de la concentración máxima de PE (día 6,7 y 9), el número de bandas de proteínas exopoliméricas, fue de 23 bandas y en el momento de la concentración mínima (día 36, 37 y 38) se detectaron 20 bandas (Tabla 4.2). Como se puede observar el número de bandas entre el punto máximo y mínimo no cambió considerablemente, aunque la concentración de la PE si fue diferente. En promedio, en el punto máximo fue de 100mg/L y en el punto mínimo fue de 11mg/L lo que podría indicar que la concentración de las diferentes bandas en el gel de poliacrilamida es diferente, aunque no se constato, por dificultades técnicas (la concentración de cada banda es muy pequeña).

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

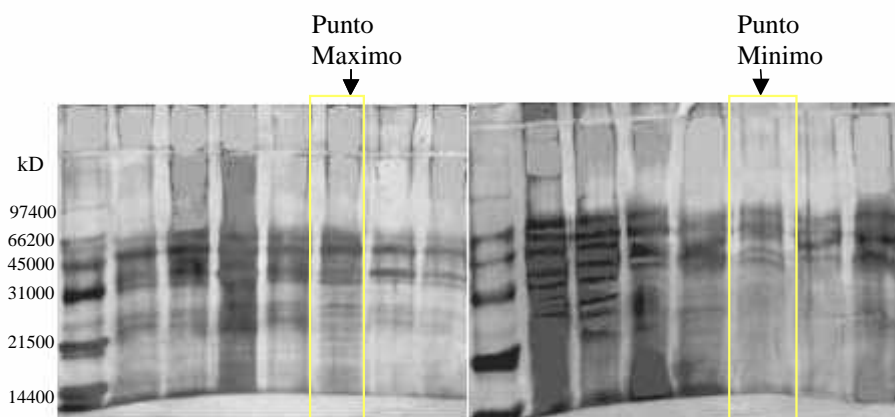


Figura 4.4 Patrones electroforéticos de día 7 y después de adicionada la proteína exopolimérica al reactor nitrificante.

Cuando se compararon los perfiles electroforéticos de los pesos moleculares de las PE en el punto máximo de la concentración, con el perfil electroforético después de adicionar el extracto de exopolímeros (Tabla 4.2), se observó que el 87 % de las bandas se comparten. Cabe destacar que en el punto máximo de concentración de la PE se presentaron tres bandas, mismas que no detectaron después de las dos horas de haber agregado el extracto de exopolímeros. Las bandas referidas presentaban pesos moleculares de 22, 63 y 73 kDa. Puede decirse que no entraron al flóculo. Una forma de explicar esto podría ser, considerando que el método de extracción pudo ser desnaturalizante y que el cambio en su estructura impidió que se asociaran (o enlazaran) a la estructura del lodo. Estudios futuros, más detallado, podrían aportar mayores evidencias y saber si las tres pudieran estar implicadas con los cambios del IVL.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

Tabla 4.2 Peso molecular de las proteínas exopoliméricas durante el día de máxima concentración (B, día 7) y el día donde se adiciono el extracto (A, 37).

Proteínas	Día A (37)	Día B (7)
I	97444	97444
II	86032	86032
III		73346
IV	72824	72824
V		63120
VI	61838	61838
VII	59345	59345
VIII	52167	52167
IX	48004	48004
X	44895	44895
XI	42555	42555
XII	37772	37772
XIII	34738	34738
XIV	31979	31979
XV	30006	30006
XVI	26999	26999
XVII	25385	25385
XVIII		22443
XIX	21102	21102
XX	18656	18656
XXI	16493	16493
XXII	15508	15508
XXIII	14581	14581

Se hizo la comparación de la concentración de las PE, IVL y los pesos moleculares de las PE, de las dos etapas. En la primera la concentración de la PE y el IVL presentaron una concentración máxima de 50 mg/L y un IVL 15 mL/g. (Figura 4.1). En la segunda etapa, la concentración de la PE en su punto máximo fue de 114 mg/L y un IVL de 11 mL/g (Figura 4.2). La concentración de la PE fue mayor un 100% en la segunda etapa con respecto a la primera el IVL fue menor un 26%. Cabe decir que las diferencias en las dos etapas no son fáciles de explicar ya que las condiciones hidráulicas y fisiológicas respiratorias, fueron constantes y las mismas. Al respecto autores como autores Jhan y Nielsen (1998) señalan que las PE además de ser las más abundantes en el lodo, su concentración puede variar de

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

un 7 a 45% en un cierto intervalo de tiempo. Los resultados en este trabajo lo confirman y señalan, que la concentración de PE cambia y es oscilante. Con respecto a las diferencias en la concentración de las PE y el IVL, se hizo necesario evaluar el tipo de proteínas (Bandas), que pueden modificar el valor de IVL. En este sentido se comparó el número de bandas y los pesos moleculares de ambos periodos. Se encontró que el número de bandas de las PE en los dos puntos máximos presentó un total de 23 bandas y fueron similares en un 60 %. El número de PE compartidas es significativo (Figura 4.3). Así mismo se pone en evidencia un número de proteínas en los flóculos, mayor que el reportado por Higgins y Novak, (1997). Se detectaron 7 que se observaron todos los días en las dos etapas. Los pesos moleculares fueron de 37772, 48004, 52167, 61838, 72824, 86032 y 97444 Da, a las que se les podría asignar una función específica en el lodo. Un aspecto contrastante de las etapas fueron las diferencias en sus pesos moleculares. En la primera etapa los pesos moleculares fueron mayores que en la segunda etapa (Tabla 4.3). Estas diferencias podrían estar relacionadas con el 26% en el IVL de ambos periodos, lo que concuerda con los resultados encontrados por Forster (1976 y 1985) quien utiliza lodos activos y encuentra que las PE tienen pesos moleculares entre 30 y 100 kDa. Señala que conforme aumenta el peso molecular, el lodo presentaba problemas de sedimentabilidad.

Se hizo un estudio más detallado ampliando el número de días entre los puntos máximos y mínimos en ambas fases. En los puntos máximos de concentración de la PE, se encontraron tres bandas que no se encuentran en los puntos mínimos. Los pesos moleculares fueron de 22, 63 y 73 kDa, que correspondieron a las bandas con las que no entraron al flóculo después de adicionar el extracto de PE al reactor nitrificante. Nuevamente se observó que estas PE pueden tener un papel relevante en la estabilidad flocular. Trabajos posteriores darán luz sobre este punto.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

Tabla 4.3 Bandas de proteínas exopoliméricas en ambas etapas del experimento

Proteínas	Comunes Máximos Da	Comunes Mínimos Da	Diferentes* Máximo Da	Diferentes* mínimo Da	Diferentes** Máximo Da	Diferentes** mínimo Da
I	97444	97444	93480	93480	73346	59345
II	86032	86032	89673	76082	30006	44895
III	72824	72824	82680		26999	42555
IV	63120	61838	76082		25385	34738
V	61838	52167	70010		22443	31979
VI	59345	48004			21102	30006
VII	52167	37772			18658	26999
VIII	48004				16495	25385
IX	44895				15508	21102
X	42555				14581	18656
XI	37772					16494
XII	34738					15508
XIII	31979					14581

*Primera etapa; **Segunda etapa
Da = Daltons

4.4 CONCLUSIONES

Se operó un reactor en régimen estacionario nitrificante durante varios meses, en los cuales se observó que la PE tuvo un comportamiento de onda. La concentración de PE en sus puntos máximos fue variable. En los dos periodos se analizó el tipo de PE mediante electrofóresis en gel de poliacrilamida. Se encontró que el número de bandas fue similar en promedio (25, bandas), sin embargo, los pesos moleculares fueron distintos. También se observó una variación en el IVL. Cuando los pesos moleculares de las PE fueron mayores, el IVL se incrementó en un 26%. Esto parece indicar que:

- a) La sedimentabilidad del flóculo sí depende de las PE. Sin embargo, el IVL está más relacionado con los pesos moleculares de las PE, que con su concentración.

Estudio de los exopolímeros en un reactor
litoautotrófico

- b) Los lípidos y carbohidratos exopoliméricos no están relacionados con los cambios del IVL y su función puede ser otra.

Estudio de los exopolímeros en un reactor litoautotrófico

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Dignac, M. F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D. and Scribe, P. (1998) Chemical description of extracellular polymers: Implications on activated sludge floc structure. *Water Sci. Tech.* **38**. 45-53.
- Echeverria, E., Seco A. and Ferrer, J. (1992) Study of the factors affecting activated sludge settling in domestic wastewater treatment plants. *Water Sci. Tech.* **25**. 273-279.
- Finlayson, J. C., Liao, B., Droppo, I. G., Leppard, G. G. and Liss, N. S. (1998) the relationship between the structure activated sludge flocs and the sorption of hydrophobic pollutants. *Wat. Sci. Tech.* **37**. 353-357.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects. *Water Sci. Tech.* **43**. 9-16.
- Forster, C. F. (1976) Bioflocculation in the activated sludge process. *Wat. SA.* **2**, 119-125.
- Forster, C. F. (1985). Factors involved in the settlement of activated sludge-I. *Wat. Res.*, **19**, 1259-1264.
- Goel, R., Mino, T., Satoh H. and Matsuo, T. (1998) Comparison of hydrolytic enzyme systems in pure culture and activated sludge under Different electron acceptor conditions. *Water Sci. Tech.* **37**. 335-343.
- Goodwin, J. A. S. and Forster, C. F., (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Res.* **19**. 527-533.
- Higgins, M. J. and Novak L.T. (1997) Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Envir.Engineering.* **123**. 479-485.
- Jahn, A. and Nilsen, P. H., (1998) Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci. Tech.* **37**. 17-24.

Estudio de los exopolímeros en un reactor
litoautotrófico

Jorad, F., Boue-Bigne, F., Block, J. C. and Urbain, V. (1998) Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci. Tech.* **37**, 307-315.

King, O. R., and Forster, C.F. (1990) Effect of on activated sludge. *Enzyme Microb. Technol.* **12**. 109-115.

Shin, H. S., Kang, S. T. and Nam, S. Y. (2001) Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics *Water Sci. Tech.* **43**. 193-196.

Urbain, V., Block, J. C. and Manem, (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach., *Wat. Res.* **27**. 829-838.

CAPÍTULO 5

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS EXOPOLIMÉRICAS EN LA SEDIMENTABILIDAD DE LOS FLÓCULOS Y BIOPELÍCULAS NITRIFICANTES

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

5.1 RESUMEN

En este capítulo se compararon los exopolímeros de 2 reactores, el primero, un reactor de referencia de tanque agitado (RNR); el segundo, un reactor airlift de biopelícula, en donde ésta se núcleo a partir de basalto (RNAB). Los exopolímeros de ambos reactores, se compararon con un tercer reactor airlift nitrificante, en donde la biopelícula se obtuvo a partir de flóculos (RNAF). Los tres reactores fueron alimentados con medio litoautotrófico. En estas condiciones se llevó a cabo la determinación de la concentración de los carbohidratos, proteínas y lípidos exopoliméricos durante 30 días, al igual que en el capítulo previo. Algunos de los resultados son diferentes (RNR del capítulo 4), debido a que parte de las actividades experimentales se realizaron en otro laboratorio (Universidad de Santiago de Compostela España), con un reactor RNR similar, pero con un tiempo de residencia diferente.

Durante el periodo de experimentación, en el RNR la proteína exopolimérica y el IVL, presentaron un comportamiento de onda. En el RNAB, no se observó claramente ese comportamiento. En el punto de máxima concentración de proteínas exopoliméricas en el RNR, se determinaron 18 bandas. Sus pesos moleculares oscilaron de 31 a 97 kDa. En el mismo caso para el RNAB, se presentaron 16 bandas. Sus pesos moleculares oscilaron entre 13 y 44 kDa. Por su parte, en el RNAF, se observaron 29 bandas, con pesos moleculares que oscilaron desde 14 hasta 222 kDa. Asimismo, se detectaron tres bandas de proteínas exopoliméricas con pesos moleculares de 22, 63 y 72 kDa, que pudieran estar relacionadas con los cambios en el IVL.

