



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



INCIDENCIA DE LOS NUTRIENTES EN LA CINÉTICA DE BIODEGRADACION DE UN EFLUENTE DE CELULOSA KRAFT Y EN LA ACUMULACION DE POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) POR LA BIOMASA BACTERIANA

Presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción,
para optar al título de Bioingeniero mención Ambiental

GUILLERMO ALONSO POZO ZAMORA

Tutora: Dra. Gladys Vidal

Concepción, 2009

AGRADECIMIENTOS

En mi primer lugar agradezco a toda mi familia y amigos, por la paciencia, apoyo y comprensión durante todo este tiempo en que he estado más ausente.

Quisiera agradecer en forma muy especial a la Dra. Gladys Vidal quien es mi profesora tutora de este trabajo, por todo el apoyo que me brindó en todo momento, por darme la oportunidad de trabajar junto a ella y por sus valiosos consejos y sugerencias brindados a lo largo de este trabajo.

Gracias a todo el grupo de Biotecnología Ambiental, por su amistad, compañerismo y gran acogida que he sentido de parte de ellos.

Al Dr. Miguel Martínez por todo el apoyo brindado, su accesibilidad a discusión de resultados y por facilitar el laboratorio de Microbiología Ambiental y Bioremediación para efectuar parte de este trabajo.

Al Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile y al Consejo Nacional de Producción Limpia por otorgarme el segundo premio del concurso “Tesis sobre Producción Limpia en la Región del Bío-Bío 2008”, que me permitió financiar parte del trabajo realizado.

A todo el personal del Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Ambientales EULA y Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción por vuestra ayuda y apoyo.

INDICE GENERAL

1	INTRODUCCION	10
1.1	La industria de celulosa en Chile	10
1.1.1	Proceso de producción de celulosa kraft y efluentes generados	10
1.1.2	Cambio de tecnología en los procesos e implementación de sistemas de tratamiento	10
1.2	Tratamiento aeróbico de efluentes, cinéticas de reacciones biológicas y microbiología del proceso	11
1.2.1	Cinética de reacciones biológicas	11
1.2.2	Microbiología del proceso de tratamiento de efluentes	12
1.2.3	La actividad y la concentración de la biomasa bacteriana en los sistemas de tratamiento de efluentes	13
1.3	Tecnologías de tratamiento biológico de efluentes	14
1.3.1	Sistemas con biomasa libre y adherida	14
1.3.2	Reactor de biopelícula de lecho móvil (MBBR: Moving Bed Biofilm Reactor)	15
1.4	Eliminación de nutrientes	16
1.4.1	Asimilación de nutrientes por la biomasa bacteriana y efecto de su eliminación en sistemas acuáticos	16
1.5	Biosíntesis de polihidroxiálcanoatos (PHA) en bacterias de lodo que tratan efluentes de celulosa kraft	18
1.5.1	Acumulación de PHA bajo limitación de nutrientes y exceso de carga orgánica	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo general	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	Muestreo, almacenaje y caracterización del efluente	21
3.2	Determinación de los parámetros físico-químicos en la fase líquida	21
3.3	Muestreo, almacenaje y aclimatación de la biomasa bacteriana	23
3.4	Operación de sistemas en discontinuo o batch	23
3.5	Determinación de la actividad heterotrófica de la biomasa bacteriana	24
3.6	Cinética de crecimiento microbiano y de degradación de materia orgánica, frente a la variación de la concentración de nutrientes	26
3.7	Determinación de la relación de nutrientes óptima que produce la mayor acumulación de PHA	26
3.8	Puesta en marcha reactor continuo de biomasa adherida (MBBR)	27
3.9	Caracterización microscópica	30

4	RESULTADOS	31
4.1	Caracterización fisicoquímica del efluente de celulosa kraft	31
4.2	Biodegradación del efluente	31
4.3	Cinética de crecimiento microbiano	35
4.4	Obtención de parámetros cinéticos	36
4.5	Actividad heterotrófica y acumulación de PHA de la biomasa bacteriana	41
4.6	Recuento viable y acumulación de PHA por la biomasa bacteriana	42
4.7	Biodegradación de compuestos específicos	44
4.8	Caracterización microscópica del lodo	46
4.9	Operación del reactor MBBR	47
5	DISCUSION	50
5.1	Caracterización fisicoquímica del efluente de celulosa kraft	50
5.2	Biodegradación del efluente de celulosa kraft en sistemas discontinuos o batch	50
5.3	Cinética de crecimiento microbiano	51
5.4	Obtención de parámetros cinéticos en sistemas discontinuos o batch	52
5.5	Actividad heterotrófica de la biomasa bacteriana	53
5.6	Recuento viable y acumulación de PHA por la biomasa bacteriana	53
5.7	Biodegradación de compuestos específicos	54
5.8	Caracterización microscópica de lodos	54
5.9	Operación del reactor continuo MBBR	55
6	CONCLUSIONES	56
7	REFERENCIAS	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Sistema de biodegradación discontinuo, batch	24
Figura 2	Esquema general del reactor continuo	29
Figura 3	Esquema sistema de operación continuo	29
Figura 4:	MBBR: Reactor de Biopelícula de lecho móvil y bomba peristáltica	29
Figura 5	Soportes AMB	30
Figura 6	Evolución de la DQO con lodo PAS a una concentración de 2,5gSSV/L	32
Figura 7	Evolución de la DQO con lodo PAS a una concentración de 5gSSV/L	32
Figura 8	Evolución de la DQO con lodo MAS a una concentración de 5gSSV/L	34
Figura 9	Evolución de las proteínas a una concentración de 2,5g SSV/L	35
Figura 10	Evolución de las proteínas a una concentración de 5 gSSV/L	36
Figura 11	Evolución de la DQO y proteínas en la relación 100:5:1 con inóculo de PAS	37
Figura 12	Linealización obtenidos de la relación 100:5:1 utilizando lodo de PAS	37
Figura 13	Evolución de la DQO y proteínas en la relación 100:1:0,2 con inóculo de PAS	38
Figura 14	Linealización obtenidos de la relación 100:1:0.2 utilizando lodo de PAS	38
Figura 15	Linealización obtenidos de la relación 100:5:1 utilizando lodo de MAS	39
Figura 16	Linealización obtenidos de la relación 100:1:0,2 utilizando lodo de MAS	39
Figura 17	Visualización de células vivas y muertas presentes en el reactor	42
Figura 18	Cinética de acumulación de PHA utilizando lodo proveniente de PAS	43
Figura 19	Cinética de acumulación de PHA utilizando lodo proveniente de MAS	44
Figura 20	Evolución de los compuestos aromáticos durante 7 días de operación batch	44
Figura 21	Evolución de los compuestos lignosulfónicos durante 7 días de operación batch	45
Figura 22	Evolución de la Lignina UV ₂₇₂ durante 7 días de operación batch	45
Figura 23	Evolución de la Lignina UV ₂₈₀ durante 7 días de operación batch	45
Figura 24	Caracterización microscópica de la biomasa pluricelular	46
Figura 25	Efecto de la variación A/M en la eliminación de DBO ₅ a un TRH de 2 días	47
Figura 26	Relación entre el IVL y la razón A/M	48
Figura 27	Acumulación de PHA a TRH de 2 días	48
Figura 28	Comparación de la acumulación de PHA mediante espectrofluorimetría	49
Figura 29	Rotíferos encontrados al final del TRH de 2 días	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Métodos evaluados mediante Spectrocuant NOVA-60	22
Tabla 2	Caracterización del efluente	31
Tabla 3	Biodegradación utilizando lodo de PAS con una concentración de 2,5gSSV/L	33
Tabla 4	Biodegradación utilizando lodo de PAS con una concentración de 5gSSV/L	33
Tabla 5	Biodegradación utilizando lodo de MAS con una concentración de 5gSSV/L	34
Tabla 6	Parámetros cinéticos de lodos PAS con la relación de nutrientes 100:5:1	36
Tabla 7	Parámetros cinéticos de lodos PAS con la relación de nutrientes 100:1:0.2	38
Tabla 8	Constantes cinéticas obtenidas del modelo de Monod	40
Tabla 9	Parámetros cinéticos obtenidos a partir de ensayos respirométricos	41
Tabla 10	Recuento celular mediante microcopia de epifluorescencia	42

