



## I-128 - UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA EN CULTIVOS PUROS Y SISTEMAS DE BARROS ACTIVADOS

### Edgardo M. Contreras

Bioquímico de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Becario de Formación Superior y docente de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, Argentina.

### Nora C. Bertola<sup>(1)</sup>

Ingeniero Químico y Doctor en Ingeniería de la UNLP. Investigador Adjunto del CONICET. Docente de la Facultad de Ingeniería de la UNLP, Argentina.

### Leda Giannuzzi

Licenciada y Doctora en Química de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Investigador Adjunto del CONICET. Profesor Adjunto de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, Argentina.

### Noemi E. Zaritzky

Ingeniero Químico de la UNLP. Doctor en Ciencias Químicas de la UBA. Investigador Principal del CONICET. Profesor Titular de la Facultad de Ingeniería de la UNLP, Argentina.

FOTOGRAFIA  
NÃO  
DISPONÍVEL

**Dirección<sup>(1)</sup>:** Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET - Fac. Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 47 y 116 (1900) La Plata. Argentina - Fax: (0221) 425-4853 - e-mail: : [nbertola@volta.ing.unlp.edu.ar](mailto:nbertola@volta.ing.unlp.edu.ar)

### RESUMEN

En la mayoría de los modelos matemáticos de sistemas de barros activados las ecuaciones están expresadas en unidades de DQO. Como la biomasa normalmente se determina como SSV, para poder aplicar estos modelos es necesario un factor de conversión de unidades de SSV a DQO.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) desarrollar y evaluar una técnica alternativa para determinar la biomasa en términos de demanda química de oxígeno (DQO), analizando cultivos puros de un microorganismo filamentosos (*Sphaerotilus natans*), un microorganismo floculante (E932) y barros provenientes de una planta escala laboratorio de barros activados, 2) obtener el factor de conversión de unidades de biomasa de SSV a DQO ( $f_x$ ) para los sistemas utilizados.

Las variables monitoreadas fueron: absorbancia (A), SSV, demanda química de oxígeno total y soluble (DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>). La determinación de DQO<sub>S</sub> se realizó filtrando una alícuota de cada muestra por membrana de 0.45 µm. La DQO de los sólidos suspendidos asociada a la biomasa (DQO<sub>B</sub>) se calculó como la diferencia entre DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>.

Se realizaron cultivos batch con *S. natans* con valores de pH entre 6 y 8.5 obteniéndose un factor  $f_x$  aproximadamente constante (1.28 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV). En una segunda serie de experimentos se correlacionaron los valores de DQO<sub>B</sub> en función de SSV para *S. natans* desarrollado en un sistema continuo encontrándose un factor  $f_x$  de 1.25 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV. Para la cepa E932 se encontró un factor  $f_x$  de 1.16 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV. Se realizaron estudios a fin de verificar la aplicabilidad del método de la estimación de biomasa en términos de DQO<sub>B</sub> en un sistema de barros activados siendo este caso el factor  $f_x$  obtenido de 1.29 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método propuesto de medida de biomasa como demanda química de oxígeno calculada por diferencia entre DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub> es aplicable tanto a estudios de laboratorio como a plantas de tratamiento de efluentes.

**PALABRAS-CLAVE:** Biomasa, DQO, Barros Activados, *Sphaerotilus Natans*, *Acinetobacter Anitratus*.



## INTRODUCCIÓN

Debido a la gran variedad de compuestos presentes, usualmente se utilizan parámetros indirectos y globales a fin de caracterizar el contenido orgánico total en aguas residuales. La demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) son los parámetros más utilizados en la caracterización de aguas residuales así como en el modelado y control de sistemas de barros activados (Wanner, 1994).

En la DBO se estima el consumo de oxígeno debido a la oxidación biológica de la materia orgánica y el amonio presente en un efluente que ocurriría cuando las aguas residuales son descargadas a un cuerpo receptor (lagos, ríos, mares, etc.). Un alto valor de DBO indica un alto consumo de oxígeno y por lo tanto el peligro de que el cuerpo receptor se convierta en un sistema anaerobio. A pesar de su importancia la DBO es un test muy poco práctico ya que los resultados se obtienen como mínimo en 5 días.

En el test de DQO los compuestos orgánicos son oxidados por dicromato en medio sulfúrico en caliente con cationes plata como catalizador, resultando un medio mucho más agresivo que en el test anterior. Solo los compuestos carbonados son oxidados y por lo tanto, la determinación de la DQO no incluye al consumo de oxígeno debido a la oxidación del amonio. Tampoco pueden ser oxidados completamente algunos hidrocarburos aromáticos y piridinas. Sin embargo, este test es relativamente fácil de realizar y los resultados se obtienen en pocas horas, por ello es ampliamente utilizado.