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

5.2 OBJETIVO.

Cuantificar, analizar y comparar, el comportamiento de los exopolímeros (carbohidratos proteínas y lípidos) de flóculos y biopelículas con respecto al tiempo y su relación con el IVL, así como el número y peso molecular de las proteínas exopoliméricas en ambos tipos de estructura.

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 PAPEL DE LOS EXOPOLÍMEROS EN LA SEDIMENTABILIDAD DE LOS FLÓCULOS Y LA ESTABILIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS

Se utilizaron dos reactores nitrificantes un RNR y RNAB alimentados con medio litoautotrófico. Los detalles del régimen estacionario nitrificantes se presentaron en el capítulo 3 (Tabla 3.1). En estas condiciones se llevó a cabo la determinación de la concentración de los carbohidratos, proteínas y lípidos exopoliméricos durante 30 días. Para el RNR el periodo de 30 días fue diferente al del capítulo anterior. Durante este intervalo de tiempo el RNR, la proteína exopolimérica y el IVL presentaron el comportamiento de onda, previamente descrito. En el reactor airlift, se observó dicho comportamiento pero la amplitud de la onda fue mas corto, aproximadamente 7 días. En el RNR las PE presentaron una variación de 18%, en tanto el IVL presentó una variación del 17 %. Con respecto al RNAB, la variación de la PE fue de 40%, en tanto el IVL tuvo variación del 37% (Tabla 5.1). Comparando la concentración de la proteína exopolimérica en ambos reactores nitrificantes, la variación fue del 10%, (la prueba de Tukey no mostró una diferencia significativa $\alpha=0.05$). Con respecto al IVL, empleando la prueba de Tukey, en ambos reactores si presentaron diferencia significativa, siendo mayor para el RNAB. Esto es la diferencia en el IVL en ambos reactores no se puede atribuir sólo a la concentración de la PE. No obstante, en ambos reactores el IVL y la proteína exopolimérica presentaron el mismo perfil, dado que, a medida que la proteína exopolimérica aumentaba, también aumentaba el IVL. A pesar de este comportamiento similar de la PE y del IVL, la diferencia de concentración entre de la PE, en los dos reactores nitrificantes, por sí sola no explica los cambios del IVL, sino que puede haber factores físico-químicos (hidrofilicidad e hidrofobicidad) de las PE que puedan incidir en los cambios del IVL. Lo que sí puede

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

establecerse es la fuerte correlación de las proteínas exopoliméricas con el IVL, como lo han planteado algunos autores (Urbain y col., 1993; Flemming y Wingender, 2001; Shin y col., 2001).

Tabla 5.1 concentración de los exopolímeros y el IVL de los reactores de referencia y de biopelícula nucleado con basalto.

Reactor	IVL (mL/g)	Carbohidratos (mg/L)	Proteínas (mg/L)	Lípidos (mg/L)
RNR	6±0.7	33±3	51±9	31±2
RNAB	22±8	18±1	56±25	9±1

Analizando los cambios de concentración de los carbohidratos y los lípidos exopoliméricos durante el tiempo de estudio, se pudo apreciar de nueva cuenta que en ambos reactores no hubo cambios significativos (prueba de Tukey $\alpha= 0.05$), la variación de concentración fue menor del 10%, por lo que no se les podría relacionar con los cambios que presentó el IVL. De los dos reactores nitrificantes se tomaron muestras durante 30 días y se cuantificó el número de PE y se estimaron sus pesos moleculares. En el RNR, las PE presentaron en su punto de máxima concentración un total de 18 bandas. El intervalo de pesos moleculares para las PE en su punto máximo y mínimo fue de 31 a 97 kDa. En el RNAB, las PE en su punto de máxima de concentración fue de 16 bandas. El intervalo de peso molecular de las PE en su punto máximo y mínimo fue de 13 a 44 kDa. Esta diferencia en los pesos moleculares sería el argumento que explique las diferencias estructurales de los flóculos y biopelículas. Las diferencias en los pesos moleculares y número de bandas de las proteínas exopoliméricas en ambas estructura (flóculo o biopelícula) de los lodos, puede deberse a las características físico-químicas de los exopolímeros en la biopelícula. Estas diferencias

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas podrían ser las que están determinando la estabilidad del lodo. Para más detalle consultar el apéndice 2.

5.3.2 REACTOR AIRLIFT NUCLEADO A PARTIR DE FLÓCULOS (RNAF)

Para determinar si las diferencias en la concentración de los exopolímeros y su comportamiento, así como el número y el intervalo de pesos moleculares de las proteínas exopoliméricas observado en el reactor RNAB, se mantienen con cualquier reactor de biopelícula, se trabajó con un reactor RNAF, donde los carbohidratos y los lípidos exopoliméricos presentaron una concentración media de 12 ± 3 g/L y 37 ± 5 g/L, con una variación del 25 y 14%, respectivamente. La concentración de las proteínas exopoliméricas fue 59 ± 27 g/L, con una variación de 45 %. Por otra parte, el IVL presentó un valor medio 28 ± 6 mL/g (una variación del 22%). La proteína exopolimérica y el IVL, en el mismo periodo presentaron el comportamiento previamente determinado para el RNAB, observándose los ciclos en tiempos más cortos, aproximadamente 5 días (Figura 5.1), conservando la característica de la PE y el IVL, en donde ambos aumentan y disminuyen al mismo tiempo. El cambio de los intervalos de los ciclos de los reactores airlift, comparados con el RNR, puede deberse a diferentes factores, como pueden ser la geometría del reactor, la velocidad de carga y los esfuerzos cortantes. Inclinarsé preferentemente sobre de estos factores podría ser aventurado, ya que no se tienen evidencias claras. Sin embargo, autores como Cuervo-López y col. (1999) encuentran que las proteínas exopoliméricas, pueden cambiar el número de oscilaciones con respecto al tiempo y su amplitud, sólo variando la fuente de carbono, lo que haría pensar que otros factores como la velocidad de carga de los reactores airlift y el RNR, podría ser importante en el cambio del intervalo de las ondas y el número de ciclos de la PE y el IVL.

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

Comparando la concentración media de carbohidratos y lípidos exopoliméricos en los dos reactores airlift, los carbohidratos exopoliméricos no presentaron diferencia significativa (Tukey $\alpha= 0.05$). En tanto los lípidos exopoliméricos sí fueron diferentes, siendo mayor el cambio en el RNAF. La diferencia sugiere que, o bien el tipo de microorganismos fue diferente, o hubo cambios metabólicos distintos, entre ambos reactores de biopelícula, la concentración de la proteína exopolimérica, no fue diferente (menos del 10%, $\alpha= 0.05$), pero el coeficiente de variación en el IVL en cada reactor fue del 5% y 20%, siendo significativamente mayor por el RNAF.

En los tres reactores RNR, RNAB y RNAF la PE no es diferente en su concentración, pero en cambio el IVL si es diferente para los tres reactores, lo que descarta que la variación del IVL pueda ser debida a la concentración de las PE. El cambio pudo deberse a las características inherentes de las PE. Jorand y col., (1998) hacen referencia a que ciertas propiedades particulares de las PE pueden influir en los cambios estructurales de los lodos activados, pero no aportan evidencias que soporten sus argumentos.

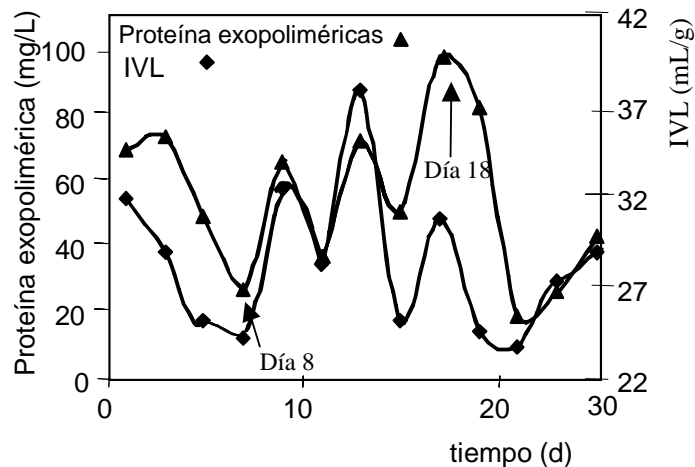


Figura 5.1 Perfil de la proteína exopolimérica y del IVL en un reactor airlift de biopelícula, en estado estacionario nucleado a partir de flóculos.

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

En el RNAF, se determinó el número de bandas, en los puntos mínimos y máximos (días 8 y 18 respectivamente) de concentración de la PE, (Figura 5.1). En los geles de poliacrilamida se observó un gran número de bandas de proteína exopoliméricas, que cambian en los diferentes días, tanto en su número, como en su intensidad (Figura 5.2), que coinciden con los cambios de concentración de la proteína exopolimérica.

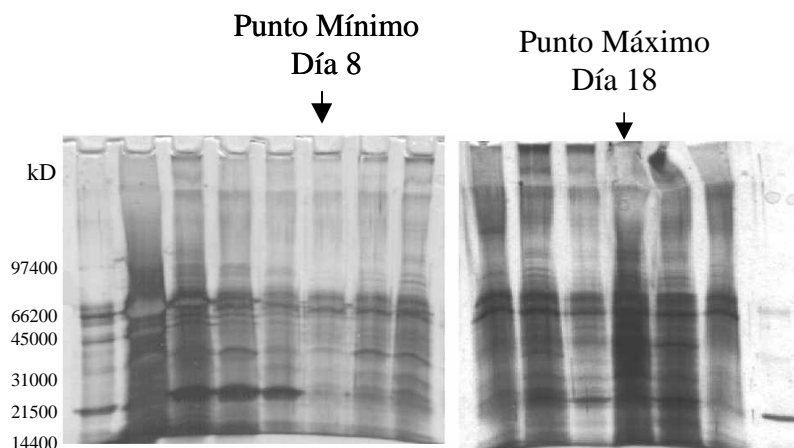


Figura 5.2 Patrones electroforéticos de la proteína exopolimérica en un reactor airlift de biopelícula, nucleado a partir de flóculos.

El total de proteínas diferentes durante el muestreo de los 30 días fue de 43, más del doble de las observadas en los reactores anteriores. En el punto mínimo y máximo de concentración de la PE se observaron 16 bandas y 29 bandas respectivamente. El intervalo de pesos moleculares de las bandas fue de 14 a 222 kDa, siendo mayor que en el RNAB y que el RNR. El peso molecular de las PE en el RNAF, podría explicar el por qué de las diferencias encontradas en el IVL. Trabajando con lodos activos Forster (1976 y 1985) mencionaron la presencia de una fracción importante de exopolímeros con un peso molecular entre 30 y 100 kDa, encontrando que conforme aumenta el peso molecular, el lodo presentaba problemas de sedimentabilidad.

Los resultados del análisis electroforético se muestran en la Tabla 5.1.

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

Tabla 5.1 Peso molecular de las proteínas exopoliméricas en los días de máxima concentración (C, D que corresponden al día 18 y 19) y mínima concentración (A y B días 7 y 8), en el reactor nucleado con flóculos.