ABREVIATURAS

DBO₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días	(mg/L)
DQO	Demanda Química de Oxígeno	(mg/L)
SST	Sólidos Suspendidos Totales	(mg/L)
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles	(mg/L)
X	Concentración de biomasa	
S	Concentración de sustrato	
μ_{max}	Velocidad específica máximo de crecimiento	(d ⁻¹)
K_s	Constante de saturación o afinidad	(mg/L)
Y_{x/s}	Rendimiento celular	
VUO	Velocidad de utilización de oxígeno	(mgO ₂ /L·min)
CNO	Consumo neto de oxígeno	(mgO ₂ /L·min)
A/M	Relación alimento/microorganismos	(gSSV/gDBO ₅)
IVL	Índice Volumétrico de Lodos	(mLSol.Sed/g SSV)
VCO	Velocidad de carga orgánica	(gDQO/L·d)
TRH	Tiempo de retención hidráulico	(d)
MBBR	Reactor de biopelícula de lecho móvil	
PAS	Lodos de Plantas de tratamiento de efluentes de papelera	
MAS	Lodos de Plantas de tratamiento de efluentes de aguas servidas	
PHA	Polihidroxialcanoato	
PHA scl	Polihidroxialcanoato de largo de cadena corta	
PHA mcl	Polihidroxialcanoato de largo de cadena mediana	

RESUMEN

El propósito del tratamiento biológico de efluentes de celulosa kraft es eliminar contaminantes orgánicos, sin embargo pueden ser recuperados como productos con valor agregado al revalorizar la materia orgánica del agua residual en polihidroxialcanoatos (PHAs) como plásticos biodegradables. Este tipo de efluentes contienen insuficiente nitrógeno y fósforo para satisfacer el crecimiento bacteriano, por tanto son adicionados durante el tratamiento asegurando el óptimo rendimiento de eliminación de materia orgánica. La limitación de nutrientes provoca problemas operacionales como bulking al crecer bacterias filamentosas disminuyendo la biodegradación, sin embargo condiciones aeróbicas combinadas con limitación de nutrientes y exceso de carbono produce grandes cantidades de PHA, por tanto se requiere optimizar las condiciones operacionales y la dosificación de nutrientes en la relación $DBO_5:N:P$.

El objetivo de este estudio es evaluar la dosificación de nutrientes en la cinética de degradación de materia orgánica, en el crecimiento bacteriano y en la acumulación de PHA, utilizando lodo activado proveniente de plantas de tratamiento de efluentes de papelera (PAS) y de aguas servidas (MAS) como cultivo microbiano mixto para producir PHA. Los ensayos cinéticos se realizaron en batch, como también se evaluó la acumulación de PHA en un reactor de biopelícula continuo a un TRH de 2 días y una VCO de $0,129 \text{ gDBO}_5/\text{L}\cdot\text{d}$.

Los resultados usando lodo activado de PAS, produjeron eficiencias de eliminación de DBO_5 de 79,1% y 68,31%, unas constantes cinéticas (K_s) de 429,68 mg/L y 413,97 mg/L y (μ_{\max}) de $0,0162 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ y $0,0041 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ al utilizar relaciones 100:5:1 y 100:1:0.2, respectivamente. Usando lodo activado de MAS la eliminación de DBO_5 disminuye a 59,23% y 48,73%, obteniéndose una (K_s) de 105,16 mg/L y 131,43 mg/L y (μ_{\max}) de $0,0244 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ y $0,0065 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ con relaciones 100:5:1 y 100:1:0.2.

La máxima acumulación de PHA se obtuvo al tercer quinto día de operación batch, usando la relación de 100:1:0.2 utilizando lodo de MAS y PAS, respectivamente. El lodo microbiano de PAS presentó una actividad heterotrófica de $0,106 \text{ mgO}_2 / \text{gSSV}\cdot\text{min}$ para degradar la materia orgánica. El reactor fue inoculado con $3,2 \text{ gSSV/L}$ que correspondieron a $5,3\cdot 10^6$ células vivas y $3,2\cdot 10^6$ células muertas, evidenciándose un estado de crecimiento estacionario.

ABSTRACT

The purpose of kraft mill effluents biological treatment is to eliminate organic pollutants, however they can be recovered as products with attached value, by upgrading the residual waters organic matter into polyhydroxyalkanoate (PHA's) as biodegradable plastics.

This type of effluents don't have sufficient nitrogen and phosphorus to satisfy the bacterial growth, therefore they are added during the treatment, ensuring optimum performance of organic matter elimination. The nutrients limitations causes operational problems such as bulking, by growing filamentous bacteria decreasing biodegradation, though combined aerobic conditions with nutrients limitations and excess of carbon produces great quantities of PHA, hence it is required optimize the nutrient dosage and the operational conditions.

The subject of this study is to evaluate the incidence of the nutrients dosage in the bacterial growth kinetics and organic matter degradation, as well in the accumulation of PHA, using activated sludge coming from paper industry effluent treatment plants (PAS) and municipal wastewater (MAS) as mixed microbial culture to produce PHA. Kinetics tests were performed in batch, as well in a continuous biofilm reactor to a TRH of two days and a VCO and 0,129 gDBO₅/L·d.

The results using PAS's activated sludge produced DBO₅ elimination efficiencies of 79,1% and 68,31%, kinetics constants (K_s) of 429,68 mg/L and 413,97 mg/L and (μ_{max}) of 0,0162 (d⁻¹) and 0,0041(d⁻¹) by using relations of 100:5:1 and 100:1:0.2, respectively. Using MAS activated sludge the DBO₅ elimination decreases to a 59,23% and 48,73%, obtaining a (K_s) of 105,16 mg/L and 131,43 mg/L and (μ_{max}) of 0,0244 (d⁻¹) and 0,0065(d⁻¹).

The maximum PHA accumulation was obtained on the third and fifth day in batch, using the relation of 100:1:0.2 by using MAS and PAS sludge, respectively. The PHA microbial sludge presented a heterotrophic activity of 0,106 mgO₂ / gSSV·min to degrade the organic matter, the reactor was inoculated with 3,2 gSSV/L that corresponds to a 5,3·10⁶ of living cells and a 3,2·10⁶ of dead cells, noticing a stationary growth state.

1 INTRODUCCION

1.1 La industria de celulosa en Chile

1.1.1 Proceso de producción de celulosa kraft y efluentes generados

Existen actualmente 13 plantas de celulosa localizadas en el sur de Chile, de las cuales 8 usan procesos químicos kraft y 5 utilizan procesos mecánicos (Papernet, 2002).

La industria de celulosa kraft, que corresponde al 92% de la producción en Chile, se basa en dos procesos principales: pulpaje y blanqueo. Para el proceso de pulpaje, las astillas son cocidas en una solución alcalina de sulfuro de sodio (Na_2S) e hidróxido de sodio (NaOH) para extraerles la lignina; estos compuestos químicos son posteriormente recuperados para su reutilización, en un proceso de ciclo cerrado. Después de esta etapa conocida como digestión, se genera la pasta de celulosa y un residuo denominado licor negro (Pokhrel y Viraraghavan, 2004). Actualmente, el licor negro es recuperado para ser procesado en otro sector de la planta de celulosa denominado sistema de recuperación de productos químicos y energía. Sin embargo, existe una pequeña parte de este filtrado que permanece entre las fibras y es arrastrado a los procesos de lavado y blanqueo. Los procesos de blanqueo están dirigidos hacia la mejora del color y al grado de pureza de la pulpa de celulosa, esto se logra mediante la eliminación de lignina o bien su oxidación, productos que se encuentran posteriormente en los residuos líquidos, los cuales dependen directamente del tipo de agente blanqueante añadido y de la materia prima empleada (Xavier y Vidal, 2003).

Finalmente los efluentes líquidos provenientes tanto del proceso de pulpaje como blanqueo contienen alto contenido de sólidos suspendidos, carga orgánica, color y toxicidad (Thompson y *col.*, 2001), los cuales presentan distintas características fisicoquímicas que dependen de la materia prima, tecnología y procesos utilizados.

1.1.2 Cambio de tecnología en los procesos e implementación de sistemas de tratamiento

En los últimos años se han implementado optimizaciones al proceso kraft tendientes a reducir los impactos de la carga orgánica de los efluentes. Es así como se han diseñado sistemas de recirculación de agua y recuperación de compuestos químicos, como también modificaciones en la etapa de digestión y cambio en los procesos de blanqueo con cloro como agente oxidante, por procesos libres de cloro (Xavier y Vidal, 2003; Pokhrel y Viraraghavan, 2004).