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

Debido a su simplicidad, la medición de biomasa como sólidos suspendidos volátiles (SSV) se ha generalizado en diferentes áreas de la ingeniería (Metcalf y Eddy, 1979). La técnica de SSV consiste en calcinar una membrana de fibra de vidrio de 1.5  $\mu\text{m}$  a 600 °C con el fin de eliminar la materia orgánica presente, filtrar un volumen conocido de muestra y secar en estufa hasta peso constante. Posteriormente la muestra se volatiliza a 600 °C y se vuelve a pesar. Los sólidos volátiles se calculan como la diferencia entre ambas pesadas (APHA, 1992). A pesar de su sencillez, la medición de los SSV en muestras de barros activados presenta, en ciertas ocasiones, muchos inconvenientes. Algunos barros presentan problemas en la etapa de filtración haciendo este proceso muy lento. Por otra parte, se necesitan alrededor de 24 horas adicionales para el secado y posterior combustión de las muestras.

En la mayoría de los modelos matemáticos de sistemas de barros activados las ecuaciones, por simplicidad están expresadas en unidades de demanda química de oxígeno (Henze y col., 1987; 1995; Kappeler y Gujer, 1992; Keesman y col., 1998). Como la biomasa normalmente se determina como SSV, para poder aplicar estos modelos es necesario un factor de conversión de unidades de SSV a DQO. Este factor de conversión ( $f_x$ ) es la DQO que es aportada por unidad de SSV, está vinculada al estado de oxidación global de la biomasa y depende de la composición de los sólidos retenidos en la etapa de filtración. Se han propuesto diferentes fórmulas que caracterizan la composición microbiana (Daigger y Grady, 1982; Roels, 1983; WRC, 1984; Shimizu y col., 1993; Bullock y col., 1996). Sin embargo, dada la gran variedad de microorganismos presentes en los lodos (Jenkins y col., 1993; Wanner, 1994), la utilización de un determinado valor de  $f_x$  resulta, en algunos casos, en un importante error en la determinación de la biomasa expresada como DQO y por lo tanto en la evaluación de los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan al proceso de biodegradación de los compuestos orgánicos presentes en el agua residual.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1) Desarrollar y evaluar una técnica alternativa para determinar la biomasa en términos de sólidos suspendidos en forma rápida y sencilla mediante la cual los resultados se pueden obtener directamente en términos de DQO.
- 2) Determinar del valor del coeficiente  $f_x$  (DQO aportada por unidad de SSV) aplicando la técnica desarrollada en el punto anterior a diferentes sistemas microbianos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Los estudios se llevaron a cabo sobre dos microorganismos que frecuentemente se encuentran en plantas de tratamiento de efluentes de la industria alimenticia por barros activados.

La cepa *Sphaerotilus natans* ATCC #29329 fue obtenida de American Type Culture Collection. *Sphaerotilus natans* es una bacteria filamentosa frecuentemente hallada en plantas de tratamiento de efluentes por barros activados con problemas de bulking filamentoso (Richard y col., 1985; Jenkins, 1992; Jenkins y col., 1993; Wanner, 1994).

La cepa E932 fue aislada de una planta de tratamiento de efluentes por barros activados escala laboratorio que esta funcionando actualmente en el CIDCA. En el momento del aislamiento, la planta estaba siendo alimentada con un modelo de efluente de la industria procesadora de papas. La cepa E932 fue identificada como *Acinetobacter anitratus* mediante el sistema de pruebas bioquímicas Sensident-E.

Los barros utilizados en las experiencias fueron obtenidos una planta de barros activados escala laboratorio alimentada con un sistema modelo de efluente de una industria láctea. La relación DQO:TKN:P del agua residual era 100:7:0.6.

### MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado en los estudios de cultivos puros de *S. natans* y la cepa E932 fue desarrollado en un trabajo previo en base al estudio de la composición de un efluente modelo de la industria procesadora de papas.

La composición del medio era la siguiente: Ácido cítrico anhidro, 3200 mg/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1000 mg/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 400 mg/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500 mg/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2000 mg/L; vitamina  $\text{B}_{12}$ , 100  $\mu\text{g/L}$ ; solución M1, 1 ml/L; solución M2, 1 ml/L. Solución M1 (g/100mL):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.3;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.075;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.015; ácido cítrico, 0.6. Solución M2 (g/100mL):  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0.05;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 0.01; IK, 0.01.

El pH se ajustó al valor deseado con NaOH. Para 10 litros de medio de cultivo la esterilización se realizó mediante autoclave a 121°C durante 45 - 50 minutos. La vitamina  $\text{B}_{12}$  se esterilizó por filtración con membranas Millipore HA de 0.45  $\mu\text{m}$  y se agregó al medio previamente esterilizado.