Proteínas	Días			
	A kDa	B kDa	C kDa	D kDa
I			222377	222377
II		209931		209931
III			166734	
IV			157402	157402
V			148592	148592
VI		140276		140276
VII		136294		
VIII		111412	114667	
IX			108249	
X		96471	96471	
XI				93733
XII		91072	91072	
XIII	85975			
XIV			83534	83534
XV			78859	
XVI	73445		73445	73445
XVII			72332	
XVIII			70279	
XIX	68284	68284		68284
XX	66345		66345	
XXI			63232	63232
XXII	59127	59127	59127	
XXIII	55817	55817	55817	55817
XXIV	49744	49744	49744	
XXV			48332	
XXVI	46960			46960
XXVII			45627	
XXVIII	44332			44332
XXIX	41851			
XXX			39508	
XXXI	37297			
XXXII			33239	
XXXIII			31379	
XXXIV	29622			
XXXV				27965
XXXVI		26399	26399	26399
XXXVII			24922	
XXXVIII	23527	23527		23527
XXXIX			22210	
XL	20967	20967		
XLI	18686	18686	18686	
XLII		16653	16653	16653
XLIII	14841	14841	14841	14841

Para analizar electroforéticamente las PE del RNAF se tomó el día 7 (un día antes y un día después) y se compararon con los del día 18 (también un día antes y un día después) para hacer la comparación de bandas, contra los otros reactores. La PE en su punto de máxima

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas
concentración (día 7) presentó tres bandas que no fueron observadas cuando las PE tuvieron su concentración más baja. Las 3 bandas presentaron pesos moleculares de 22, 63 y 72 kDa, (Tabla 5.1). Las cuales fueron también previamente observadas en el RNR (ver detalles, Capítulo 4). Comparando los lodos de los RNR, RNAB, respecto al RNAF el número de bandas de PE fue más bajo (menor al 50% en los 2 primeros). El RNAB, sólo compartió la banda, con un peso molecular de 22 kDa. Esto es las bandas de 63 o 72 kDa no se detectaron y podrían ser las que hayan establecido la diferencia del 20% en el IVL entre los dos reactor airlift.

En la literatura, existen escasos reportes del peso molecular de las proteínas exopoliméricas y aún menos sobre de su número. Forster, (1985) extrajo los exopolímeros por medio de calor, sin mencionar ninguna característica y origen de los lodos. Los exopolímeros fueron separados en una columna de filtración en gel y detectados con luz ultravioleta a 280 nm. El autor encontró que los exopolímeros presentaron pesos moleculares de 30 a 100 kDa. El autor mencionó que a esta longitud pudo haber interferencia por los ácidos nucleicos y otros compuestos aromáticos, en consecuencia, no indicó el número de estos exopolímeros. Higgins y Novak, (1997) utilizaron NaOH 1 mM y ultrasonido a 37 W para disgregar el lodo, separando las proteínas exopoliméricas en gel de poliacrilamida al 10%. Encontraron sólo una proteína de 15 kDa, lo que puede explicarse por haber utilizado una concentración baja (1 mM) de NaOH. Generalmente, para la extracción de los exopolímeros se utiliza NaOH a 2 M (Tezuka, 1973). Con respecto a la sonicación, King y Forster, (1990) encontraron que entre 15 y 75 W/minuto se puede disgregar el flóculo, pero depende de los exopolímeros (carbohidratos, lípidos y proteínas) que formen el lodo. Queda la duda de si bajo estas condiciones de extracción las proteínas exopoliméricas fueron liberadas. Asimismo, los autores no mencionan si el método de revelado fue el pertinente, debido a

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

que la concentración de proteína exopolimérica pudo ser muy baja en el lodo y no ser detectada si se usó azul de Coomassie para detectarlas. Flemming y Wingender, (2001), mencionan que las biopelículas pueden estar formadas por un gran número de proteínas y que su peso molecular podría estar entre 5 y 150 kDa, aunque no indican como hacen el estudio de los exopolímeros, ni tampoco cómo se determinó el peso molecular de las proteínas exopoliméricas, ni su número. Considerando todos estos antecedentes los resultados de este trabajo son novedosos, ya que se evidenció que dependiendo de la forma de obtenerse la biopelícula, la velocidad de carga, es probable afectar el número de proteínas exopoliméricas en el lodo, su peso molecular y posiblemente sobre sus propiedades físico-químicas.

5.4 CONCLUSIONES

En general, se observó que los cambios de PE del RNR, RNAB y RNAF tuvieron un perfil de onda con respecto al tiempo. El promedio de bandas de PE en el RNR fue de 18, con pesos moleculares entre los 31 y 97 kDa, variación que se vio reflejada en los cambios del IVL. Los pesos moleculares en el RNAB fluctuaron entre 13 y 44 kDa y el número de PE fue de 16. En este mismo reactor, las variaciones en el IVL (28 ± 8 mL/g) fueron mayores que en el RNR. Los resultados evidenciaron que las variaciones en el IVL están mayormente relacionados con los pesos moleculares de las PE, las cuales a su vez, podrían ser dependientes del tipo de reactor y las condiciones de operación. Por otra parte, en el RNAF la concentración máxima de PE fue de 59 ± 27 mg/L, con valores de IVL de 28 ± 6 mL/g, variaciones menores que en el RNAB. Los cambios en el RNAF fueron menores que en el RNAB, puesto que los pesos moleculares estuvieron entre 14 y 222 kDa, con un

Estudio de los exopolímeros de flóculos y
biopelículas
número de bandas de PE de 43. Se observó que en el RNAF, los intervalos de tiempo entre las concentraciones de PE en los puntos máximos y mínimos fueron más cortos que en el RNR. La evidencia encontrada apunta que los cambios del IVL se asocian a los pesos moleculares de las PE más que a los cambios en la concentración de las mismas. De hecho en lodos litoautotróficos se observó que el IVL aumentó cuando se presentaban PE con pesos moleculares bajos.

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

5.5 BIBLIOGRAFÍA

- Cuervo-Lopez, F. M. Martinez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Noyola, R. A. and Gómez, J. (1999) Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* **40**.123-130
- Forster, C. F. (1976) Bioflocculation in the activated sludge process. *Wat. SA.* **2**.119-125.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects. *Water Sci. Tech.* **43**. 9-16.
- Forster, C. F. (1985). Factors involved in the settlement of activated sludge-I. *Wat. Res.* **19**. 1259-1264.
- Forster, C. F. (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge-II : The binding of polyvalent metals *Water Res.* **19**. 1265-1271.
- Higgins, M. J. and Novak, L.T. (1997) Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Envir.Engineering.* **123**. 479-485.
- Jorad, F., Boue-Bigne, F., Block, J. C. and Urbain V. (1998) Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci. Tech.* **37**, 307-315.
- King, O. R. and Forster, C.F. (1990) Effect of on activated sludge. *Enzyme Microb. Technol.* **12**. 109-115.
- Shin, H. S., Kang, S. T. and Nam S. Y. (2001) Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Sci. Tech.* **43**, 193-196.
- Tezuka, Y. (1973) A Zoogloea bacterium with gelatinous mucopolysaccharides matrix. *J. Water Pollut. Control. Fed.* **45**. 531-536.

Estudio de los exopolímeros de flóculos y biopelículas

Urbain, V., Block, J. C. and Manem, J. (1993) Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Water Res.* **27**. 829-838.

CAPÍTULO 6

ESTUDIO DE LOS EXOPOLÍMEROS EN REACTORES NITRIFICANTES ALIMENTADOS CON MATERIA ORGÁNICA

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

6.1 RESUMEN

En este trabajo fueron comparados tres reactores nitrificantes de tanque agitado. El primero fue alimentado con medio litoautotrófico y utilizado como referencia (RNR). El segundo reactor nitrificante de tanque agitado (RNA), fue alimentado con un influente adicionado de acetato, puesto que fue acoplado a un reactor desnitrificante. El RNA se alimentó con una velocidad de carga de C-acetato ($Q_{(i)c-acet}$) de 0.16 ± 0.2 g/L•d. El tercer reactor nitrificante de tanque agitado (RNOC), se alimentó con aguas residuales complejas (aguas de conservera) debido a que estuvo acoplado a un reactor desnitrificante que trataba este tipo de aguas. El RNOC se alimentó con una velocidad de carga $Q_{(i)carb}$ de 0.19 g/L•d.

A los tres reactores nitrificantes de tanque agitado se les determinó el IVL y la concentración de exopolímeros (carbohidratos, lípidos y proteínas) y el número de proteínas exopoliméricas y sus pesos moleculares. La adición de materia orgánica a los reactores nitrificantes produjo un incremento del índice volumétrico del lodo (IVL). La materia orgánica en los reactores nitrificantes no tuvo efecto sobre la concentración de los exopolímeros. Las proteínas exopoliméricas en los lodos nitrificantes cambiaron su número y pesos moleculares, presentando el RNA el promedio más alto de proteínas exopoliméricas.

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

6.2 OBJETIVO.

Estudiar, evaluar y cuantificar el efecto de la materia orgánica en la composición de los exopolímeros de los lodos, así como su efecto en la sedimentabilidad de un lodo nitrificante floculante, en un reactor en estado estacionario nitrificante.

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Exopolímeros en los reactores RNR, RNA y RNO

En este trabajo se comparan tres reactores nitrificantes de tanque agitado. En la Figura 6.1 se muestra el comportamiento de las PE e IVL del RNR. La PE y el IVL presentaron un comportamiento de onda con periodos de tiempo entre una concentración máxima y un mínima de la PE, de aproximadamente 10 días.

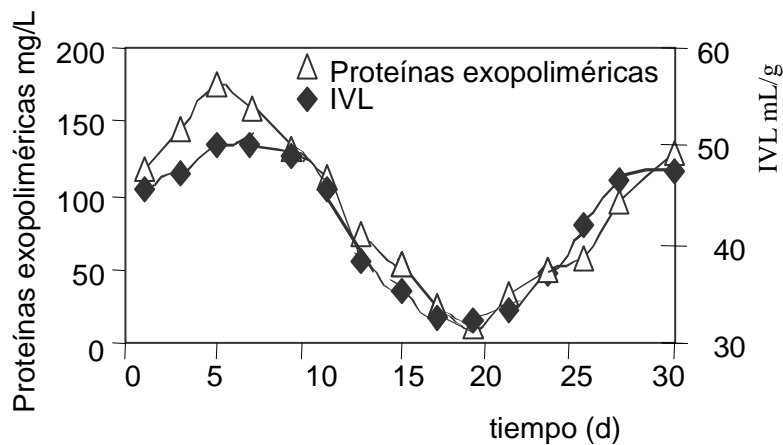


Figura 6.1 Comportamiento de la PE y el IVL con respecto al tiempo, en un reactor alimentado con medio litoautotrófico.

Los lípidos exopoliméricos (LE) y carbohidratos exopoliméricos (CE) no presentaron el comportamiento de onda y permanecieron con variaciones poco significativas con respecto al tiempo, tal como se puede observar en la Tabla 6.1.

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

Tabla 6.1 concentración media de los exopolímeros y el IVL en los tres reactores nitrificantes durante el periodo de treinta días.

	Exopolímeros			
	IVL mL/g	Carbohidratos mg/L	Proteínas mg/L	Lípidos mg/L
RNR	40±10	26±5	82±47	224±28
RNA	66±25	27±4	93±38	41±6
RNOC	64±13	39±4	93±41	48±5

RNR, reactor nitrificante de referencia; RNA, con acetato; RNOC, con materia orgánica compleja.

En el RNA, el comportamiento de las PE no fue la forma característica de onda del RNR, ya que la frecuencia de la onda de la PE fue más corta (aproximadamente 5 días). De hecho, el IVL no seque el comportamiento previamente observado (capítulo 4 y 5). El IVL fue cambiando con respecto al tiempo (Figura 6.2). La PE presentó una gran variación (Tabla 6.1), pero permaneció en un cierto intervalo de concentración (50 a 150 mg/L). Los CE y LE permanecieron sin cambios significativos con respecto al tiempo.

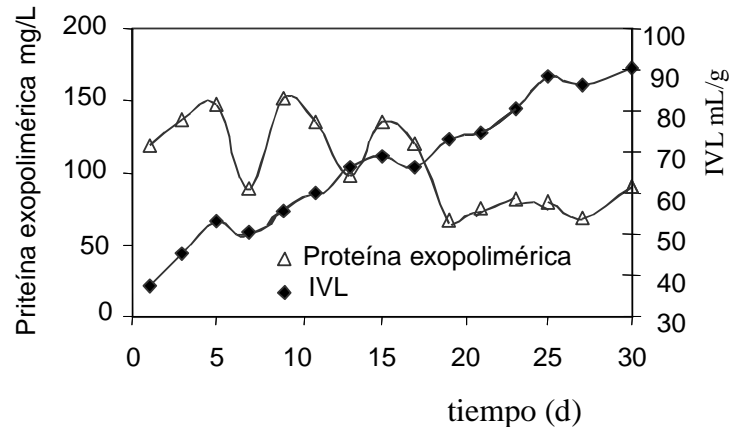


Figura 6.2 Comportamiento de las PE y el IVL en un reactor alimentado con acetato

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

En el reactor nitrificante alimentado con aguas residuales complejas, provenientes de una industria conservera (RNOC), el comportamiento de la PE y el IVL no fue tan claro como el del RNR, aunque también se observó un comportamiento de onda, pero irregular (Figura 6.3). En el RNOC la PE y el IVL presentaron el mismo perfil, ya que a medida que aumenta la concentración de PE aumenta el IVL. Los CE y LE permanecieron con cambios bajos con respecto al tiempo (Tabla 6.1).