En la industria de celulosa es ampliamente conocida la tecnología de tratamiento primario y secundario, el primero se basa en la eliminación de sólidos suspendidos, además de neutralizar pH, enfriar y homogeneizar el efluente (Metcalf y Eddy, 1995). El tratamiento secundario es un tratamiento

biológico, ya sea bajo condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas que consiste en la degradación de la materia orgánica mediante el uso de microorganismos los que requieren una fuente de carbono y nutrientes para su crecimiento (Slade y *col.*, 2004; Gerardi, 2006).

El tratamiento biológico logra eficiencias de eliminación de carga orgánica biodegradable DBO₅ (Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días) entre 65-99% y una reducción en la DQO (Demanda Química de Oxígeno) entre 25-65% (Diez y *col.*, 2002). Las tecnologías implementadas en la industria de celulosa para tratamiento secundario, son de tipo biológica aeróbica, por lo tanto, a continuación se describe el proceso de tratamiento aeróbico, las cinéticas de reacción y la microbiología del proceso que involucra el consumo oxígeno.

1.2 Tratamiento aeróbico de efluentes, cinéticas de reacciones biológicas y microbiología del proceso

1.2.1 Cinética de reacciones biológicas

El tratamiento aeróbico de efluentes es un proceso biológico degradativo, en donde un agua residual, urbana o industrial, se somete a aireación durante un periodo de tiempo, reduciéndose el contenido de materia orgánica, formando a su vez un lodo floculento. El examen microbiológico de este lodo revela que está formado por una población de microorganismos, que cambian continuamente en función de las variaciones de la composición de las aguas residuales y de las condiciones ambientales. Los microorganismos presentes son bacterias, hongos, microalgas, protozoos y rotíferos. De éstos, las bacterias son las más importantes, encontrándose en todos los tipos de procesos de tratamiento biológico (Bitton, 2006; Gerardi, 2006).

El estudio de la cinética de tratamiento biológico aeróbico conduce a determinar la velocidad a la cual los microorganismos degradan un residuo específico y por lo tanto, suministran la información básica necesaria para desarrollar el tamaño de los reactores biológicos aeróbicos (Plattes y *col.*, 2007; Ramalho, 1996).

El crecimiento celular engloba la conversión metabólica de un sustrato en productos, lo que hace que se libere energía en forma de ATP (ruta catabólica), que será utilizada para la síntesis celular (ruta anabólica). Los estudios cinéticos que relacionan la velocidad de crecimiento con las concentraciones de sustratos y productos se realizan a condiciones de temperatura, pH y concentración de oxígeno disuelto constantes. Entre las ecuaciones que relacionan el crecimiento microbiano en función de la disponibilidad de un sustrato limitante está la cinética de Monod, con la cual se obtienen parámetros cinéticos como la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m), la constante de saturación o de afinidad por el sustrato (K_s) (Casas y *col.*, 2005). Estas constantes cinéticas dependen del sustrato

utilizado, del tipo de microorganismo y si el cultivo es puro o mixto, por lo tanto, se revisará en detalle la microbiología del proceso.

1.2.2 Microbiología del proceso de tratamiento de efluentes

Las bacterias pueden estar clasificadas según su similitudes, por ejemplo, de acuerdo a la fuente de carbono y energía que utilizan, según su morfología, metabolismo y de acuerdo a como responden a tinciones diferenciales específicas como la tinción de Gram.

Aunque las bacterias pueden estar clasificadas de muchas formas, la clasificación más importante para los operadores de las plantas de tratamiento de aguas residuales son de acuerdo a los roles que desarrollan. Dependiendo de las condiciones operacionales algunas bacterias juegan roles positivos en el tratamiento de aguas residuales, mientras que otras bacterias contribuyen a la ineficiencia del tratamiento, aumentando los costos operacionales.

Dentro de los géneros bacterianos presentes en el lodo biológico que trata estos residuos se encuentra *Acetobacter* la cual es importante en la degradación de DBO₅ soluble produciendo acetato. De la familia Enterobacteriaceae se encuentran bacterias Gram negativas como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersinia* en donde su presencia es indicador de contaminación fecal. En lodos se encuentran cianobacterias como *Oscillatoria* la que genera problemas de sedimentabilidad en el proceso de lodos activados.

También se encuentran bacterias desnitrificantes que son anaeróbicas facultativas que usan nitrato (NO₃) en ausencia de oxígeno molecular para degradar la DBO₅ soluble, entre ellas se encuentran los géneros *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Pseudomonas*.

La conversión de aminoácidos, ácidos grasos y azúcares a ácidos orgánicos es llevado a cabo por bacterias fermentativas que incluyen *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Lactobacillus* y *Proteus*.

Se han identificado aproximadamente 30 especies bacterianas filamentosas que contribuyen a los problemas de sedimentabilidad de los lodos biológicos, en donde las más comunes son *Haliscomenobacter hydrossis*, *Microthrix parvicella*, *Nocardia forms*, *Sphaerotilus natans* y *Thiothrix*. Dentro de las características de los lodos biológicos están la capacidad de generación de flóculos microbianos por parte de bacterias como *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Citromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Zoogloea*.

Además se encuentran bacterias hidrolíticas como *Bacteroides*, acumuladoras de polifosfatos como *Acinobacter*, arqueas productoras de metano y bacterias saprófitas como *Micrococcus*. Cuando ocurren cambios en la presión parcial de oxígeno se evidencian *Spirochaetes* como *Leptospira* y bacterias oxidadoras y reductoras de sulfuro. La presencia de cada género bacteriano en el lodo

biológico depende tanto, del tipo de agua residual que degradan estos microorganismos, como también de las condiciones operacionales del sistema (Gerardi, 2006; Chandra y *col.*, 2006; Sharifi y *col.*, 2001).

1.2.3 La actividad y la concentración de la biomasa bacteriana en los sistemas de tratamiento de efluentes

La actividad heterotrófica de la biomasa bacteriana es fundamental para evaluar la biodegradación de compuestos contenidos en efluentes de celulosa kraft, la cual puede verse disminuida por condiciones desfavorables y por la presencia de compuestos específicos que podrían causar inhibición en los sistemas biológicos (Fall y *col.*, 2006). La biodegradación de un contaminante en un bioreactor depende de la biodisponibilidad del contaminante, la capacidad de degradación de las bacterias, el tiempo de retención del contaminante, microorganismos adaptados, síntesis de las enzimas requeridas, como también las condiciones ambientales apropiadas.

Debido a la sensibilidad de la biomasa biológica aeróbica ante cambios bruscos de carga y toxicidad, es necesario evaluar el potencial impacto negativo que el efluente de celulosa produce sobre la biomasa bacteriana adaptada.

La respirometría es una herramienta útil para evaluar la actividad heterotrófica de la biomasa, se basa en la determinación e interpretación de la velocidad de utilización del oxígeno (VUO), permite conocer la tasa de consumo de sustrato, el rendimiento bacteriano, así como los coeficientes de saturación relacionado con la afinidad de los microorganismos por el efluente, como también las constantes de inhibición de la biomasa bacteriana (Plattes y *col.*, 2007; Guisasola y *col.*, 2007). Mediante la respirometría es posible determinar el oxígeno empleado para respiración endógena, que es el oxígeno empleado por las bacterias exclusivamente para su crecimiento (Fall y *col.*, 2006). Las actividades de la biomasa bacteriana en sistemas aeróbicos de tratamientos de efluentes varían entre 0,07 hasta 0,42 $\text{gO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{d}$ (Vidal y *col.*, 2004). Una variedad de análisis están disponibles para la determinación de la concentración de la biomasa de muestras biológicas, dentro de ellos está la determinación de peso seco bacteriano mediante la determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV) que permite estimar la concentración de microorganismos contenida en la biomasa y así monitorear su crecimiento. Otra de las metodologías está fundamentada en la detección específica de componentes celulares o productos metabólicos, es así como la concentración de la biomasa pueden obtenerse indirectamente midiendo la concentración de proteínas, ATP y ADN. Otra de las formas para realizar recuentos bacteriano es utilizando tinciones específicas de ácidos nucleicos como las de Yoduro de Propidio y Syto 9 que permiten conocer la viabilidad bacteriana (Schumann y *col.*, 2003)

Otro parámetro a considerar es el rendimiento celular ($Y_{x/s}$), que indica la fracción de sustrato que se emplea para crecimiento de la biomasa, donde X representa la concentración de biomasa como SSV y S la materia orgánica biodegradable (Casas y *col.*, 2005). Sistemas anaeróbicos poseen $Y_{x/s}$ de 0,1 a

diferencia de sistemas aeróbicos que presentan $Y_{x/s}$ de 0,6, lo cual quiere decir que un 10% o un 60% de la DBO_5 consumida se convierte en biomasa (Ramalho, 1991; Metcalf y Eddy, 1995). La razón DBO_5/SSV es conocida como la relación alimento/biomasa (A/M) y entrega las condiciones óptimas de la biomasa bacteriana para su crecimiento (Vidal y *col.*, 2004).