### MÉTODOS ANALÍTICOS

#### Medida de biomasa como SSV

Para las muestras de barros activados y cultivos puros de *S. natans* la determinación de SSV se realizó según la técnica estándar (APHA, 1992). Sin embargo, se observó que las células de la cepa E932 no eran retenidas por las membranas recomendadas en el método estándar (membranas de fibra de vidrio) debido al pequeño tamaño de las células (1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro) y era necesario la utilización de membranas de poro más fino. A fin de determinar la biomasa correspondiente a los cultivos de la cepa E932 como SSV se realizó una modificación de la técnica estándar que consistió en utilizar dos membranas simultáneamente en el aparato de filtración. Una membrana de fibra de vidrio (Millipore AP40) que actuaba como prefiltro y una membrana de policarbonato (Millipore HTTP, 0.4  $\mu\text{m}$  de poro) que retenía las células. Este tipo de membranas es muy adecuado ya que son muy poco higroscópicas, tienen muy poca retención de proteínas y se volatilizan completamente a 600 °C. A continuación se detalla el procedimiento aplicado:

- Calentar la membrana AP40 a 600 °C, 5 min. a fin de volatilizar la materia orgánica presente
- Pesar la membrana HTTP ( $m_1$ )
- Filtrar un volumen (V) de cultivo por ambas membranas colocadas en forma conjunta
- Secar las membranas con la muestra a 105 °C hasta peso constante ( $m_2$ )
- Calentar las membranas con la muestra a 600 °C, 5 min. y pesar nuevamente ( $m_3$ )



Las masas fueron expresadas en mg y el volumen filtrado en ml, los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se calcularon de la siguiente manera:

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

### Determinación sólidos suspendidos volátiles como DQO<sub>B</sub>

El método alternativo propuesto de la medida de biomasa como demanda química de oxígeno (DQO<sub>B</sub>) consiste en determinar la demanda de oxígeno total (DQO<sub>T</sub>, sobre la muestra previamente homogenizada), y la demanda química de oxígeno soluble (DQO<sub>S</sub>) de una muestra. La determinación de DQO<sub>S</sub> se realizó filtrando una alícuota de cada muestra por membrana de 0.45 μm. La demanda química de oxígeno de los sólidos suspendidos correspondiente a la biomasa (DQO<sub>B</sub>) se calcula de la siguiente forma:

$$DQO_B = DQO_T - DQO_S$$

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

Las muestras de los diferentes cultivos fueron divididas en dos alícuotas. Una alícuota se reservó para la medida de SSV, DQO<sub>T</sub> y A mientras que otra porción fue filtrada inmediatamente por una membrana de 0.45 μm (Millipore HA) con el objeto de separar las células y sobre el filtrado se midió la DQO<sub>S</sub>.

Las determinaciones de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub> fueron hechas con un equipo Hach (método 435 COD-HR). La absorbancia (A) se determinó en un equipo espectrofotómetro Beckman modelo DU 650 a 620 nm contra agua destilada. Todas las medidas de A fueron hechas en el rango comprendido entre 0.05 y 0.30. Las muestras en donde la absorbancia superaba este rango fueron diluidas con agua destilada.

### Reactores utilizados y condiciones experimentales

Durante los estudios de *S. natans* y la cepa E932 se realizaron experimentos en sistema batch y cultivos continuos. El reactor utilizado en sistema batch consistía en un recipiente de vidrio borosilicato de 1 L de volumen de trabajo con controles automáticos de temperatura, oxígeno disuelto y pH. La velocidad de agitación fue 400 a 600 rpm y el caudal de aireación fue 1 a 2 l/min. La aireación resultó suficiente para mantener el oxígeno disuelto mayor a 50% de saturación en todos los experimentos. Se utilizó ácido sulfúrico 1 M para controlar el pH. Como inóculo se utilizaron 2 a 3 ansadas de cada microorganismo previamente crecido en medio CGY (caseína, glicerol, extracto de levadura) (Dondero y col., 1961) en pico de flauta durante 24 - 48 hs a 30 °C.

En los experimentos de desarrollo de *S. natans* en sistema batch se estudió un rango de pH entre 6.0 y 8.5 (± 0.1) y se trabajó a 30 ± 0.2 °C. Las variables monitoreadas en función del tiempo fueron: demanda química de oxígeno total (DQO<sub>T</sub>), demanda química de oxígeno soluble (DQO<sub>S</sub>) y absorbancia (A).

Para los experimentos de desarrollo de *S. natans* en cultivo continuo se trabajó con velocidades de dilución (D) entre 0.02 y 0.30 h<sup>-1</sup> sin control de pH ni oxígeno disuelto a 20 ± 1 °C. Se consideró que el sistema estaba en estado estacionario una vez transcurridos al menos 5 tiempos de residencia (Pirt, 1975). Las variables monitoreadas en este caso fueron SSV, DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>.



El estudio de la cepa E932 se realizó en cultivo continuo a pH controlado ( $7 \pm 0.1$ ) y oxígeno disuelto mayor al 50% de saturación. Se trabajó con velocidades de dilución comprendidas entre 0.04 a  $1.00 \text{ h}^{-1}$ . En estos experimentos las variables monitoreadas fueron SSV,  $\text{DQO}_T$  y  $\text{DQO}_S$ .