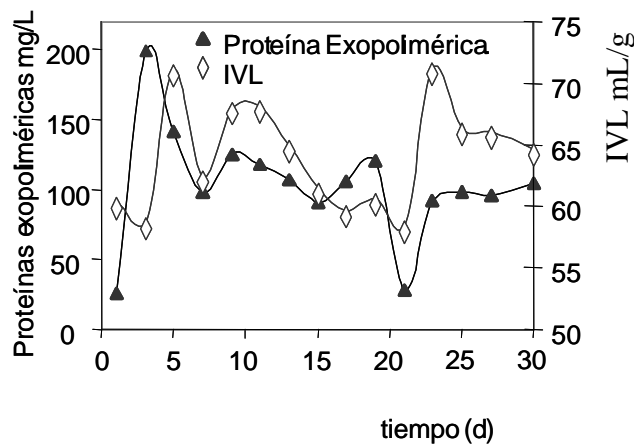


Figura 6.3. Comportamiento de la PE y el IVL con respecto al tiempo, en un reactor alimentado con aguas residuales complejas

6.3.2 COMPARACIÓN DEL RNR, RNA y RNOC

A pesar de que los tres reactores se encuentran en el intervalo de IVL en donde la sedimentabilidad es considerada como buena (Forster, 1971; Lee y col., 1983; Goodwin y Forster, 1985; Novak y col., 1993), en los reactores alimentados con materia orgánica se observó un incremento en el IVL, en comparación con el control.

Se realizaron análisis de estadísticos, con la finalidad de determinar si la materia orgánica tiene efecto sobre IVL y la concentración de los exopolímeros en los tres reactores. En los RNOC y RNA, el IVL no presentaron una diferencia significativa, mientras que en el RNR

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

sí presentó una diferencia significativa ($\alpha=0.05$), por lo que la materia orgánica en los RNOC y RNA, sería la causante del cambio en el IVL.

En los RNR, RNA y RNOC se cuantificaron las sustancias exopoliméricas, en donde la PE presentó una concentración mayor (más 100%) que la de los CE, que concuerda con lo reportado por autores como Jahn y Nielsen, (1995) y Jahn y Nielsen, (1998), siendo la PE el componente principal de los exopolímeros. También se realizaron comparaciones múltiples (Tukey, $\alpha=0.05$) de la concentración de la PE entre los tres reactores, donde se confirma que no hubo diferencia significativa, por lo que los cambios en el IVL no estuvieron relacionados con la concentración de las PE, sino a la alimentación de materia orgánica, siendo un resultado novedoso ya que autores como Novak y col., (1993); Urbain y col., (1993); Dignac y col., (1998) y Martínez y col., (2000), relacionan la concentración de la PE con los cambios en el IVL, lo cual no es aplicable para todos los casos. Con respecto a la concentración de los CE los análisis de varianza ($\alpha=0.0005$), entre los tres reactores, no hubo diferencia significativa, por lo que la materia orgánica no tuvo efecto sobre la concentración de estos.

Se analizaron los LE en los tres reactores por análisis de varianza, en donde sí se presentó una diferencia significativa, siendo el RNR diferente. En el RNR se detectó la mayor concentración. El hecho es de que en este reactor se obtuvo el menor valor de IVL, resultado diferente a los encontrados en los RNR en capítulos previos y los reportados por Goodwin y Forster, (1985) quien menciona que una concentración alta de lípidos puede ocasionar un incremento en el IVL. Esto sugiere que no es aplicable a todos los casos.

Del análisis de los exopolímeros en los tres reactores nitrificantes, en donde la única diferencia fue la alimentación de materia orgánica, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de las PE. En la literatura se menciona que las proteínas y

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

las PE cambian según los substratos utilizados (Huber y col., 1998; Cuervo-López y col., 1999), por lo que en este trabajo se hizo un análisis electroforético de las PE, en donde se busca una posible relación entre el aumento del IVL y el número o el peso molecular de las PE.

En los tres reactores nitrificantes se llevó a cabo la electrofóresis en gel de poliacrilamida de las PE. En la Figura 6.4 se muestra las bandas de PE encontradas en el RNR, en el punto máximo y mínimo de concentración en un periodo de 30 días. Los pesos moleculares oscilaron entre 11 y 119 kDa

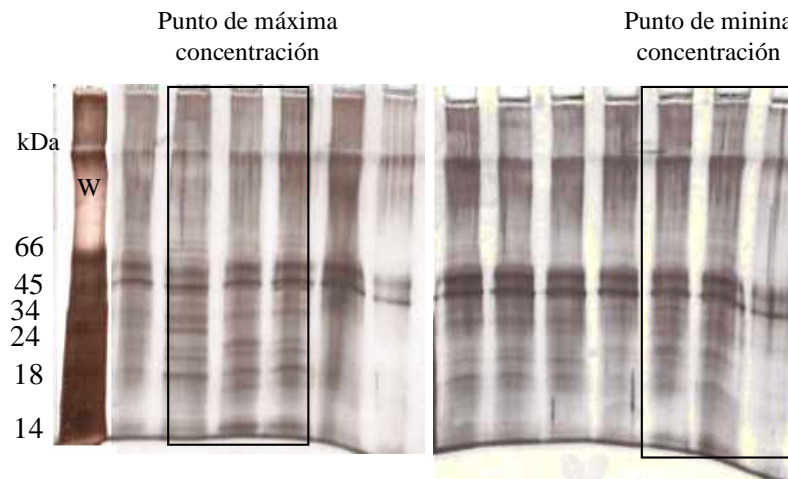


Figura. 6.4 Patrones electroforéticos de las proteínas exopoliméricas del reactor nitrificante alimentado con medio litoautotrófico. W es el marcador de pesos moleculares.

En la Figura 6.5 se presentan los patrones electroforéticos del RNA y puede apreciarse que el número de PE cambia en el periodo de treinta días. El intervalo de pesos moleculares de las PE en este reactor fue de 15- 155 kDa. El promedio de PE durante el periodo de experimentación fue de 22 bandas (Tabla 6.2).

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

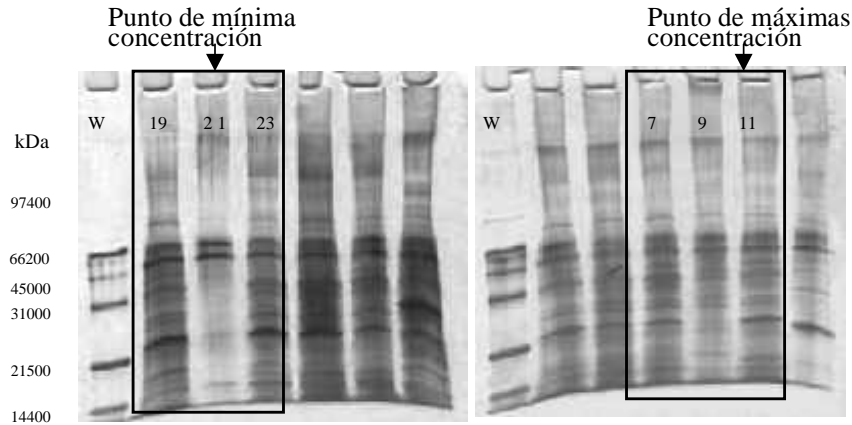


Figura. 6.5 Patrones electroforéticos de las proteínas exopoliméricas del reactor nitrificante alimentado con acetato, en donde W son los marcadores de peso molecular.

En la Figura 6.6 Se presenta los patrones electroforéticos de las PE del RNOC, donde el intervalo de pesos moleculares fue de 13 a 131 kDa, menor que en el RNA, aunque esta diferencia no fue significativa y parecido al RNR. El promedio de PE en el RNOC fue de 18.

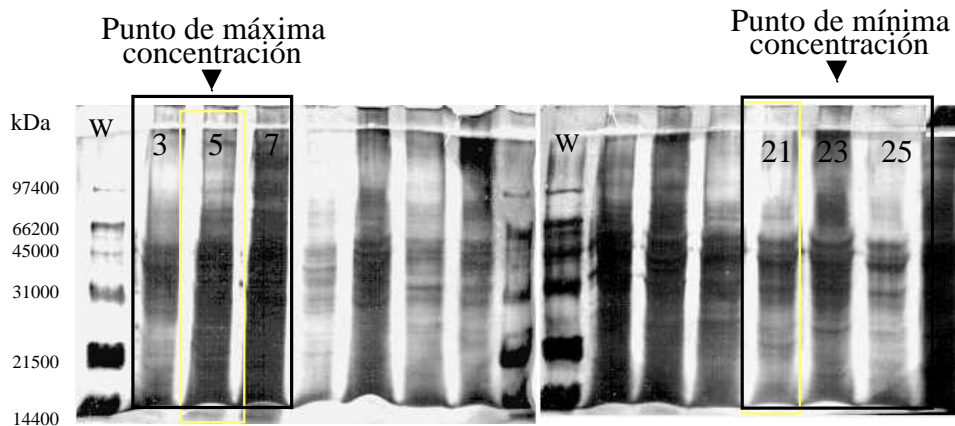


Figura 6.6 Patrones electroforéticos de las PE del reactor nitrificante alimentado con aguas residuales complejas, en donde W son los marcadores de peso molecular

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

En la Tabla 6.2 presenta el intervalo de pesos moleculares de los tres reactores nitrificantes donde también se incluye el número de bandas y los pesos moleculares de las PE en un periodo de 30 días. El análisis electroforético de las PE indicó que no sólo su concentración varió a lo largo del tiempo, sino también en su número de bandas y sus pesos moleculares. El número de bandas de las PE en los tres reactores (RNR, RNA y RNOC) fue de 16 a 22. Las diferencias en el número de bandas fueron analizadas por la prueba de Tukey encontrándose que los RNR y el RNOC no presentaron diferencia significativa, aunque sí el RNA ($\alpha= 0.05$). Esto podría confirmar que la adición de acetato tuvo efecto sobre el número de bandas en los flóculos nitrificantes. Los resultados concuerdan con los reportados por Huber y col., (1998) quienes alimentando los reactores con diferentes medios (complejos o sencillos), observaron cambios en el número de bandas de proteínas microbianas. En este trabajo también se encontró un alto número de bandas de PE en los tres reactores, con diferentes intervalos de pesos moleculares. A diferencia de Higgins y Novak, (1997) quienes sólo encontraron una banda de PE de 15 kDa.

Tabla 6.2 Intervalo de pesos moleculares y número de bandas durante los 30 días de experimentación.

Reactor	No de bandas de PE	Peso Molecular (kDa)
RNR	16±4	11 – 119
RNA	22±5	15 – 155
RNOC	18±2	13 - 131

De cada uno de los reactores se comparó sus puntos de máxima concentración de la PE con sus puntos mínimos. En la Tabla 6.3 se presentan las PE del RNR, RNA y RNOC que se encontraron en el punto máximo de concentración, pero no están presentes en el punto

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica
mínimo de concentración de las PE. El número de bandas de PE, en el punto máximo, fue del RNR. En la Tabla 6.3 también se muestran tres bandas que se encuentran en todos los reactores nitrificantes y que se presentan en el punto máximo de concentración de PE y IVL. Sería importante determinar su aporte en los cambios de IVL en los reactores nitrificante.