Finalmente la medida de la DBO_5 consumida en función de la biomasa producida por día de operación (U) es un importante parámetro a considerar. El valor de U puede variar entre 0,120 y 0,378 $gDBO_5/gSSV \cdot d$, y puede estar afectado por la velocidad de carga orgánica (VCO) y la concentración de biomasa en el sistema (Diez y *col.*, 2002).

Los datos cinéticos de una población celular, pueden obtenerse utilizando dos sistemas de reacción, el reactor continuo de tanque agitado como también el reactor discontinuo de tanque agitado o batch. En el primero de ellos se mantiene un caudal constante de entrada y salida, y la mezcla del reactor hace que las concentraciones sean homogéneas e iguales a las de las corrientes de salida. Fijadas unas determinadas condiciones de operación, la población celular evolucionará hacia un determinado estado estacionario. Dentro de las ventajas de utilizar el reactor continuo para obtener datos cinéticos es que se logra mantener las células en estado reproducible y relativamente bien definido y por tanto se pueden observar los efectos de un factor concreto (cambio en la concentración de un componente, o de una condición ambiental). Sin embargo, la operación de reactores continuos requiere mayor tiempo de operación para generar los distintos estados estacionarios requeridos.

Antes de realizar estudios en sistemas continuos es importante evaluar la cinética de biodegradación del efluente y de crecimiento de la biomasa bacteriana en sistemas batch en donde se obtienen parámetros cinéticos en menor tiempo y se evalúa como afectarán las condiciones ambientales como el pH, relación de nutrientes, concentración de oxígeno disuelto etc, en la eficiencia de biodegradación de materia orgánica y de compuestos específicos del efluente de celulosa kraft (Casas y *col.*, 2005). Además de las condiciones ambientales que afectan la actividad microbiana que mineraliza compuestos fácilmente biodegradables del efluente, existen otros parámetros y condiciones operacionales que afectan los sistemas continuos, es por ello que se mencionan a continuación algunas tecnologías de tratamiento biológicas y sus modos de operación.

1.3 Tecnologías de tratamiento biológico de efluentes

1.3.1 Sistemas con biomasa libre y adherida

Las tecnologías biológicas utilizadas mayormente en la depuración de efluentes son lagunas aireadas y lodos activados, se caracterizan porque la biomasa bacteriana presente en el lodo floculento en estos sistemas crece de forma libre, constituyendo sistemas de tratamiento aeróbicos altamente eficientes. Sin embargo, estas tecnologías pueden sufrir problemas debido a variaciones en el pH, por ingresos de

tóxicos, desbalance de nutrientes y/o pick de cargas orgánicas en el sistema, provocándose por ejemplo bulking que es el crecimiento de bacterias filamentosas, generando un lodo voluminoso y pérdida de la biomasa en suspensión (Lerner *y col.*, 2007; Tsang *y col.*, 2006).

Cuando las comunidades de los microorganismos presentes en el lodo crecen adheridas a una superficie se denomina biopelícula, la cual es más resistente a alteraciones en el proceso, por lo tanto, los tratamientos de aguas residuales en que los microorganismos crecen formando biopelículas en soporte resultan ser más robustos en comparación con tecnologías convencionales como los procesos de lodos activados (Helness y Odegaard, 2001). Entre los reactores de biopelículas que han sido diseñados están los filtros de escurrimiento, en los que la biopelícula en el filtro no presenta un volumen efectivo, los biofiltros sumergidos en medio fijo en los que es difícil lograr una distribución de la carga en toda la superficie del soporte como también los biofiltros de medio granular los que deben ser operados en forma discontinua. Por estas razones se diseñó un sistema de biopelícula en medio móvil, que pudiese operar en forma continua y que permitiese una mezcla completa, por lo cual este sistema se describirá a continuación.

1.3.2 Reactor de biopelícula de lecho móvil (MBBR: Moving Bed Biofilm Reactor)

El sistema MBBR que es un reactor de biopelícula de lecho móvil se caracteriza porque utiliza todo el volumen del reactor para el crecimiento de la biomasa bacteriana, en el cual la biopelícula se encuentra protegida en el interior de un soporte plástico, diseñados especialmente con una elevada superficie interna. Estos soportes plásticos se encuentran en suspensión, en continuo movimiento, en un determinado volumen de reactor y completamente distribuidos por toda la fase líquida, sin necesidad de recirculación del lodo. El diseño del biosoporte es importante debido a los requerimientos de transferencia del sustrato y de oxígeno a los microorganismos (Plattes *y col.*, 2007).

Una ventaja importante del MBBR es que disminuye la fracción de soporte con biopelícula, menor a un 70% del volumen del reactor (Rusten *y col.*, 2006). Este sistema presenta alta concentración de biomasa en el soporte (74g/L) lo que permite mayor estabilidad y un menor volumen de reactor.

El sistema MBBR es más eficiente para eliminación de DBO₅ (85-99%) y DQO (24-85%) a tiempos de retención hidráulico menor a 2 horas (Dupla *y col.*, 2006; Rusten *y col.*, 2006; Plattes *y col.*, 2007). El bioreactor de lecho móvil permite operar con cargas más altas de 2,5 a 3 kg DQO/m³d⁻¹ (Jarhen *y col.*, 2002) y no necesita recirculación de la biomasa. Se requieren aproximadamente 3 mg O₂/L en reactores de biopelícula que operan con cargas orgánicas altas, debido a que el oxígeno disuelto (OD) necesita difundir por la biopelícula, por lo tanto, se considera un factor limitante en la eficiencia de la operación (Rusten *y col.*, 2006). De esta manera resulta muy importante conocer la cantidad de oxígeno a suministrar dentro de estos sistemas de tratamiento.

Los efluentes de celulosa kraft contienen compuestos resistentes a la biodegradación y una composición carente en concentración de nutrientes, por lo tanto, es necesario un balance de nutrientes adecuado para la biodegradación de materia orgánica. En las plantas de tratamiento biológico que tratan efluentes de celulosa, se adiciona nitrógeno (N) y fósforo (P) al influente, debido a que estos nutrientes son necesarios para el crecimiento de la biomasa bacteriana que trata estos vertidos (Diez y *col.*, 2002; Slade y *col.*, 2004). La importancia de la dosificación de nutrientes en el sistema de tratamiento biológico, los efectos de la presencia de nitrógeno y fósforo en cuerpos de agua y las ventajas de utilizar el sistema MBBR para su eliminación serán descritas a continuación.

1.4 Eliminación de nutrientes

1.4.1 Asimilación de nutrientes por la biomasa bacteriana y efecto de su eliminación en sistemas acuáticos

El efluente de la industria de celulosa kraft generalmente contiene insuficiente nitrógeno (N) y fósforo (P) para el crecimiento de la biomasa bacteriana presente en el sistema de tratamiento aeróbico. La biomasa bacteriana estequiométricamente se define como $C_5H_7NO_2P_{0,08}$, relación que establece requerimientos de N entre 12 y 16 % y P entre 2 y 5 %, respectivamente (Ramalho, 1996; Sivard y *col.*, 2007).

Entre el 1 y 3 % del peso seco de la célula bacteriana corresponde a P, el cual es aproximadamente un quinto del contenido de N que requiere la célula. El P es necesario en la célula bacteriana para la síntesis de ácidos nucleicos, ATP y generación de membranas celulares, mientras que, el N es utilizado para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, por lo tanto, son elementos esenciales en la formación de nuevas células (Madigan y *col.*, 2003; Slade y *col.*, 2004).

La calidad del efluente tratado depende de la naturaleza del proceso de tratamiento biológico, y del límite de descarga de nutrientes, optimizado mediante la relación DBO_5 : N: P dosificada al sistema.