Las plantas de barros activados escala laboratorio tenían un volumen de 1.5 y 4.8 litros. El tiempo de residencia hidráulico fue de 15 a 83 horas. La temperatura de operación fue de  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y la concentración de oxígeno disuelto varió entre 0.5 y  $6.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ . Las variables monitoreadas fueron SSV,  $\text{DQO}_T$  y  $\text{DQO}_S$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de los diferentes métodos de determinación de biomasa

#### Concentración de biomasa por SSV

Se realizó una comparación entre los métodos empleados para la determinación de biomasa como SSV (método estándar y método modificado) utilizando cultivos puros de *S. natans*. La determinación de SSV por el método estándar presentó un valor de 805 mg/L con un desvío estándar de 33 mg/L y un coeficiente de variación (CV) del 4%; mediante la aplicación del modo modificado se obtuvo un valor de 793 mg/L con un desvío estándar de 13 y un CV del 3%. Los resultados obtenidos indicaron que no se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos para *S. natans*.

Como puede verse en la Figura 1, el valor del coeficiente de variación porcentual (CV%) para ambas técnicas resultó similar con una media menor al 3%. Por lo tanto, el método propuesto de medición de SSV presenta un grado de precisión comparable al método estándar.

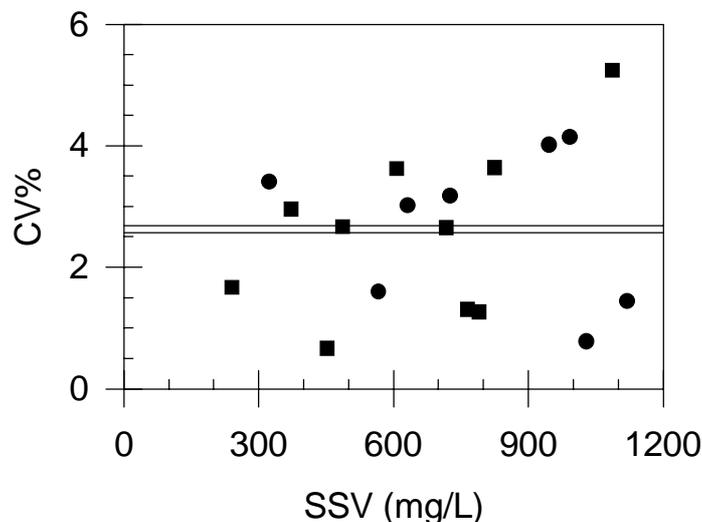


Figura 1. Efecto del valor de SSV en el coeficiente de variación porcentual de la determinación. (★) método modificado, (◻) método estándar, (—) CV% promedio.

#### Medida de la biomasa por Absorbancia

A fin de poder utilizar la absorbancia como una medida rápida y sencilla de la concentración de biomasa se intentó realizar curvas de calibración para ambos microorganismos empleando cultivos puros y para muestras de barros activados. Para ello se graficó el contenido de SSV de un determinado cultivo en función de la absorbancia del mismo (Fig. 2). Puede observarse que se encontró una muy buena correlación entre la absorbancia de los cultivos de *S. natans* y de la cepa E932 con la concentración de sólidos suspendidos volátiles; sin embargo, no se encontró una correlación satisfactoria para las muestras de barros activados (Tabla 1).



La relación  $A/SSV$ , que es la absorbancia de un cultivo por unidad de biomasa, resultó 1.25 y 1.63 L/gSSV para *S. natans* y E932 respectivamente e indica que para la misma concentración de SSV, la cepa E932 produce una turbidez un 30% mayor que para cultivos de *S. natans*. Por otra parte, la falta de correlación entre SSV y  $A$  en las muestras de barros activados se debe a que en estas muestras los microorganismos presentes no son siempre los mismos, el tamaño y densidad de los flóculos puede ser diferente; además, cuando existen flóculos grandes es difícil tomar una muestra representativa. Por lo tanto, la medida de absorbancia es una buena estimación de la biomasa solamente para los cultivos puros de *S. natans* y E932 pero no para muestras de barros activados.

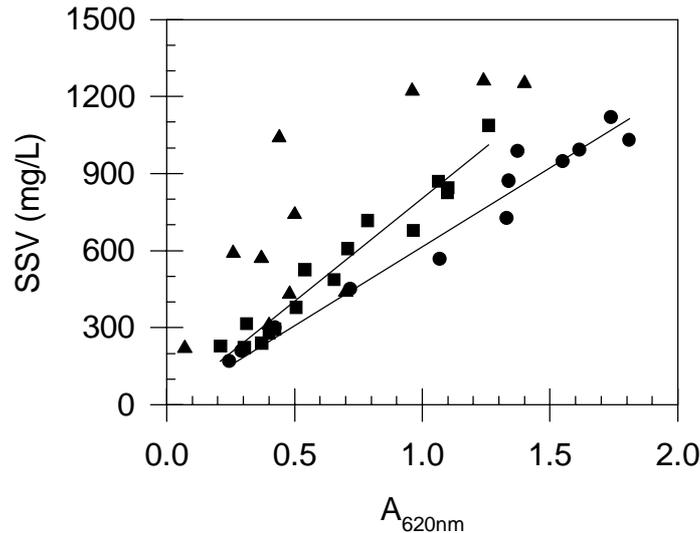


Figura 2. Concentración de SSV en función de la absorbancia para los diferentes cultivos estudiados: (★) E932, (■) *S. natans*, (π) Barros activados.