Tabla 6.3. Pesos moleculares de las PE de los tres reactores nitrificantes

Proteínas exopoliméricas que sólo se presentaron en el máximo de concentración				
RNR	RNA	RNOC	RNR y RNOC	RNR, RNA y RNOC
22919	22919	22919	63371	22919
30122	31169	25540		42389
31169	35733	30122		73221
33373	36975	42389		
35733	38296	63371		
42389	42389	73221		
59651	57298			
66089	63371			
73221	73221			

En la Tabla 6.4 se muestran los pesos moleculares de las PE que podrían estar relacionadas con la composición del influente, lo cual concordaría con los resultados obtenidos por Cuervo-López y col., (1999), quienes suministraron diferentes substratos a un reactor desnitrificante y observaron que las PE cambiaban en el lodo. En el caso del RNR se presenta 9 proteínas que representan el 50% de las proteínas totales del proceso litoautotrófico, que podrían ser características del proceso nitrificante litoautotrófico. El 88% de las PE son de bajo peso molecular.

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

Tabla 6.4 PE exclusivas y PE comunes de los tres reactores nitrificantes

Sólo en RNR	Sólo en RNA	Sólo en RNOC	Ambos RNA y RNOC	Todos los días RNR, RNA y RNOC
10809	92494	23143	25540	16217
11574	118127	60258	38296	45387
12394	150336	70087	39854	48596
18673	155284	85729	57298	52032
21406		128268	63371	
33373		131539	95538	
46964			105285	
50285			116026	
119145				

El RNA presenta sólo 4 proteínas exopoliméricas, que podrían estar relacionadas con la alimentación de acetato al reactor (Tabla 6.4). Con respecto al RNOC el número de proteínas características del influente fue de 8. El 73% de las PE en ambos reactores presentaron pesos moleculares altos (mas de 60 kDa) comparado con el RNR. Los tres reactores nitrificantes presentan bandas comunes de PE, que se presentan todos los días. Estas PE parecen tener un papel que jugar en la estructura del lodo, ya que se encuentran siempre y en cualquier momento.

Pocos resultados se muestran en la literatura con respecto al peso molecular y el número de PE. Autores como Forster, (1985) encontró que los exopolímeros presentan pesos moleculares de 30 a 100 kDa, aunque no hace referencia al tipo de exopolímeros que podrían estar implicados. Frolund y col., (1994) observaron que los exopolímeros en el lodo presentaban un pesos moleculares menores que 10 kDa, indicio que sólo determinaron polipéptidos, así mismo, los autores no determinaron si el tipo de columna cromatográfica utilizada fue la adecuada para separar los exopolímeros. Higgins y Novak, (1997) usaron un lodo floculento encontrando por electrofóresis en gel de poliacrilamida, una sola proteína de 15 kDa, aunque estos autores no usaron las mismas condiciones para la

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

electroforesis, ni el mismo método de revelado para las PE, que los empleados en este trabajo, por lo que el número de bandas pudo estar afectado por la sensibilidad del método de revelado. Fleming y Wingender, (2001) señalaron en estudios preliminares, que las proteínas exopoliméricas presentaron pesos moleculares de 5 a 150 kDa, pero no mencionan como hicieron el análisis, ni el número de las PE presentes en el lodo. Puede verse que los resultados en la literatura no son homogéneos, ya que no se presentan datos específicos del peso molecular de las proteínas exopoliméricas, ni de su número en los lodos. Queda claro que es importante esclarecer el peso molecular y el número de PE presentes en el lodo floculento. Además, conocer si estas cambian cuando se modifica la composición del influente y si algunas de estas PE pudieran estar relacionadas con los cambios del IVL.

El análisis de varianza de la concentración de los exopolímeros en este capítulo, sugiere que la concentración de los exopolímeros no está relacionada con los cambios en el IVL, Es necesario explorar otras posibilidades, como podrían ser las propiedades físico-químicas de la PE (en cuanto a su hidrofiliidad y hidrofobicidad), ya que autores como Jorand y col., (1998) mencionan que más del 50% de los exopolímeros son hidrófobos, donde la mayor parte son PE y que parecen estar relacionadas con la sedimentabilidad del lodo. Es necesario realizar estudios detallados de las características de hidrofobicidad e hidrofiliidad de las PE, en los dos reactores alimentados con materia orgánica y determinar si este tipo de propiedades de las PE, contribuyen al incremento del IVL.

Este tipo de estudios tan detallados lo diría, pero no se encuentran en la literatura. Es importante ahondar con estudios más completos, para determinar las características físico-químicas de las PE y su relación con la pérdida de sedimentabilidad de los lodos, en los reactores nitrificantes.

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

6.4 CONCLUSIONES

La adición de materia orgánica a un reactor nitrificante produjo un incremento en el IVL. La materia orgánica no afectó la concentración de proteínas y carbohidratos exopoliméricos. La materia orgánica tuvo efecto en el intervalo en el número de bandas y el peso molecular de las proteínas exopoliméricas. El RNA presentó proteínas exopoliméricas características con pesos moleculares menores que 60 kDa. Por lo contrario, en los reactores RNA y RNOC, las proteínas exopoliméricas características del proceso presentaron un peso molecular mayor que 60 kDa.

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

6.5 BIBLIOGRAFÍA

- Cuervo-Lopez, F. M. Martinez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Noyola, R. A. and Gómez, J. (1999) Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* **40**. 123-130
- Dignac, M. F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D. and Scribe, P. (1998) Chemical description of extracellular polymers: Implications on activated sludge floc structure. *Water Sci. Tech.* **38**. 45-53.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects. *Water Sci. Tech.* **43**. 9-16.
- Forster, C. F. (1971) Activated sludge surfaces en relation to the sludge volume index. *Wat. Res.* **5**. 861-870.
- Forster, C. F. (1985). Factors involved in the settlement of activated sludge-I. *Wat. Res.*, **19**. 1259-1264.
- Frolund, B., Keiding, K. and Nielsen, P. H. (1994) A comparative study of biopolymers from a conventional and an advanced activated sludge treatment plant. *Water Science Tech.* **29**. 137-1441.
- Goodwin, J. A. S. and Forster, C. F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Res.* **19**. 527-533.
- Higgins, M. J., and Novak, L.T. (1997) Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Envir.Engineering.* **123**. 479-485.
- Huber, S., Minnebusch, S., Wuertz, S., Wilderer, P.A., Helmreich B. (1998) Impact of different substrates on biomass protein composition during wastewater treatment investigated by two-dimensional electrophoresis. *Water Sci Technol.* **37**. 363-366.

Reactores nitrificantes alimentados con materia orgánica

- Jahn, A. and Nilsen, P. H., (1995) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Wat. Sci. Tech.* **32** 157-164.
- Jahn, A. and Nilsen, P. H., (1998) Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Wat. Sci. Tech.* **37**. 17-24.
- Jorad F., Boue-Bigne F., Block J. C. and Urbain V. (1998) Hidrophobic/hidrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci. Tech.* **37**. 307-315.
- Martinez, F., Favela-Torres, E. and Gomez, J. (2000) Oscillations of exopolymeric composition and sludge volume index in nitrifying flocs. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **87**. 177-187.
- Novák, L., Larrea, L., Wanner, J. and Garcia-Heras, J. L. (1993). Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Wat. Res.* **27**.1339-1346.
- Urbain, V., Block, J. C. and Manem, (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach. *Wat. Res.* **27**. 829-838.

7. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se aportaron evidencias que señalan que algunos de los componentes intrínsecos de los lodos activados, como las proteínas exopoliméricas son la principal fuente de estabilidad o inestabilidad de estructuras como los flóculos y las biopelículas.

Las principales conclusiones generales son:

1. La concentración de las proteínas exopoliméricas no fue constante en el tiempo, sin embargo, se evidenció que el patrón respiratorio nitrificante se mantuvo sin cambios y en régimen estacionario.
2. El IVL de los flóculos y biopelículas se relaciona estrechamente con los pesos moleculares de las proteínas exopoliméricas, más que con el número de bandas o con su concentración. En general, a mayor peso molecular, mayor IVL y por tanto, menor sedimentabilidad del lodo.
3. En comparación con el reactor litoautotrófico nitrificante de referencia, la adición de materia orgánica provocó un aumento significativo en el IVL. No se observó efecto de la materia orgánica sobre la concentración de la proteína exopolimérica. Sin embargo, los pesos moleculares de la proteína exopolimérica fueron mayores que los obtenidos en el reactor de referencia.
4. Los resultados de este trabajo establecen que la sedimentabilidad del lodo está esencialmente en función de los pesos moleculares de las proteínas exopoliméricas, más que de los tipos de microorganismos presentes en el lodo, como lo sugiere la mayor parte de la información científica publicada.

Conclusiones generales y recomendaciones

5. Parece ser que los pesos moleculares de las proteínas exopoliméricas del lodo, estarían determinadas por el tipo de reactor, el TRH y las características de alimentación utilizadas.

Las siguientes recomendaciones podrían aplicarse para futuros trabajos:

1. Experimentar y evaluar con más detalle la influencia del tipo de reactor sobre los pesos moleculares de las proteínas exopoliméricas. Cabe recordar que hubo diferencias significativas entre el reactor de tanque agitado de referencia con los dos reactores airlift, así como entre el reactor airlift nucleado a partir de flóculos y el reactor nucleado a partir de basalto.
2. Basándose en los resultados obtenidos en este trabajo de tesis resulta necesario determinar las características de las proteínas exopoliméricas. Esto es, analizar:
 - 2.1 Cuál es tipo de aminoácidos que componen las PE
 - 2.2 En qué secuencia se encuentran
 - 2.3 Qué correlación hay entre la composición de aminoácidos y la hidrofiliidad o hidrofobicidad de las proteínas
 - 2.4 Cómo influyen las características hidrófobas e hidrófilas de las proteínas en la estabilidad estructural del lodo y por tanto en su sedimentabilidad.

8. APÉNDICES

8. 1 APÉNDICE

8. 2 APÉNDICES

ROLE OF EXOPOLYMERIC PROTEIN ON THE SETTLEABILITY OF NITRIFYING SLUDGES

Felipe Martínez O.¹, Juan Lema², Ramón Méndez.² and Jorge Gómez*¹.

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. AP 535, CP 09340, Iztapalapa, México, D, F.

² Departamento de Ingeniería Química Universidad de Santiago de Compostela C.P.15706 Spain

*Corresponding author. Tel: + (52) 55 5804 4716; fax: +(52) 55 5804 4712.
E-mail address: dani@xanum.uam.mx

ABSTRACT

The relationship of exopolymeric substances and their sludge volume index (SVI) of two nitrifying sludges were studied over a period of time (30 d) in two different types of reactors: 1. a stirred tank aerated nitrifying reactor (SANR) and 2. an air-lift nitrifying reactor (ALNR). Concentrations of lipids, carbohydrates and proteins of the EPS were determined in both reactors. The variation in lipids and carbohydrates was low (<10%), while the variation in the exopolymeric protein was higher. The SVI increased in accordance with the increase in the concentration of the exopolymeric protein. The number of units of the exopolymeric protein was modified as a consequence of the change in the concentration of the exopolymeric protein. The molecular weights of the exopolymeric protein ranged from 31 to 97 in the stirred and 13 to 45 kDa in the air-lift reactor. The variations in the SVI were mainly due to the changes in the molecular weight of the exopolymeric proteins resulting in the modification of the sludge settleability characteristics.

KEYWORDS: Sludge volume index; exopolymeric protein; molecular weight; nitrifying sludge.

INTRODUCTION

Biological treatment is commonly used to remove pollutants from municipal and industrial wastewaters (Monroy et al., 2000). The microorganisms involved in this process aggregate to form flocs and/or granular sludges. The sludges are usually made up of two main fractions: 1) a heterogeneous microflora forming a consortium and 2) a complex mixture of exopolymeric substances (EPS) consisting mainly carbohydrates, lipids and protein. The arrangement of the EPS in the complex structure of the sludge and its role on sludge settleability are not well understood. It has been proposed that in activated sludge the concentration of exocellular polysaccharides is related to sludge settleability (Goodwin and Forster, 1985). Urbain et al. (1993) indicated that the EPS components of the flocs were linked to divalent cations like Ca^{2+} suggesting the possible participation of proteins.