Se ha evidenciado que los sistemas biológicos se adaptan a la deficiencia de N a través del desarrollo selectivo de poblaciones bacterianas que lo fijan, mientras que la limitación de fósforo puede generar severos impactos en la eficiencia de los sistemas de tratamiento a través de la generación de flóculos pobremente sedimentables y, por lo tanto, disminución de la eliminación de DBO_5 (Tsang y *col.*, 2006; Liu y Liss, 2007). Bajo condiciones aeróbicas ocurre el proceso de nitrificación, que corresponde a la oxidación biológica del NH_4^+ a nitrito (NO_2^-) y a nitrato (NO_3^-), donde el O_2 actúa como aceptor de electrones. Esta oxidación, realizada por bacterias autotróficas, utilizan una fuente de carbono inorgánico (CO_2 , bicarbonato o HCO_3^-) para su metabolismo. En la etapa de oxidación del NH_4^+ a NO_2^- , donde la fuente de energía es el NH_4^+ , las principales bacterias encargadas son bacterias amonio oxidantes, pertenecen al género *Nitrosomonas*, aunque se han encontrado otros géneros asociados a esta

etapa, como: *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobu* (Pambrun y col., 2008). En biopelículas las tasas de nitrificación son influenciadas por la carga orgánica, la concentración de oxígeno disuelto en el reactor, la concentración de NH_4^+ , la temperatura, el pH y la alcalinidad (Rusten y col., 2006).

En reactores de biopelícula, puede ocurrir en forma simultánea la nitrificación y desnitrificación, bajo condiciones aeróbicas. El oxígeno puede ingresar hasta cierta profundidad en la biopelícula, donde la nitrificación ocurre. En estratos más profundos en condiciones anóxicas las bacterias desnitrificantes utilizan el nitrato producido por las bacterias nitrificantes reduciéndolo a N_2 (Helness y Odegaard, 2001). La eliminación biológica de fósforo ocurre en forma simultánea a la nitrificación y desnitrificación en reactores de biopelícula. En aguas residuales el fósforo puede ser encontrado en forma orgánica e inorgánica. En forma inorgánica, se encuentra como ortofosfatos y polifosfato. En relación a ortofosfatos, este incluye los siguientes compuestos PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- y H_3PO_4 , la cantidad de estas formas son dependientes del pH. Los polifosfatos en cambio, son cadenas lineales de largo variable de 3 a 1000 residuos de ortofosfatos (Mullan y col., 2002; Brown y Kornberg, 2004). Las formas orgánicas del fósforo presente en efluentes, son producidas por las mismas bacterias del lodo de los sistemas de tratamiento a la forma de ácidos nucleicos y fosfolípidos. Del total de fósforo el 50-70 % corresponde a ortofosfato, mientras que el 30-50 % corresponde a polifosfato y fósforo orgánico (Gerardi, 2006).

En el sistema de tratamiento los compuestos que presentan fósforo experimentan varios destinos, con suficiente tiempo de retención hidráulico (TRH), los compuestos fosfóricos orgánicos son degradados por actividad microbiana, mientras que los polifosfatos son hidrolizados biológica y químicamente provocando la liberación de ortofosfato. Dentro de los organismos responsables de la mineralización o la degradación de los compuestos fosfóricos en los sistemas de tratamiento, se encuentran los actinomicetos como *Streptomyces*, bacterias del género *Arthrobacter*, *Bacillus* y hongos como *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos organismos producen fosfatasa, una enzima que libera ortofosfato de los compuestos que contiene fósforo (Gerardi, 2006). El fósforo disponible como nutriente para el crecimiento de la biomasa del sistema de tratamiento se encuentra en forma de ortofosfato, el que es asimilado entre 1 y 3 % del peso seco de la bacteria.

Si el ortofosfato se presenta en mayor concentración a lo necesario para el crecimiento de la biomasa, este es descargado a través del efluente, constituyéndose en el nutriente limitante en el crecimiento de vegetación en cuerpos de agua. De esta manera concentraciones de 0,5 mg/L de ortofosfato provocan el crecimiento excesivo de algas las que rápidamente provocan un deterioro en la calidad del agua, produciendo un desequilibrio en la vida acuática conocido como eutrofización, provocando menor disponibilidad de oxígeno para organismos como peces y crustáceos, reduciendo así la biodiversidad y aumentando la sedimentación (Haygarth y col., 2005; Gerardi, 2006).

La calidad del efluente tratado en relación a la materia orgánica y nutrientes depende del proceso de tratamiento biológico, el cual está supeditado a la relación $DBO_5: N: P$ que es dosificada al sistema. Sin embargo, en reactores de biopelículas se ha evidenciado que pueden ser operados con concentraciones deficientes de nutrientes (en especial nitrógeno), debido a las propiedades estables del lodo biológico adherido a soportes, evidenciándose una producción de lodos de 0,07 y 0,15 kgSST/kgDQO con buenas características microbiológicas del lodo en comparación a sistemas de biomasa libre operados con dosificación deficiente en nutrientes (Malmqvist y *col.*, 2007; Sivard y *col.*, 2007).

Se ha evidenciado que las bacterias presentes en este lodo, presentan distintas estrategias para sobrevivir en condiciones de inanición de nutrientes, como dormancia, flexibilidad fisiológica y síntesis de sustancias de reserva que incluyen gránulos de glicógeno, polifosfato y polihidroxiálcanoato (PHA) (Beun y *col.*, 2002). Los PHAs se caracterizan por ser polímeros biodegradables, los cuales tienen gran importancia económica si son sintetizados a partir de residuos industriales (Gurieff y *col.*, 2007), es por ello que las condiciones para su biosíntesis serán descritas a continuación.

1.5 Biosíntesis de polihidroxiálcanoatos (PHA) en bacterias de lodo que tratan efluentes de celulosa kraft

1.5.1 Acumulación de PHA bajo limitación de nutrientes y exceso de carga orgánica

Los PHAs son un grupo de poliésteres sintetizados por más de 300 especies bacterianas en forma de gránulos citoplasmáticos, como reserva de carbono y energía, siendo estimulada por exceso de carbono soluble y limitación de macronutrientes como nitrógeno y fósforo (Tobella y *col.*, 2005; Coats y *col.*, 2007).

Los PHAs se han evidenciado como la materia prima alternativa para la producción de plásticos biodegradables debido a sus propiedades físicas, mecánicas y térmicas similares a plásticos sintéticos (McChalicher, 2007). Generalmente, los PHAs son categorizados en dos grupos, basados en el número de átomos de carbono en las unidades monoméricas, los de largo de cadena corta (l_{cc}) que consisten en 3- 5 átomos de carbono, como también los de largo de cadena mediana (l_{cm}) que constan en 6 – 14 átomos de carbono. Los $PHA_{l_{cc}}$ presentan altas temperaturas de denaturación y mayor rigidez en comparación a $PHA_{l_{cm}}$ los que son menos tensos (Wu y *col.*, 2003).

Los PHAs han sido comercialmente producidos por fermentación desde cultivos puros de cepas salvajes o genéticamente modificadas, utilizando sustratos concentrados puros como glucosa (Mahishi y *col.*, 2003; Bengtsson y *col.*, 2008 a), sin embargo los costos de producción son todavía muy altos, por lo tanto, los procesos utilizados actualmente están asociados a reducir los costos en la fuente de carbono utilizada, como por ejemplo utilizar aguas residuales como sustrato (Punrattanasin y *col.*, 2006). También el uso de cultivos microbianos mixtos los cuales no requieren esterilización en el reacto

disminuyen los costos, evidenciándose acumulaciones de PHA alrededor del 48% del peso seco bacteriano, a partir de la utilización de lodos como inóculo de microorganismos (Takabatake y col., 2002; Dias y col., 2006; Bengtsson y col., 2008 b). La presencia de gránulos de PHA proporcionan la energía necesaria para mantener la viabilidad y actividad metabólica durante la inanición de fuente de carbono y nutrientes en presencia de compuestos tóxicos de efluentes de celulosa kraft (Godoy y col., 2003; Tobella y col., 2005).

Se ha evidenciado que un aumento en la relación C:N de 20 a 140 resulta en una disminución del rendimiento del crecimiento específico de la biomasa de 0,638 a 0,233 g células/ g de DQO, como también la eficiencia de eliminación de carbono orgánico total (COT) se ve afectada, indicando que las condiciones de deficiencia de nitrógeno afectan el crecimiento normal de la biomasa y la síntesis de nuevas células, sin embargo aumenta el rendimiento de la producción de PHA desde 0,047 a 0,422 gPHA/ gcélula (Wang y col., 2007).