Tabla 1. Parámetros de la regresión lineal para las diferentes muestras estudiadas correspondientes a la Figura 2.

Microorganismo	SSV/A (mg/L)	$\sigma_n$ (mg/L)	$r^2$	Nro. de datos
<i>S. natans</i>	802	20	0.9521	16
E932	615	16	0.9623	12

$\sigma_n$  = desvío estándar de la pendiente (SSV/A)

### Medida de biomasa como $DQO_B$

A fin de evaluar la medida de  $DQO_B$  por el método propuesto se determinó la  $DQO_B$  de diferentes muestras por dos métodos diferentes: el método propuesto en el presente trabajo (por diferencia entre  $DQO_T$  y  $DQO_S$ ) y un método informado en la literatura (Bullock y col., 1996). La técnica de Bullock se basa en filtrar un volumen conocido de muestra por una membrana de fibra de vidrio (previamente calcinada a fin de eliminar los posibles restos de materia orgánica presente) y determinar la DQO de los sólidos retenidos en el filtro luego de un adecuado lavado del mismo.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos, observándose una muy buena concordancia entre los dos métodos de medida de la DQO asociada a los sólidos en suspensión. Se encontró que experimentalmente el método de Bullock era más engorroso debido a que exigía una calcinación previa de los filtros a fin de eliminar todo resto de materia orgánica que pudiera interferir en la medida de la DQO retenida. Esto



agregaba al menos una hora más al ensayo respecto al método propuesto. Por otro lado, si bien el método propuesto requiere dos determinaciones de DQO, también brinda una mayor información ya que las medidas de DQOT y DQOS, necesarias para calcular DQOB, pueden ser utilizadas en el cálculo del oxígeno consumido por el cultivo, en el cálculo de parámetros cinéticos o en el control del desempeño de la planta de tratamiento (Dang y col., 1989; Aichinger y col., 1992).

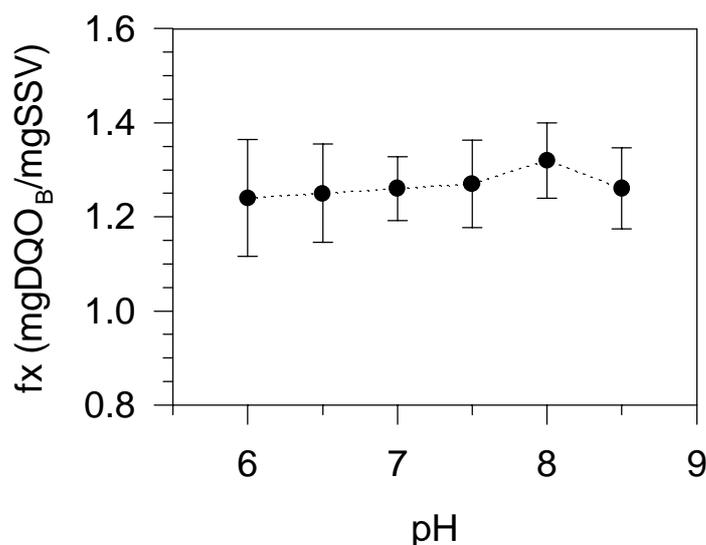
**Tabla 2. Comparación de los diferentes métodos aplicados para la estimación de biomasa como DQO.**

Tipo de Muestra	Método propuesto (este trabajo)		Método de Bullock y col. (1996)	
	Valor medio (mgDQO/L)	$\sigma$	Valor medio (mgDQO/L)	$\sigma$
Barro activado	1309	197	1463	44
Barro activado	1104	48	1200	147
<i>S. natans</i>	1499	72	1315	30

Una vez determinada la validez de los diferentes métodos de medida de biomasa, éstos fueron empleados en la estimación del factor de conversión ( $f_x$ ) que vincula la DQO aportada por unidad de SSV. Se estudió el efecto del pH, condiciones de cultivo y tipo de microorganismo (*Sphaerotilus natans*, cepa E932 y barros activados) en el valor de  $f_x$ .