The efficiency of wastewater treatment depends on the stability of the structure of the sludge. Changes in the stability or aggregation of the sludge can modify its settling characteristics resulting in microbial washout, thereby, reducing the efficiency of the reactor. There are diverse points of view about the causes leading to changes in the stability of sludge. It has been reported in the literature that stability of the activated sludge depends on various factors such as types of microorganisms, excessive microbial growth and changes in microbial activity due to chemical changes in the influent (Michael et al., 1985). Martinez et al. (1998) observed that settling of the sludge was variable in a steady state nitrifying reactor although the rate of feeding and consumption of ammonia remained constant. It has been suggested that the stability of the floccular sludge depends on the type of EPS and its concentration and that variation in EPS components can alter sludge

settleability, mainly when the protein content change (Urbain et al., 1993). These results reveal that variations in the concentration of the EPS alter the SVI which is usually considered as an indicator of stability or settleability of the sludge. Values less than 100 ml g⁻¹ of SVI normally indicate good stability of the sludge. Lazarova and Manem (1995) reported that some components of EPS play an important role in the substrate consumption and also in the formation and structuring of granules, flocs and biofilms. Similar points of view have also been expressed by others (Echeverria, et al., 1992; Novák et al., 1993; Jahn and Nilsen, 1998; Bura et al., 1998; Jorand et al., 1998). Random sampling and one time chemical analyses of municipal sludges have shown that increase in the concentrations of exopolymeric carbohydrates decrease the SVI value, but when the lipids increase in the EPS the SVI increases diminishing the sludge stability (Goodwin and Forster, 1985; Urbain et al., 1993).

The specific role of exopolymeric proteins with regard to stability and settleability of sludge has not been studied in detail. Jorand et al. (1998) working with activated sludge observed that hydrophobic and hydrophilic properties of different non-stabilized sludges were related to the presence of polysaccharides and proteins, which modified the SVI. Martinez et al. (1998) reported that a sludge in steady state nitrification presented an oscillatory pattern in the exopolymeric protein concentration that correlated with the changes in the SVI. However, they did not analyze the composition of proteins. Huber et al. (1998) observed that in a sequencing batch reactor, the type of protein produced in the sludge depended on the chemical composition of the influent. The authors concluded that the diversity of the proteins decreased when the culture medium was chemically more complex. Their results did not make any reference to the stability of the sludge or the

changes in the SVI. Periodical sampling to determine the chemical and physiological behaviour of the sludges over a longer period have not been reported.

Therefore, the purpose of this work was to evaluate sludges from two different steady state nitrification reactors during prolonged operation time to study: a) fluctuations in the concentration of the exopolymeric proteins; b) their molecular weights and c) relate the changes in the composition of the EPS to the changes in the SVI.

MATERIALS AND METHODS

Reactor and culture conditions.

Experiments were conducted using 2 different types of continuous reactors, 1) a stirred aerated nitrifying reactor (SANR) and 2) an air-lift nitrifying reactor (ALNR). The composition of the lithotrophic influent (synthetic wastewater) for both reactors was as follows (g l^{-1}): $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 1.17; KH_2PO_4 , 1.4; MgSO_4 , 0.5; NaCl , 1; NH_4Cl , 0.96; FeSO_4 , 0.15. The total $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration in the input was of 0.5g l^{-1} .

The working volume of the SANR was 2 liters connected to a settler of 1 liter. The operating conditions were: recycling rate 11 l d^{-1} , stirring rate 300 rpm and temperature 28°C . The pH was maintained at 7.6 ± 0.5 by adding a mixture of NaHCO_3 with $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40 and 0.4, g l^{-1} , respectively). The flow rate of this mixture was maintained at 0.065 l d^{-1} .

In order to achieve a loading rate of $0.15\pm 0.01 \text{ g NH}_4^+\text{-N l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ the influent flow rate was of 0.6 l d^{-1} . The hydraulic retention time (HRT) of the process was 3.3 d. The ALNR (2.3 l of working volume) operated under culture conditions similar to the SANR, but at a HRT of 0.115 d and a loading rate of $4 \text{ g NH}_4^+\text{-N l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Both reactors were fed in such a way to keep the C:N ratio close to 1.25 as required in a dissimilative respiration process. The reactors were inoculated with a non-filamentous flocculent sludge obtained from a stirred

steady state nitrifying reactor which was operating continuously for three years. ALNR and SANR were operated continuously for 150 days and data were collected.

Analysis

Soluble and microbial protein concentrations in the reactor were measured by a modified method described by Lowry et al., (1951) using bovine serum albumin as standard. The modification consisted in the addition of 0.1 ml of 10 M NaOH to 1 ml of sample and heating at 92°C for 40 min on a water bath. Ammonium ion concentration was measured using a specific ion electrode according to standard methods (APHA, 1985). Nitrite and nitrate were measured by capillary electrophoresis (Millipore Model 400) under the following conditions: a silica fused microcapillary column (60 cm long and 70 μ internal diameter) with 30 mA and 20 KV. A 10mM Na₂SO₄ solution was used as the electrolyte. Each sample application time was 4 sec and all samples were analyzed in triplicate. Anion absorbance was measured with a 212 nm filter as previously described (Gómez et al., 1996) and a mixture of nitrite and nitrate (100 mg l⁻¹ each) was used as standard. For all methods, the coefficient of variation was below 6%.

Extraction of exopolymeric substances from the sludge

Five milliliters sample drawn from the reactor was mixed with 5 ml of 0.1N ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), stirred for 10 min and then centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.45 μ m nylon membrane and the filtrate was divided into two parts. One part was used for measuring of the exopolymeric carbohydrates and lipids while the other part was dialyzed for 3 days at a constant temperature of 4°C in distilled water in 10 KD cut off-bags (Spectrum) made from regenerated cellulose (Martínez et al., 2000). Exopolymeric proteins were measured after dialysis according

Lowry et al. (1951). The polysaccharides of the EPS were measured by quantitative determination of total sugars (Dubois et al., 1956) and lipids by the method reported by Frings and Dunn (1970). The SVI is defined as the volume occupied by 1 g of sludge after a period of 30 min in a graduated cylinder. The procedure we adapted here to determine the SVI was similar to that reported by Urbain et al. (1993) in which a sample of 100 ml was used in an Imhoff cone instead of a graduated cylinder. Tukey's test was conducted to evaluate that the difference in the SVI values both from the graduated cylinder and the Imhoff cone. The results showed ($\alpha= 0.05$) that there was no a significant difference (less than 10%) in the SVI values obtained from both. The total suspended solids (TSS) of sludge was determined by standard methods. The volume of the settled sludge was related to the TSS concentration (Lee et al., 1983).

Polyacrylamide gel electrophoresis

The number of units of exopolymeric protein was assessed by sodium dodecyl sulfonate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) by denaturing the proteins (Laemmli, 1970) with a resolving polyacrylamide gel at 8%. A denatured sample (40 μ l) was placed on the SDS-PAGE concentrating gel (4.5%). The electrophoresis was carried out at 150 V for 60 min. Silver nitrate staining was done as follows (V/V): the gel was fixed with 40% methanol plus 0.5 ml of 37% formaldehyde for 10 min and then poured into a 0.2 g l⁻¹ Na₂S₂O₃ solution for 1 min and then in 0.1% AgNO₃ for 10 min. The gel was developed with a solution of 3% Na₂CO₃, 0.0004% Na₂S₂O₃ and 0.5 ml l⁻¹ of 37% formaldehyde (W/V). The reaction was stopped by mixing the reactants with 5 ml of 2.3M citric acid.

Molecular weights of the exopolymeric proteins from SANR were determined using a kit (Sigma) containing macroglobulin, galactosidase, fructose 6 phosphate quinase, piruvate

quinase, fumarase, lactate dehydrogenase and 1-triose phosphate isomerase in a concentration of 2 mg l^{-1} . Molecular weights of the reference proteins ranged from 43 to 91 kDa. Molecular weights of exopolymeric proteins extracted from the ALNR were determined using a kit (Dalton Mark VI, Sigma) containing bovine albumin, egg albumin, lactoglobulin, lysozyme, trypsinogen and pepsin for a final protein concentration of 2 mg l^{-1} . The molecular weights of these proteins ranged from 14 to 66 kDa. The range covered by the two kits allowed a broader determination of the protein components. The electrophoretic protein analysis from the culture was made every 48 h using replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

The production rate of nitrate ($\text{g NO}_3\text{-N l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) in the SANR was 0.14 ± 0.01 and 3.75 ± 0.24 in the ALNR. The output of $\text{NH}_4\text{-N}$ was low in both reactors indicating that the consumption efficiency of ammonia was high ($95\% \pm 3$). The low variation in the nitrate production rate coupled with high efficiency of $\text{NH}_4\text{-N}$ consumption noted in both reactors were indicators of steady state nitrification. Thus, the respiratory process in both reactors was similar. During steady state nitrification, the mean concentrations of total suspended solids were of 7773 ± 610 and $7637 \pm 650 \text{ mg l}^{-1}$ for the SANR and ALNR, respectively, of which around 40% were non volatile suspended solids. Under these conditions, nitrifying sludge samples drawn from the steady state reactors were dissociated with EDTA and electrophoretic analyses of the extracellular proteins were performed. The interference of EDTA in the measurement of protein was successfully eliminated by dialysis without affecting the cell structure or producing cell lysis as reported earlier (Eriksson and Alm, 1991; Martínez et al., 2000).

Table 1 shows the concentrations of exopolymeric proteins, carbohydrates and lipids in the SANR and the ALNR. Carbohydrates and lipids showed a low variation close to 10% during the entire experimental period. However, exopolymeric proteins showed significant changes (Fig. 1) while nitrification rate remained nearly constant in steady state. The nitrate production rate was 0.14 ± 0.01 for SANR and $3.75 \pm 0.24 \text{ NO}_3^- \text{ N l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for ALNR. Dignac et al., (1998) had earlier reported that in activate sludge the main exopolymers were proteins, but considering that the protein content was not analysed along the time, they failed to observe any variation in its concentration.

Figure 1 shows profiles for exopolymeric proteins and SVI in the SANR. The fluctuations in SVI and protein followed very similar patterns during the entire period of experiment. Namely, when the protein increased the SVI also increased and vice versa. Thus, the SVI fluctuations were closely linked to the variations in the exopolymeric protein concentration of the nitrifying sludge. These results indicate that changes in settleability were due to the changes in the concentration of protein. Similar results were also found by Urbain et al., (1993).

Samples drawn from the SANR near the maximum and minimum concentration points were analyzed electrophoretically for exopolymeric proteins (letters and arrows in Fig. 1). The bands of exopolymeric protein resolved by SDS-PAGE are shown in Figure 2. Molecular weights assessed for the exopolymeric proteins of the nitrifying sludge ranged from 31 to 97 kDa (Table 2). At the maximum concentration (sample C) there were 18 different proteins while at the minimum (sample B) only 6. Therefore, the number of bands of exopolymeric proteins varied with protein concentration. The results of this work show that the EP is constituted by a higher number of protein units that have been previously

reported in other works (Higgings and Novak, 1997). Fleming y Wingender (2001) observed in activated sludges that the molecular weight ranged from 5 to 150 kDa, but no mention was made on the number of protein units.

In our work the variations in the concentrations of the exopolymeric proteins in the SANR were close to 20%, despite the fact that the feed was a chemically simple lithoautrophic solution and nitrification process at steady state. These results are in contrast to those of Huber et al. (1998) who reported that feeding with a complex organic medium significantly influenced the number of the protein units of the sludge in a sequencing batch reactor. Although the changes in exopolymeric protein concentrations were due to changes in the microbial activity, the differences in our results with those reported by Huber et al., (1998) were probably influenced by the type of reactor used. The operation way of each type of reactor can promote the growth of different microorganisms which may alter not only the respiratory behaviour of the microorganisms, but also the kind of proteins produced by the sludge (Lazarova and Manem, 1995).