Las plantas de tratamiento biológico aeróbico de efluentes de celulosa producen toneladas de exceso de lodo por día. Este residuo puede representar una interesante oportunidad para la producción de PHAs, es así como según estudios utilizando sistemas de fermentación acoplados a lodos activados es posible a partir de 1kg de DQOs producir 0,1 kg de PHA con eficiencias de eliminación de DQO del 95% (Bengtsson y col., 2008 b), siendo factible la producción de este polímero a partir de efluentes de celulosa sin afectar la eliminación de la materia orgánica. Por lo tanto, es evidente la necesidad de realizar estudios dirigidos a la producción de PHA en tecnologías actualmente utilizadas para el tratamiento de efluentes, como lo son los sistemas de biopelículas, que presentan la ventaja de ser operados con mayores cargas orgánicas en menores tiempos de retención del efluente en el sistema.

Tomando como base el estudio de (Tobella y col., 2005) en que se evidencia la capacidad de cultivos puros como de *Sphingopyxis chilensis* S37 y *Wautersia sp.* PZK cultivadas en efluentes de celulosa, de acumular PHA en un 80% y 90% del total celular y un estudio reciente de (Bengtsson y col., 2008) en que se evidencia la capacidad de bacterias presentes en un lodo biológico que trata efluentes de celulosa kraft, de acumular PHA hasta un 48% del peso seco bajo circunstancias de bajas concentraciones de nutrientes y exceso de carga orgánica, es importante la necesidad de evaluar la capacidad de acumulación de PHA en sistemas que están siendo implementados actualmente en las plantas de tratamiento como lo son sistemas con biomasa adherida, principio que se basa en la formación de una biopelícula en soportes móviles, generando una estabilidad y diversificación de la biomasa bacteriana, evaluando principalmente la eliminación de nutrientes vs la acumulación de Polihidroxialcanoatos (PHA), durante el tratamiento de efluentes de celulosa kraft, por lo tanto, debido a lo antes descrito se propone la siguiente hipótesis de trabajo

Existe una velocidad de carga orgánica y relación de nutrientes óptima, que favorece la acumulación de PHA en un reactor continuo de biopelícula bacteriana inmovilizada, alimentado con efluentes de celulosa kraft.

Para comprobar la hipótesis antes descrita, se proponen los siguientes objetivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la variación de la dosificación de nutrientes y la carga orgánica en la acumulación de PHA, usando materia orgánica presente en un efluente de celulosa kraft y lodo activado como fuente de microorganismos.

2.2 Objetivos específicos

-Evaluar el efecto de la variación de la relación $DBO_5 : N : P$ en la cinética de degradación de materia orgánica, en el crecimiento bacteriano y en la acumulación de PHA en sistemas batch.

-Determinar la actividad heterotrófica bacteriana y la evolución de los parámetros fisicoquímicos del efluente proveniente de la operación del sistema.

-Evaluar la acumulación de PHA en un reactor de biopelícula continuo

3 METODOLOGIA

3.1 Muestreo, almacenaje y caracterización del efluente

El efluente empleado en esta investigación proviene de una planta de celulosa kraft, que procesa *Pinus radiata* con sistema ECF de blanqueo. El muestreo del efluente, se realizó después del tratamiento primario de la planta, que consiste en la eliminación de sólidos suspendidos. El efluente fue transportado en bidones de 50L, refrigerado a 4°C y almacenado en oscuridad. La caracterización del efluente que permite determinar la eficiencia de biodegradación de materia orgánica y de compuestos específicos, se realizó por determinación de los siguientes parámetros fisico-químicos, los que son descritos a continuación.

3.2 Determinación de los parámetros fisico-químicos en la fase líquida

pH: Las medidas de pH se realizaron mediante un pHmetro WTW Inolab pH level 1, el cual fue calibrado con tampón pH 4,00 y pH 7,00.

OD: El oxígeno disuelto se determinó con un electrodo de oxígeno WTW Oxycal 323B.

DQO: La DQO de muestras previamente filtradas en membrana de 1,2 µm, se determinaron mediante espectrofotometría (660 nm) (Spectronic unicam- Genesis 10 UV), después de 2h en digestión a temperatura 150°C con solución dicromato de potasio y sulfato de plata (APHA, 1998).

DBO₅: La DBO₅ de muestras filtradas se realizó sin inóculo de lodo. Se empleó un volumen de muestra suficiente para que la concentración de oxígeno disuelto se reduzca a la mitad, durante 5 días de incubación a 20°C según Standard Methods (APHA, 1998).

Compuestos fenólicos totales (UV₂₁₅): Los compuestos fenólicos totales se determinaron por medición de la absorbancia a 215 nm, de una muestra a pH 6 (Tampón KH₂PO₄ 0,2 mol/L), en cubeta de cuarzo 1×1 cm (Chamorro, 2005)

Compuestos aromáticos (UV₂₅₄): Los compuestos aromáticos se determinaron por medición de la absorbancia a 254 nm en cubeta de cuarzo 1×1 cm. Las muestras para los análisis espectrofotométricos fueron filtradas y diluidas 10 veces (Çeçen, 2003)

Lignina y sus derivados (UV_{272} , UV_{280}): Los compuestos lignínicos fueron medidos a longitud de onda de 272 y 280 nm en cubeta de cuarzo 1×1 cm (Çeçen, 2003)

Color (VIS_{440}): El color de las muestras filtradas a pH 9,0 fue medido a longitud de onda de 440 nm. Las medidas se realizaron en cubeta de vidrio 1×1 cm (Chamorro, 2005)

Ácidos lignosulfónicos (VIS_{346}): El ácido lignosulfónico fue determinado por medición de la absorbancia a 346 nm en cubeta de vidrio 1×1 cm. Las muestras para los análisis espectrofotométricos fueron filtradas y diluidas 10 veces (Çeçen, 2003)

Otros parámetros como Nitrógeno total (NT), $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$ y Fósforo total (PT) se determinaron mediante kit específicos de Spectroquant NOVA-60 de Merck, cuyas metodologías se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Métodos evaluados mediante Spectroquant NOVA-60

Parámetro	Código Merck	Rango	Método
$N-NH_4^+$	1.14752.0001	0,010-3,00($N-NH_4^+$) 0,013-3,86 (NH_4^+)	Indophenol Blue
NT	1.00613.0001	0,5-15,0 (mg N/L)	Koroleff digestion, 2,6-dimethylphenol
$N-NO_3^-$	1.14563.0001	0,5-25,0 ($N-NO_3^-$) 2,2-110,7 (NO_3^-)	2,6-Dimethylphenol
PT	1.14729.0001	0,5-25,0 (P- PO_4^-) 1,5-76,7 (PO_4^-) 1,1-57,3 (P_2O_5)	Phosphor-molybdenum blue

3.3 Muestreo, almacenaje y aclimatación de la biomasa bacteriana

La biomasa bacteriana que se utilizó en este proyecto para las experiencias en batch, se obtuvo a partir de lodos de una planta de tratamiento de efluentes de la industria del papel y de una planta de tratamiento de aguas servidas. Para el caso de la operación del reactor continuo este se inoculó con biomasa de la industria papelera la cual presenta mayor aclimatación a los compuestos específicos de la industria de celulosa. El muestreo de la biomasa se realizó en diferentes puntos del sistema y se transportó en bidones de 5 L, almacenada y refrigerada a 4°C. A partir de este muestreo se determinó la concentración de biomasa mediante la determinación de el peso seco a través de SST: Sólidos suspendidos totales y SSV: Sólidos suspendidos volátiles, en donde la diferencia de estos parámetros es una determinación indirecta de la biomasa bacteriana, según lo descrito en (APHA, 1998), como también se realizó recuento de células vivas y muertas que permite una cuantificación mas idónea de la biomasa bacteriana viable presente en el reactor. Esta mezcla fue agitada y aireada constantemente, y se verificó la concentración de biomasa antes de su utilización.

3.4 Operación de sistemas en discontinuo o batch

Para determinar la óptima relación de DBO₅: N: P en la eficiencia de biodegradación de materia orgánica, se implementaron cultivos de lodos biológicos alimentados con efluente de celulosa como sustrato en sistemas de tipo discontinuo o sistemas batch (Figura 1). Estos sistemas se dispusieron en matraces Erlenmeyer (0,5 L), los cuales fueron incubados en un agitador orbital, modelo LAB- online 3527-1, a una temperatura de 25°C, a 150 rpm, durante 7 y 13 días. Para evaluar la degradación de la materia orgánica y el crecimiento de la biomasa bacteriana, se obtuvieron muestras de efluente el cual fue filtrado, como también se obtuvieron muestra de lodo.