### Experimentos con *S. natans* en sistemas batch

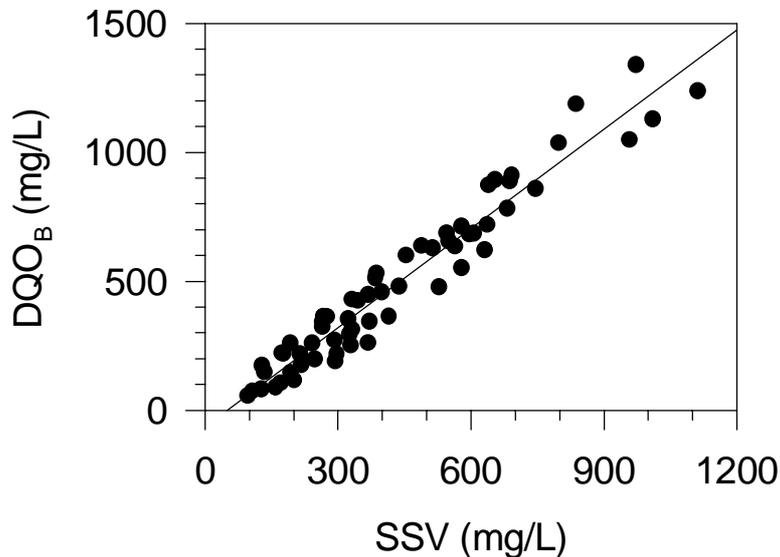
Se realizaron cultivos batch con *S. natans* a fin de determinar si el pH afectaba al coeficiente  $f_x$ . Todas las determinaciones se realizaron con cultivos en fase exponencial. Se hicieron experimentos tipo batch a pH controlado. El rango de pH estudiado fue de 6.0 a 8.5, el cual es el rango de operación normal de una planta de tratamiento de efluentes líquidos por barros activados. La biomasa en estos experimentos fue medida como absorbancia y los resultados fueron posteriormente transformados a SSV mediante la curva de calibración descrita en la sección anterior. Se graficó  $DQO_B$  en función de SSV y de la pendiente se estimó el valor de  $f_x$  para cada pH. Como puede observarse en la Figura 3, el factor  $f_x$  resultó aproximadamente constante e independiente del pH.



**Figura 3. Efecto del pH en el valor de  $f_x$  en cultivos batch. Las barras indican el desvío estándar**



Dado que no se observaron diferencias con el pH se correlacionó el conjunto de todos los datos obtenidos durante los diferentes experimentos en cultivos batch (Fig. 4) obteniéndose un factor  $f_x$  de 1.28 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV con un desvío estándar de 0.04 mg DQO<sub>B</sub>/mgSSV ( $r^2 = 0.9401$ ,  $n = 62$ ).



**Figura 4. Correlación entre DQO<sub>B</sub> y SSV para para *S. natans* desarrollado en sistema batch en el rango de pH estudiado (6.0 - 8.5)**

#### Experimentos en cultivo continuo con *S. natans* y E932

En una segunda serie de experimentos se realizó una correlación de DQO<sub>B</sub> en función de SSV para cultivos puros de *S. natans* y la cepa E932 desarrollados en un sistema continuo a diferentes velocidades de dilución. En estos experimentos los valores de SSV para *S. natans* fueron determinados por la técnica estándar y para E932 por la técnica modificada. El factor  $f_x$  se estimó como la pendiente de la recta DQO<sub>B</sub> en función de SSV (Figura 5 a,b). Como puede observarse la velocidad de dilución no parece afectar la correlación encontrándose un factor  $f_x$  de 1.25 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV con un desvío estándar de 0.03 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV ( $r^2 = 0.9278$ ,  $n = 12$ ) para el caso de *S. natans* y  $f_x$  de 1.16 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV con un desvío estándar de 0.03 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV ( $r^2 = 0.9657$ ,  $n = 12$ ) para la cepa E932.

Los resultados obtenidos para *S. natans* concuerdan con los hallados previamente durante los experimentos en batch e indican que mediante la técnica desarrollada en el presente trabajo no se pueden detectar diferencias en el  $f_x$  (estado de oxidación del *S. natans*) en función del pH o de la velocidad de dilución en el rango estudiado.

#### Mediciones en barros activados

Se realizaron estudios a fin de verificar la aplicabilidad del método de la estimación de biomasa en términos de DQO<sub>B</sub> en un sistema de barros activados. Se correlacionaron los valores de SSV en función de la DQO<sub>B</sub> para muestras obtenidas de un sistema de tratamiento de efluentes de la industria láctea (Fig. 6). Como puede observarse, se encontró una muy buena correlación entre los datos. En este caso el factor  $f_x$  obtenido fue de 1.29 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV con un desvío estándar de 0.03 mgDQO<sub>B</sub>/mgSSV ( $r^2 = 0.9541$ ,  $n = 27$ ).