Periodical chemical determinations of EPS in the biofilm from the ALNR are shown in Fig. 3. The exopolymeric protein concentration in the sludge from the ALNR was higher by approximately 10% compared to the SANR (Fig 1). This difference in exopolymeric content was quite significant for sludge stability. Similarly, fluctuations observed in the concentration of exopolymeric proteins over the experimental time was also higher. These fluctuations in the concentrations of exopolymeric proteins and the SVI followed a pattern similar to that of the SANR. Neither the exopolymeric protein concentration nor the SVI were constant in spite of the nitrifying process being at steady state. When the exopolymeric protein changed, SVI changed in a similar manner. Thus, the behavior of EPS and the SVI was similar both for the ALNR and the SANR. However, the analysis of

variance for the SVI values for both reactors showed ($\alpha= 0.0005$) that there was a significant difference.

Results from electrophoresis of the exopolymeric protein from the ALNR are shown in Fig. 4. The number of exopolymer protein bands was 16 at the maximum concentration (sample D), two less than for the SANR. In the case of SANR, the higher number of protein units was noted at the maximum concentration of exopolymers. The molecular weights of the exopolymeric proteins ranged from 13 to 44 kDa (Table 3) while those from the SANR were almost twice as high. Comparing the values of SVI from the two reactors, it was observed that the variation coefficients were higher in the sludge from the ALNR than in the sludge from the SANR. The difference in protein concentration between the SANR and the ALNR averaged 10%, namely a low variation. The analysis of variance corroborated ($\alpha= 0.0005$) that the difference was not significant. However, the molecular weight from the SANR were twice as higher as from the ALNR suggesting that the SVI depends more on the molecular weight of the exopolymeric protein than their concentrations. Sludge behavior was independent of the chemical composition of the influent since both reactors were fed with a chemically similar influent. However, differences observed in the molecular weights of the exopolymeric proteins may also be linked to the nature of the microbial flora in the sludge. The microbial growth pattern in the SANR was always flocculent while in the ALNR the microorganisms were forming a biofilm. Thus, mass transfer phenomena were different in the two reactors and may have affected exopolymeric protein formation. It has been reported that the structure (floccular, granular or biofilm) of the sludge influences the metabolism of the microbial population (Lazarova and Manem, 1995), which in turn could influence the production of EPS in terms of both concentration and molecular weights. Rheological properties like the shearing stress in the two reactors

may have been yet another factor influencing concentrations and types of exopolymeric proteins (Cuervo-López et al., 2000). In any case, the changes in the exopolymeric protein had a significant effect on the SVI of the sludges in both the reactors.

CONCLUSIONS

Results obtained from this work with two different types of reactors (SANR and ALNR) at steady state for nitrification of lithoautotrophic culture medium indicated a close relationship between exopolymeric proteins and settleability of the sludge. During the experiment the concentrations of lipids and carbohydrates of the EPS showed little variations, while the exopolymeric protein concentration varied from 20 to 45% for SANR and ALNR, respectively. Exopolymeric protein concentrations were lower in the SANR than in the ALNR by about 10%. Results from electrophoresis showed major differences in the exopolymeric proteins from both sludges although the feed had the same chemical composition. Molecular weights of the exopolymeric proteins from the SANR ranged from 31 to 97 while those from the ALNR ranged from 13 to 44 kDa differing by a factor of 2. The SVI for the ALNR ($22 \pm 8 \text{ mlg}^{-1}$) was about 4 times greater than for SANR (6 ± 0.7). These results indicated that variations in the SVI in both reactors were related to exopolymeric protein concentrations and to the differences in their molecular weights. Exopolymeric proteins appear to affect the settleability and the stability of nitrifying sludge. It is, however, necessary to establish conditions to control exopolymeric proteins production in the nitrifying sludge to improve the efficiency of reactor operation.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this work was provided by TMR-EU-Project Biotbio Contract nº FMR-CT97-0114 and Ministerio Español (PCCI, Spain). Thanks to Drs. S. Lakshminarayana and F.

Ma. Cuervo López, Dept. of Biotechnology for the critical review of the work. Felipe Martínez thanks CONACyT, Mexico, for the financial support given for this work.

REFERENCES

- APHA, 1985. Standard methods for examination of water and wastewater 17th edition, American Public Health Association, New York. USA.
- Bura, R., Cheung, M., Liao, B., Finlayson, J., Lee B.C., Droppo, I.G., Leppard G.G., Liss S.N., 1998. Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Sci. Tech* 37, 325-333.
- Cuervo-López, F.M., Salazar A., Ramos E.G. Olayo R., Gomez J., 2000. Latino-American Workshop and Seminar on Anaerobic Digestion. Nov. 5-9. Recife, Brasil.
- Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P., 1998. Chemical description of extracellular polymers: Implications on activated sludge floc structure. *Water Sci. Technol* 38, 45-53.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem* 28, 350-356.
- Echeverría, E., Seco A., Ferrer, J., 1992. Study of the factors affecting activated sludge settling in domestic wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol* 25, 273-279.
- Eriksson, L., Alm, B., 1991. Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. *Water Sci. Technol* 24, 21-28.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects. *Water Sci. Tech.* 43, 9-16.
- Frings, C.S., Dunn, R.T., 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *J Clin Path* 53, 89-91.

- Gómez, J., Mendez, R., and Lema, J.M., 1996. The effect of antibiotics on nitrification process. *Appl Biochem Biotechnol* 57/58, 869-876.
- Goodwin, J.A.S., Forster, C.F., 1985. A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Res* 19, 527-533.
- Higgins, M. J., and Novak L.T., 1997. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Envir. Engineering*. 123, 479-485.
- Huber, S., Minnebusch, S., Wuertz, S., Wilderer, P.A., Helmreich B., 1998. Impact of different substrates on biomass protein composition during wastewater treatment investigated by two-dimensional electrophoresis. *Water Sci Technol* 37, 363-366.
- Jahn, A., Nilsen, P. H., 1998. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci Technol* 37, 17-24.
- Jorand, F., Boué-Bigne, F., Block, J.C., Urbain, V., 1998. Hydrophobic/Hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci Technol* 37, 307-315.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 227, 680-683.
- Lazarova V., Manem J., 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res.* 29, 2227-2245.
- Lee, S.E., Koopman, B., Bode, H., Jenkins, D., 1983. Evaluation of alternative sludge settleability indices. *Water Res* 17, 1421-1426.
- Lowry, O.H., Rosen Brough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Martínez, O.F., Soriano, S.J., Gómez, J., 1998. Chemical and electrophoretic analysis of a nitrifying sludge associated to the SVI. IV Iberian Congress on Biotechnology I Ibero American Meeting on Biotechnology, Braga, PORTUGAL.

Martínez, F., Favela-Torres, E., Gomez, J., 2000. Oscillations of exopolymeric composition and sludge volume index in nitrifying flocs. *Appl Biochem and Biotechnol* 87, 177-187.

Michael, G., Shimizu, G.P., Jenkins, D., 1985. The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance to activated sludge bulking. *J Water Pollut Control Fed* 57, 1152-1162.

Monroy, O. Fama, G., Meráz M., Montoya, L. and Macarie, H., 2000. Anaerobic digestion for wastewater treatment in México: State of the technology. *Water Res* 34, 1803-1816.

Novák, L., Larrea, L., Wanner, J., Garcia-Heras, J.L., 1993. Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Water Res* 27, 1339-1346.

Urbain, V., Block, J., C. Manem, J., 1993. Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Water Res* 27, 829-838.

Table 1.

Reactor	SVI (ml g ⁻¹)	Carbohydrates (mg l ⁻¹)	Proteins (mg l ⁻¹)	Lipids (mg l ⁻¹)
SANR	6±0.7	33±3	51±9	31±2
ALNR	22±8	18±1	56±25	9±1

Table 2.

Protein	Day A kDa	Day B kDa	Day C kDa	Day D kDa
I	97450	97450	97450	97450
II	93480		93480	
III			89673	
IV	86020		86020	86020
V			82680	
VI	76082	76082	76082	76082
VII	72983	72983	72983	72983
VIII			70010	
IX			67158	
X	61921	61921	61921	61921
XI			59399	
XII	52432	524321	52432	52432
XIII	48344	48344	48344	48344
XIV			44486	44486
XV			42674	42674
XVI	37743		37743	
XVII			34731	
XVIII			31960	31960

Table 3.

Protein	Day A kDa	Day B kDa	Day C kDa	Day D kDa
I	44462	44462	44462	44462
II	42032	42032	42032	42032
III	37563	37563	37563	37563
IV	35510	35510	35510	35510
V		33569		
VI		31734	31734	
VII		30000	30000	
VIII		28360		28360
IX				25344
X				23959
XI				22650
XII		21412	21412	21412
XIII				20241
XIV				19135
XV				17100
XVI	13657	13657	13657	13657

Fig 1.

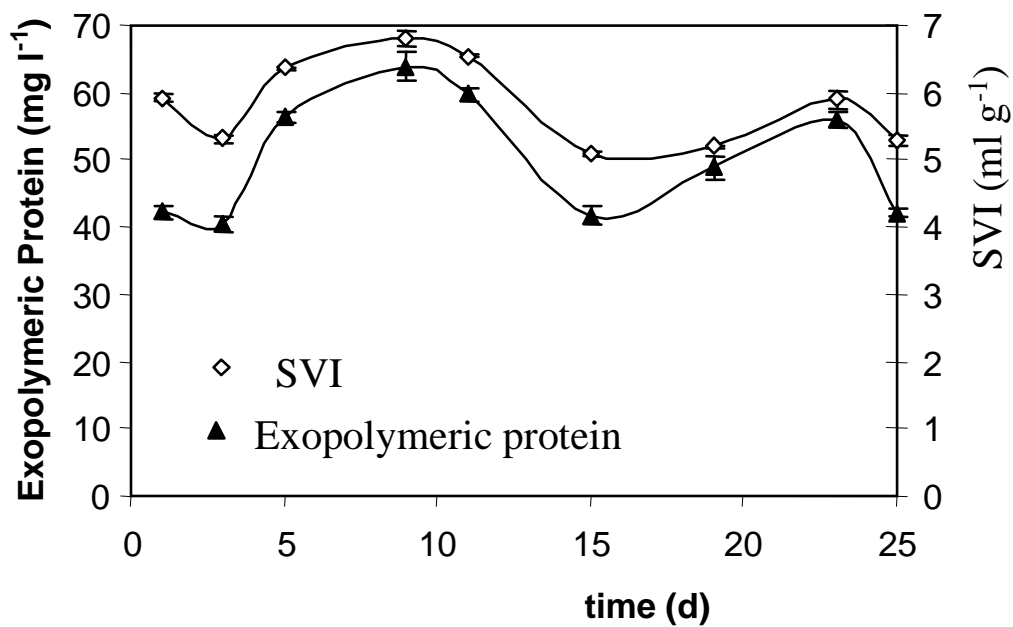


Fig 2.

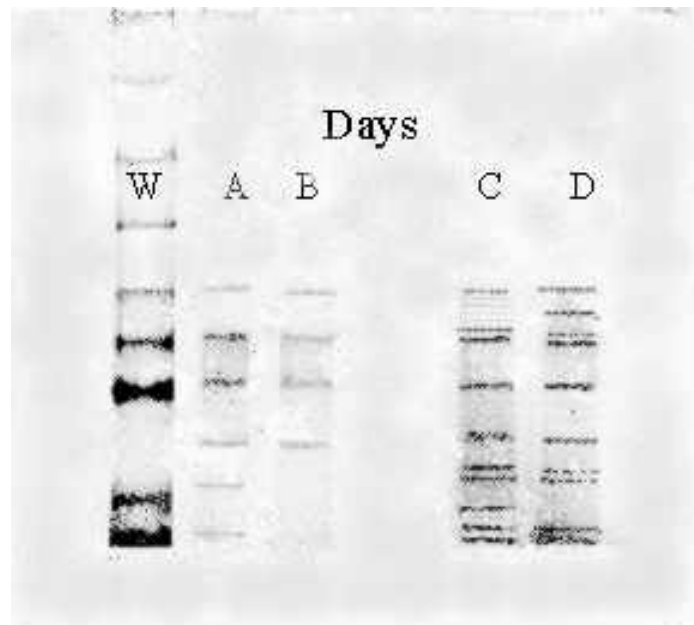


Fig 3.