Se estudiaron, 2 relaciones de nutrientes (100: 5: 1 y 100: 1: 0,2), ambas con 3 replicas y la utilización de 2 tipos de inóculos bacterianos provenientes de plantas de tratamiento de la industria de papel y de aguas servidas. La oxigenación se mantuvo entre 6- 8 mg O₂/L, cada matraz se inoculó con 147 ml de lodo aeróbico con una concentración de lodos de 5 gSSV/L y en la segunda experiencia por el período de 13 días se utilizó una concentración de 2,5 gSSV/L, utilizandose efluente de celulosa como sustrato de fuente de carbono. Para obtener las concentraciones de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) que se estudiaron, fue necesario adicionar al efluente de celulosa N como urea (CON₂H₄) y P como fosfato monopotásico (KH₂PO₄).

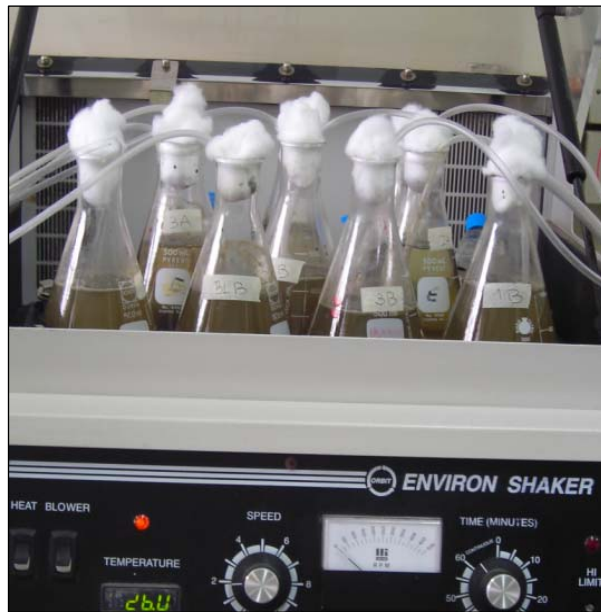


Figura 1: Sistema de biodegradación discontinuo, batch

El NT y PT en cada reactor al inicio del experimento correspondió a la relación DBO_5 : N: P utilizada. La concentración de NT y PT para los reactores con relación de nutrientes 100: 5: 1 correspondió a 8,89 mgN/L y 1,78 mgP/L, mientras que los reactores con relación de nutrientes 100: 1: 0,2 presentaron 1,78 mgN/L y 0,35 mgP/L respectivamente. Las técnicas analíticas para determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Biológica de Oxígeno (DBO_5), se realizaron según los procedimientos indicados en Standard Methods, mientras que NT y PT, se determinaron a través de kits de Spectroquant NOVA-60 de Merck para cada caso. Durante el tiempo de operación de los reactores se determinó el aumento de la concentración de la biomasa a través de la determinación indirecta de la concentración de proteínas utilizando el método de Lowry.

3.5 Determinación de la actividad heterotrófica y nitrificante de la biomasa bacteriana

Con el fin de evidenciar la actividad heterotrófica de la biomasa bacteriana presente en el lodo, se realizó la determinación de la actividad específica mediante la técnica de respirometría, se determinó el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que degradan un sustrato orgánico. Se determinó tanto la actividad heterótrofa máxima mediante la adición de una concentración conocida de un sustrato fácilmente biodegradable como $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como también la utilización del efluente de celulosa a distintas concentraciones, mientras que para el caso de la determinación de la actividad de nitrificantes, se utilizó $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ Y NaNO_2 . Para llevar a cabo estos experimentos se empleó un sistema de monitorización de oxígeno biológico (BOM, Modelo YSI 5300) el cual consta de un

electrodo de oxígeno (sensor polarográfico de oxígeno, Modelo YSI 5331) que se encaja herméticamente en una celda dotada de un agitador magnético y en la que se realizó el ensayo, el sistema es termostatzado a 25°C por medio de un baño termoregulador.

Con respecto a la biomasa bacteriana presente en el lodo fue lavada con una solución tampón fosfato, elaborada en base a KH_2PO_4 y K_2HPO_4 de pH alrededor de 7, de tal forma que la actividad heterotrófica medida sea representativa, evitando el efecto por procesos de muerte o decaimiento celular. La concentración para el ensayo fue de 2 gSSV/L utilizándose un volumen de muestra de 5 mL. La mezcla fue aireada hasta saturación de oxígeno, luego se mide el oxígeno disuelto en la muestra a cada minuto durante 15 minutos. La actividad específica de las bacterias del lodo se calcula a partir de las pendientes de la curva de desaparición de oxígeno frente al tiempo y relativa a la concentración de SSV. La velocidad de utilización específica del oxígeno se expresa como $\text{gO}_2/\text{gSSV día}$, mientras que la respiración endógena tiene unidad de d^{-1} .

La productividad de la biomasa, se determinó como la concentración de SSV formados en función de la cantidad de sustrato consumida (gSSV/gDBO_5). Se determinó la cinética de crecimiento microbiano y de eliminación de materia orgánica y de nutrientes, bajo la variación de la relación $\text{DBO}_5: \text{N}: \text{P}$. La cinética de crecimiento microbiano se evaluó mediante la ecuación de Monod.

3.6 Cinética de crecimiento microbiano y de degradación de materia orgánica, frente a la variación de la concentración de nutrientes

En sistemas batch, el crecimiento de las poblaciones bacterianas sigue un crecimiento exponencial en el tiempo. Debido a que el crecimiento de la población bacteriana ocurre por división de las células individuales, la tasa de crecimiento bacteriano es proporcional al tamaño de la población. Considerando la fase de crecimiento exponencial, en la que el crecimiento se efectúa a la velocidad específica constante μ , no se evidencia limitaciones en el crecimiento en donde el comportamiento metabólico y fisiológico de las células es constante. La ecuación que describe el aumento de la concentración celular y que se utilizó para evaluar los parámetros cinéticos se presenta a continuación.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ec. 1}$$

La forma integrada de esta ecuación permitió determinar el valor de μ , fue necesario conocer la concentración de microorganismos del lodo biológico a través de la medición indirecta del aumento de la biomasa, mediante la determinación de proteínas y su variación en el tiempo. La ecuación integrada que se utilizó se representa a continuación.

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad \text{Ec. 2}$$

Existe una proporcionalidad directa entre la cantidad de sustrato consumido y de biomasa producida lo que da la posibilidad de definir rendimientos al proceso. Se describió el crecimiento celular en función de la disponibilidad de sustrato limitante en donde la ecuación de Monod que se describe a continuación se ajusta a la cinética evidenciada en los reactores batch.

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{SX}{K_S + S} \quad \text{Ec. 3}$$

En la ecuación 3, r_x es la velocidad de crecimiento de las células, μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento y K_S es la constante de saturación, la que está relacionada a la afinidad de microorganismo por el sustrato. La ecuación 1 también se expresó en función de la velocidad específica de crecimiento como se representa a continuación.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ec. 4}$$

En la ecuación 4, μ_m es el máximo valor que puede alcanzar la velocidad de crecimiento, cuando $S \gg K_S$. K_S es el valor de la concentración de nutriente limitante en donde la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima.

3.7 Determinación de la relación de nutrientes óptima que produce la mayor acumulación de PHA

Se determinó en sistemas batch el efecto de la variación de la disminución de la concentración de N y P de la relación DBO₅: N: P, en la acumulación de PHA mediante espectrofotometría de fluorescencia previa tinción de las células bacterianas con rojo de Nilo, a una longitud de onda de excitación de 290nm, con un máximo de emisión a longitud de onda a 583 nm correspondiente a PHA de largo de cadena mediana (Modificado de Gorenflo y *col.*, 1999; Wu y *col.*, 2003). Para evaluar la acumulación de PHA en la biomasa bacteriana presente en el lodo se realizó un recuento de células vivas y muertas previa desfloculación del lodo microbiano mediante los reactivos pirofosfato de sodio (0,01%) y lubrol

(0,01%) con el fin de evaluar la acumulación de PHA v/s cantidad celular mediante densidad óptica. Para llevar a cabo el procedimiento de tinción de células vivas y muertas, la suspensión bacteriana después de ser desfloculada se le adicionaron 12 ul de la tinción viva/muerta (Live/Dead^R BacLightTM INVITROGEN, la cual consta de dos componentes: yoduro de propidio, con el cual las células muertas se ven rojas; y SYTO 9, con el cual las bacterias vivas se ven verdes) incubándose en oscuridad a temperatura ambiente por 7 minutos. Posteriormente se filtró la muestra a través de filtros de policarbonato black de 0,2 um de poro con el fin de que las células bacterianas queden retenidas. La visualización se realizó mediante la utilización del microscopio Olympus BX51 con cámara: Cool SNAP-Procf.Monocheme acoplada. El recuento bacteriano, se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$\sum cel = \frac{\sum cel / campo \cdot V_m}{V_t} \cdot f$$