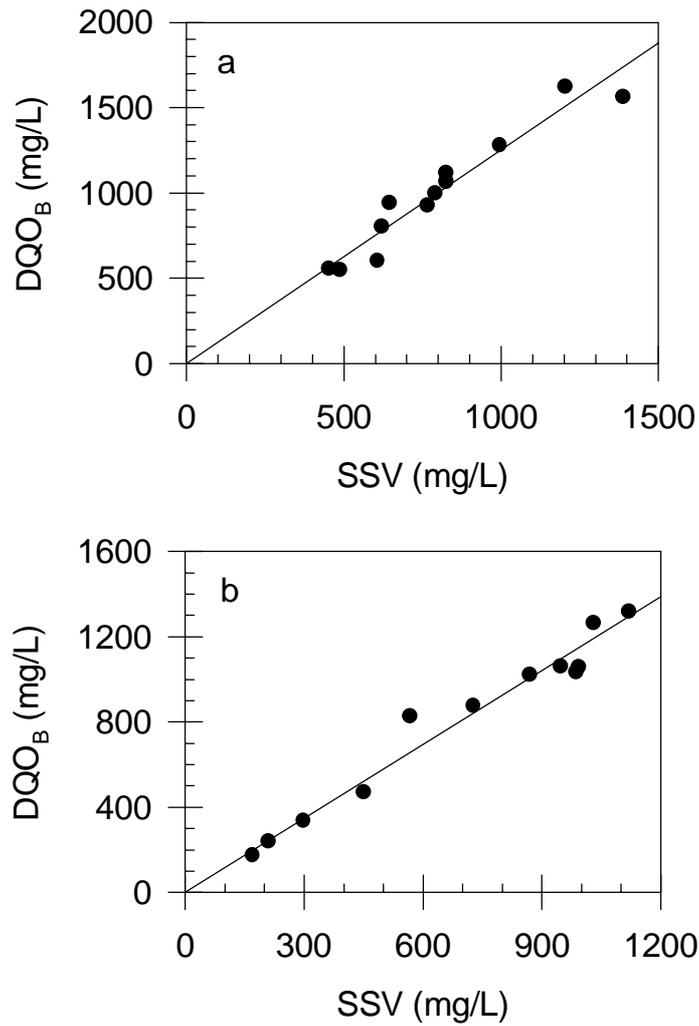


Figura 5. Estimación del factor  $f_x$  para *S. natans* (a) y cepa E932 (b) en cultivo continuo.

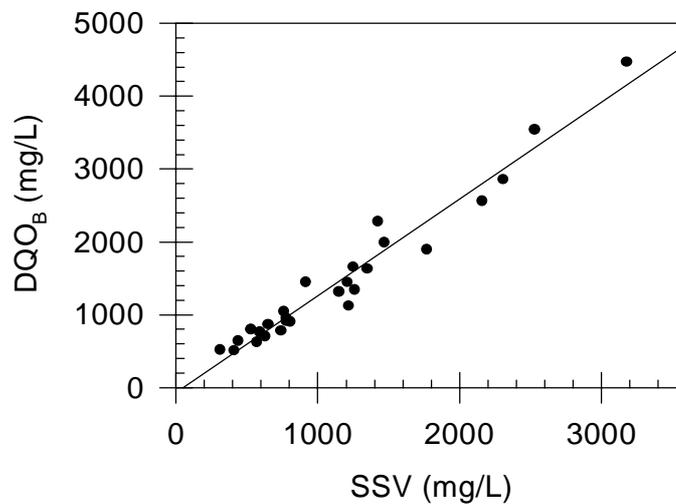


Figura 6. Estimación del factor  $f_x$  para barros activados.



### Comparación de los resultados

En la Tabla 3 se comparan los resultados hallados en el presente trabajo con algunos datos existentes en la bibliografía. Puede observarse que los resultados obtenidos concuerdan con el rango informado por otros autores. En general, se observa una gran disparidad de valores en la literatura que podría ser debida a diversos factores tales como diferentes técnicas aplicadas en el cálculo del factor  $f_x$ , diferencias propias entre los microorganismos estudiados y las condiciones de cultivo. Por esta razón, es muy importante determinar un correcto valor de  $f_x$  para el sistema en estudio o bien medir la biomasa como  $DQO_B$  con lo que se evita la necesidad de contar con el valor de  $f_x$ .

**Tabla 3. Valores del coeficiente  $f_x$  encontrado en cultivos puros y barros activados.**

	$f_x$ (mgDQO <sub>B</sub> /mgSSV)	Referencia
<b>Cultivos puros</b>	1.14 - 1.49 *	Roels, 1983
<b>Barro activado (aeróbico)</b>	1.20 - 1.66 **	Bullock y col., 1996
<b>Barro activado (anaeróbico)</b>	0.98 *	Shimizu y col., 1993
<b>Barro activado (fórmula estándar)</b>	1.48 *	WRC, 1984
<b><i>Sphaerotilus natans</i> ATCC #29329</b>	1.25 - 1.28 **	Este trabajo
<b>Cepa E932 (<i>Acinetobacter anitratus</i>)</b>	1.16 **	Este trabajo
<b>Barro activado (aeróbico)</b>	1.29 **	Este trabajo

\* Valor calculado a partir de la ecuación de oxidación de la fórmula informada de la biomasa.

\*\* Valores determinados experimentalmente.

### CONCLUSIONES

Se propuso una modificación de la técnica estándar de medida de sólidos suspendidos volátiles que permitió determinar la biomasa para cultivos de bacterias del orden de 1  $\mu$ m como la cepa E932 que el método estándar no puede detectar debido a que las células no son retenidas por el tipo de filtro recomendado. Los valores de SSV obtenidos por ambas técnicas no mostraron diferencias significativas y el coeficiente de variación porcentual de la técnica modificada resultó similar al de la técnica estándar, siendo menor al 3% para triplicados en el rango estudiado.