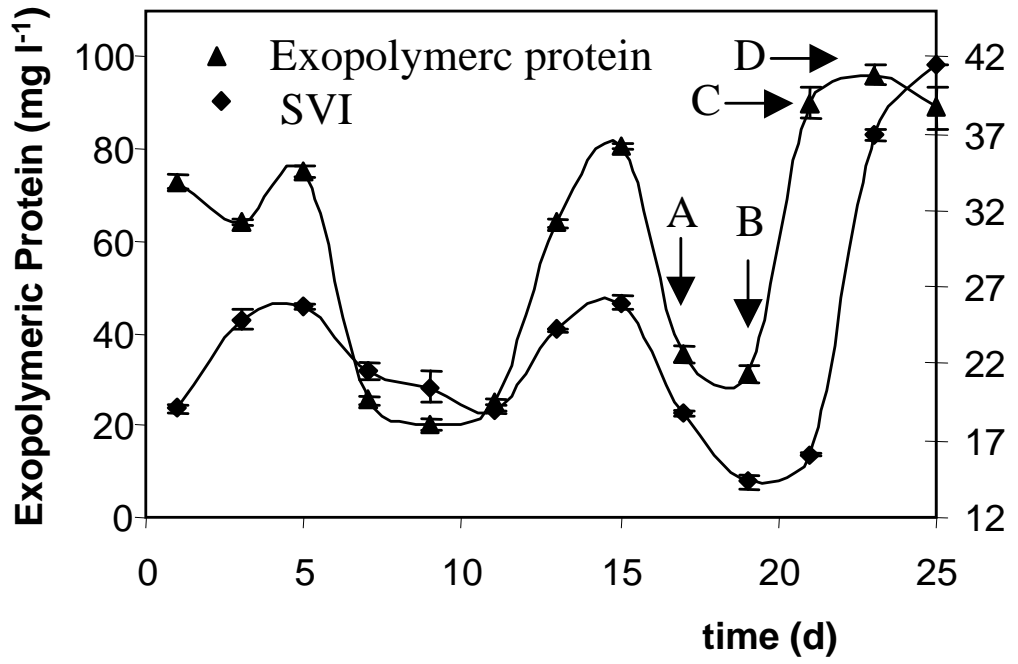


Fig 4

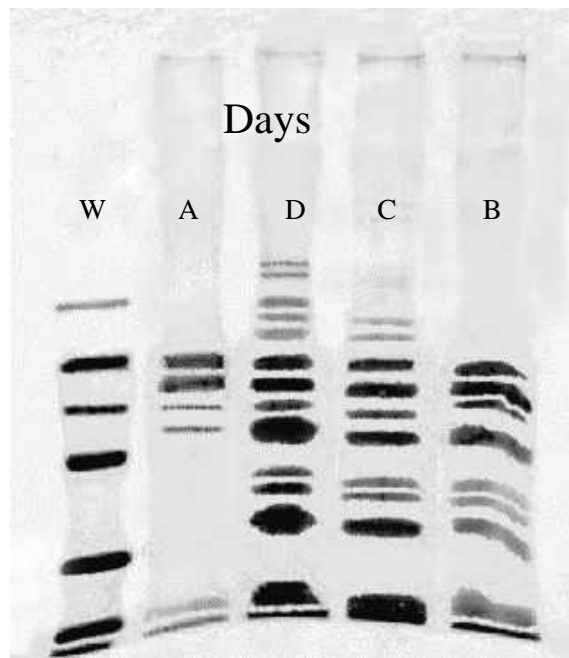


Table 1. Exopolymeric substances concentration in stirred nitrifying aerated reactor and air-lift reactors. The average values were calculated during all time of experimentation.

Table 2. Assessed molecular weights of exopolymeric proteins during days of maximum (C, D corresponding 7 and 10 days, respectively) and minimum (A, B corresponding 15 and 19 days, respectively) concentrations in the stirred nitrifying reactor.

Table 3. Assessed molecular weight of exopolymeric proteins of the air-lift nitrifying reactor. A, B are the minimum concentration, corresponding at 15 and 19 days, respectively, and C, D are the maximum concentration corresponding at 23 and 25 days, respectively.

Fig 1. Behavior of exopolymeric protein and SVI in the stirred nitrifying reactor. Arrows show the maximum C and D (7 and 10 days, respectively) and minimum A and B (15 and 19 days, respectively) of exopolymeric protein concentration.

Fig 2. Electrophoretical patterns of exopolymeric proteins in the stirred nitrifying reactor. C and D are the maximum concentration and correspond at 7 and 10 days, respectively. A and B are the minimum concentration and correspond at 15 and 19 days, respectively. W line is the molecular weight standards.

Fig 3. Behavior of the exopolymeric proteins and SVI, in air-lift nitrifying reactor, where A and B correspond to the minimum concentration (17 and 19 days, respectively). C and D correspond to the maximum concentration (23 and 25 days, respectively).

Fig 4. Electrophoretic patterns of exopolymeric proteins of the air-lift nitrifying reactor. A and B are the minimum concentration and represent the proteins at 17 and 19 days, respectively. C and D are the maximum concentration and represent the proteins at 23 and 25 days, respectively. W line is the molecular weight standards.

8. 3 APÉNDICES

Resultados de comparación entre los tres reactores nitrificantes:

Reactor de referencia

Reactor airlift con basalto

Reactor airlift con flóculos

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Carbohidratos	Between Groups	2807.790	2	1403.895	8.509	.000
	Within Groups	5939.521	36	164.987		
	Total	8747.311	38			
Proteínas	Between Groups	1671.817	2	835.909	1.768	.183
	Within Groups	17021.277	36	472.813		
	Total	18693.094	38			
LIPIDOS	Between Groups	6417.391	2	3208.696	75.284	.000
	Within Groups	1534.361	36	42.621		
	Total	7951.753	38			
IVL	Between Groups	3660.183	2	1830.092	63.078	.000
	Within Groups	1044.472	36	29.013		
	Total	4704.655	38			

Comparaciones múltiples.

Carbohidratos

Tukey HSD^a

tipo de reactor	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
airlift floculo	13	11.9492	
airlift basalto	13	24.0092	24.0092
Referencia	13		32.6385
Sig.		.056	.214

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.000.

Proteínas

Tukey HSD^a

tipo de reactor	N	Subset for alpha = .05
		1
Referencia	13	45.8000
airlift floculo	13	51.4923
airlift basalto	13	61.6308
Sig.		.166

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.000.

LIPIDOS

Tukey HSD^a

tipo de reactor	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
airlift basalto	13	8.8262	
Referencia	13		35.5077
airlift floculo	13		36.5385
Sig.		1.000	.915

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.000.

IVL

Tukey HSD^a

tipo de reactor	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Referencia	13	5.6892		
airlift basalto	13		23.0385	
airlift floculo	13			28.3846
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.000.

ANOVA

peso molecular

concentracion		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
maximos	Between Groups	2.36E+10	2	1.18E+10	7.199	.001
	Within Groups	1.10E+11	67	1.64E+09		
	Total	1.33E+11	69			
minimos	Between Groups	1.27E+10	2	6.33E+09	4.830	.013
	Within Groups	5.64E+10	43	1.31E+09		
	Total	6.90E+10	45			

Resultados de pesos moleculares

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

peso molecular

concentracion=maximos

Tukey B^{a,b}

Tipo de reactor	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
airlift basalto	15	27543.94	
referencia	18		63845.84
airlift floculos	37		74461.68

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.101.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

concentracion=minimos

Tukey B^{a,b}

Tipo de reactor	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
airlift basalto	13	29748.99	
airlift floculos	24		65222.00
referencia	9		69606.12

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.060.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Resultados de comparación entre los tres reactores nitrificantes:
 Reactor de referencia
 Reactor con acetato
 Reactor con aguas residuales complejas

ANOVA

Carbihidrat.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	988.757	2	494.379	1.883	.165
Within Groups	11025.643	42	262.515		
Total	12014.400	44			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Carbihidrat.

Tukey HSD

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Referencia	Acetato	-1.6533	5.916	.958	-16.0269	12.7202
	Mat. Org. Compleja	-10.6667	5.916	.181	-25.0402	3.7069
Acetato	Referencia	1.6533	5.916	.958	-12.7202	16.0269
	Mat. Org. Compleja	-9.0133	5.916	.290	-23.3869	5.3602
Mat. Org. Compleja	Referencia	10.6667	5.916	.181	-3.7069	25.0402
	Acetato	9.0133	5.916	.290	-5.3602	23.3869

Homogeneous Subsets

Comparaciones múltiples

Carbihidrat.

Tukey HSD^a

tratamiento	N	Subset for alpha = .05
Referencia	15	31.1600
Acetato	15	32.8133
Mat. Org. Compleja	15	41.8267
Sig.		.181

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

Oneway

ANOVA

Proteínas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	234.665	2	117.333	.066	.936
Within Groups	74492.343	42	1773.627		
Total	74727.008	44			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Proteínas
Tukey HSD

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Referencia	Acetato	-3.9267	15.378	.965	-41.2876	33.434
	Mat. Org. Compleja	-5.4133	15.378	.934	-42.7743	31.947
Acetato	Referencia	3.9267	15.378	.965	-33.4343	41.287
	Mat. Org. Compleja	-1.4867	15.378	.995	-38.8476	35.874
Mat. Org. Compleja	Referencia	5.4133	15.378	.934	-31.9476	42.774
	Acetato	1.4867	15.378	.995	-35.8743	38.847

Homogeneous Subsets

Proteínas

Tukey HSD^a

tratamiento	N	Subset for alpha = .05
		1
Referencia	15	97.8800
Acetato	15	101.8067
Mat. Org. Compleja	15	103.2933
Sig.		.934

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LIPIDOS	Between Groups	189058.412	2	94529.206	59.258	.000
	Within Groups	66998.544	42	1595.203		
	Total	256056.956	44			
IVL	Between Groups	7113.406	2	3556.703	34.805	.000
	Within Groups	4291.947	42	102.189		
	Total	11405.352	44			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LIPIDOS	Referencia	Acetato	140.7600*	14.584	.000	105.3281	176.1919
		Mat. Org. Compleja	133.9867*	14.584	.000	98.5548	169.4186
	Acetato	Referencia	-140.7600*	14.584	.000	-176.1919	-105.3281
		Mat. Org. Compleja	-6.7733	14.584	.888	-42.2052	28.6586
	Mat. Org. Compleja	Referencia	-133.9867*	14.584	.000	-169.4186	-98.5548
		Acetato	6.7733	14.584	.888	-28.6586	42.2052
IVL	Referencia	Acetato	-28.3067*	3.691	.000	-37.2745	-19.3389
		Mat. Org. Compleja	-24.6600*	3.691	.000	-33.6279	-15.6921
	Acetato	Referencia	28.3067*	3.691	.000	19.3388	37.2745
		Mat. Org. Compleja	3.6467	3.691	.588	-5.3212	12.6178
	Mat. Org. Compleja	Referencia	24.6600*	3.691	.000	15.6921	33.6279
		Acetato	-3.6467	3.691	.588	-12.6145	5.3212

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

LIPIDOS

Tukey HSD^a

tratamiento	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Acetato	15	44.0533	
Mat. Org. Compleja	15	50.8267	
Referencia	15		184.8133
Sig.		.888	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

IVL

Tukey HSD^a

tratamiento	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Referencia	15	39.4733	
Mat. Org. Compleja	15		64.1333
Acetato	15		67.7800
Sig.		1.000	.588

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.