La estimación de biomasa mediante la medida de absorbancia resultó útil solamente para cultivos puros de *Sphaerotilus natans* y para la cepa E932. Sin embargo, en sistemas de barros activados no se logró una buena correlación debido principalmente a la heterogeneidad de las muestras.

Se encontró una muy buena concordancia entre la técnica propuesta de medida de la biomasa como demanda química de oxígeno calculada por diferencia entre  $DQO_T$  y  $DQO_S$  y el método desarrollado por Bullock y col. (1996). Sin embargo, este último resultó más engorroso debido a que exigía una calcinación previa, agregando al menos una hora más al ensayo. Por otro lado, el método propuesto, si bien requiere dos mediciones de DQO, aporta mayor información ya que las medidas de  $DQO_T$  y  $DQO_S$  necesarias para calcular  $DQO_B$  también pueden ser utilizadas en el cálculo del oxígeno consumido, parámetros cinéticos o en el control de la eficiencia de la planta de tratamiento.

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

El factor  $f_x$  de conversión de unidades  $DQO / SSV$  encontrado mediante la técnica descrita se encuentra comprendido en el rango informado por otros autores. El factor  $f_x$  para *S. natans* resultó independiente del pH del medio y de la velocidad de dilución, siendo similar al valor obtenido para las muestras de barros activados. Asimismo, el valor de  $f_x$  para la cepa E932 resultó independiente de la velocidad de dilución siendo inferior al factor correspondiente a los otros cultivos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método propuesto de medida de biomasa asociada a los sólidos suspendidos como DQO es aplicable tanto a estudios de laboratorio a en plantas de tratamiento de efluentes.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. AICHINGER G., GRADY C. P. L., TABAK H. H. Application of respirometric biodegradability testing protocol to slightly soluble organic compounds. *Water Environ. Res.* 64, p. 890-900, 1992.
2. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th edn. Am. Publ. Hlth. Assoc., Washington, D. C., 1992.
3. BULLOCK C. M., BICHO P. A., ZHANG Y., SADDLER J. N. A solid chemical oxygen demand (COD) method for determining biomass in waste waters. *Wat. Res.* 30, p. 1280-1284, 1996.
4. DAIGGER G. T., GRADY C. P. L. The dynamics of microbial growth on soluble substrates. A unifying theory. *Wat. Res.* 16, p. 365-382, 1982.
5. DANG J. D., HARVEY D. M., JOBBAGY A., GRADY C. P. L. Evaluation of biodegradation kinetics with respirometric data. *J. Water Pollut. Control Fed.* 61, p. 1711-1721, 1989.
6. DONDERO N. C., PHILLIPS R., HEUKELEKIAN H. Isolation and preservation of cultures of *Sphaerotilus*. *Appl. Microbiol.* 9, p. 219-227, 1961.
7. HENZE M., GRADY C. P. L., GUJER W., MARAIS G. vR., MATSUO T. Activated sludge model No. 1. IAWPRC Scientific and Technical Reports No. 1, IAWQ London, 1987.
8. HENZE M., GUJER W., TAKAHASHI M., TOMONORI M., WENTZEL M. C., MARAIS G. vR. Activated sludge model No. 2. IAWQ Scientific and Technical Reports No. 3, IAWQ London, 1995.
9. JENKINS D. (1992) Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Wat. Sci. Tech.* 25, p. 215-230, 1992.
10. JENKINS D., RICHARD M. G., DAIGGER G. T. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2nd Edition. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan, 1993.
11. KAPPELER J., GUJER W. Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Wat. Sci. Tech.* 25, p. 125-140, 1992.
12. KEESMAN K. J., SPANJERS H., VAN STRATEN G. Analysis of endogenous process behavior in activated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 57, p. 156-163, 1998.
13. METCALF and EDDY Inc. Wastewater Engineering: Treatment / Disposal / Reuse, 2nd edn. McGraw-Hill, New York, 1979.
14. ORHON D., ARTAN N. Modelling of activated sludge systems. Technomic Publishing Company, Inc., USA, 1994.
15. PIRT S. J. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell, Oxford, 1975.
16. RICHARD M., HAO O., JENKINS D. Growth kinetics of *Sphaerotilus* species and their significance in activated sludge bulking. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 57, p. 68-81, 1985.
17. ROELS J. A. Energetics and kinetics in biotechnology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1983.
18. SHIMIZU T., KUDO K., NASU Y. Anaerobic waste-water sludge digestion - A bioconversion mechanism and kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* 41, p. 1082-1091, 1993.
19. WANNER J. Activated sludge bulking and foaming control. Technomic Publishing Company, Inc., USA, 1994.
20. WRC. Theory, Design and Operation of Nutrient Removal Activated Sludge Processes. Water Research Commission, PO Box 824, Pretoria 0001, South Africa, 1984.