Donde:

$\sum cel$: Sumatoria de células en la muestra

V_m : Volumen de muestra recolectada (mL)

V_t : Volumen de tinción utilizado (μ l)

F: Factor de relación del área del filtro/área de campo

3.8 Puesta en marcha reactor continuo de biomasa adherida (MBBR)

Se implementó un bioreactor en continuo MBBR, como se muestra en la Figura 2, el cual fue construido de un tanque de acrílico con volumen de 1000 ml (Figura 3) con 200 soportes tipo AMD de material polietileno (Figura 4) en suspensión, cuyas dimensiones son de 7 mm de altura y 10 mm de diámetro. Estos soportes presentan una densidad y superficie específica de 0,95 g/ml y 850 m²/m³, por lo tanto, el volumen útil del reactor será de 830 ml. El sistema operará en continuo por un período de 180 días, y será alimentado con efluentes de celulosa kraft, mediante una bomba peristáltica (Masterflex modelo 7553 – 85). El tratamiento del efluente se realizará a temperatura ambiente y a una concentración de oxígeno entre 6-8 mg/L mediante un difusor de oxígeno y se neutralizará hasta llegar a un pH=7,5 \pm 0,05 mediante la adición de NaOH (1M) y HCl (1M) (Guisasola y col., 2007).

El TRH y la VCO se variarán desde 48 hasta 3,84 horas por ajuste de la bomba peristáltica aumentando la VCO desde 0,235 a 2,938 gDQO/L·d, respectivamente.

El reactor fue inoculado con una concentración de 3,34 gSSV/L correspondiendo a una relación A/M (Alimento /Microorganismos) de $0,033 \text{ d}^{-1}$ utilizando una VCO de $0,091 \text{ gDBO}_5/\text{L} \cdot \text{d}$

La estrategia de operación constará de una fase de adaptación de la biomasa (28 días), seguida de variación de la velocidad de carga orgánica (76 días) y una fase del efecto de la dosificación de nutrientes al sistema mediante la relación $\text{DBO}_5: \text{N}: \text{P}$ (76 días).

La etapa de adaptación de la biomasa se realizará durante los primeros 28 días y se suministrarán nutrientes al efluentes en proporciones $\text{DBO}_5: \text{N}: \text{P} = 100:5:1$ empleando NH_4Cl y K_2HPO_4 . Durante la etapa de adaptación de la biomasa, el tiempo de retención hidráulico (TRH) será de 2 días, con suministro de efluente en la mitad de su concentración original para selección de biomasa y estabilidad del sistema (Correa y *col.*, 2003). Se medirán y controlarán el índice volumétrico del lodo (IVL), los SSV, la edad del lodo (medida como el tiempo de retención de sólidos (TRS), el potencial redox (E°_{red}) según lo descrito en (APHA, 1998).

Se realizará durante 76 días el estudio del efecto de la variación de la concentración de nitrógeno y fósforo a partir de la relación $\text{DBO}_5: \text{N}: \text{P}$, con el fin de eliminar la menor concentración posible de estos nutrientes en la descarga, sin afectar la eficiencia de eliminación de carga orgánica (DBO_5 y DQO), esto se realizará manteniendo constante el tiempo de retención hidráulico (2 días). El estado estacionario se verificará a través de medidas consecutivas de la DQO para el cual la desviación sea menor que 5 %, se considerará el tiempo de 3 veces el TRH para llegar al estado estacionario (Diez y *col.*, 2002).

El efecto de la velocidad de carga orgánica en la evolución de los parámetros fisicoquímicos y en la acumulación de PHA se evidenciará variando cada 19 días el TRH (2; 1,6; 0,8; 0,16 días) La variación en la relación $\text{DBO}_5: \text{N}: \text{P}$ se realizará cada 25 días en donde la Etapa 1= 100:5:1; Etapa 2= 100:1:0,2; Etapa 3= 100:0,2:0,04. Se obtendrán muestras de lodo durante cada variación de las condiciones de operación, se adicionan agentes desfloculantes y se fija la muestra en formalina al 5% (impedir la lisis celular) y se guardan a -20°C . Para evidenciar la cinética de acumulación de PHA se determina mediante espectrofotometría de fluorescencia como también mediante citometría de flujo.

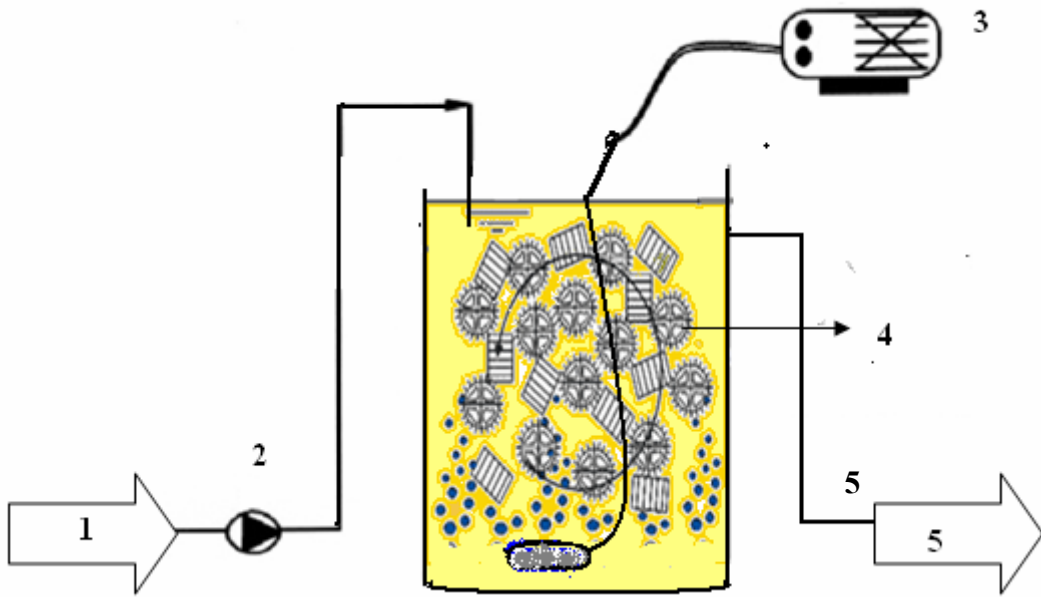


Figura 2: Esquema sistema de operación continuo (1) Influyente, (2) Bomba peristáltica, (3) Difusor de oxígeno, (4) Soportes con biopelícula adherida, (5) Efluente



Figura 3: MBBR: Reactor de Biopelícula de lecho móvil y bomba peristáltica



Figura 4: Soporte AMB

3.9 Caracterización microscópica

Observaciones de la biomasa pluricelular en suspensión fueron realizadas mediante microscopio óptico (H500 HUND, fase/contrafase) acoplado a una cámara Nikon Coolpix 3500. Se evaluó la variación de las poblaciones de rotíferos, protozoos, amebas y otros microorganismos durante las diferentes condiciones de operación, con el fin de evaluar la calidad del lodo que trata estos vertidos. Para ello, se obtendrán muestras de 0,1 ml del reactor y dispuestas en portaobjetos para ser visualizadas.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterización fisicoquímica del efluente de celulosa kraft

Los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización del efluente se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Caracterización del efluente empleado en la operación de los reactores batch

Nombre del análisis	Valor
pH	$6,9 \pm 0,30$
DQO (mg/L)	$530,2 \pm 20,8$
DBO ₅ (mg/L)	$250 \pm 15,4$
Compuestos fenólicos totales (UV ₂₁₅)	$248,7 \pm 0,50$
Compuestos aromáticos (UV ₂₅₄)	$0,208 \pm 0,03$
Color (VIS ₄₄₀)	$0,20 \pm 0,07$
Lignina (UV ₂₇₂)	$0,244 \pm 0,10$
Lignina (UV ₂₈₀)	$0,307 \pm 0,08$
Ácidos lignosulfónicos (VIS ₃₄₆)	$0,045 \pm 0,01$
Nitrógeno total (mg/L)	$0,9 \pm 0,10$
Amonio (mg/L)	$< 0,06$
Nitrato (mg/L)	0,19
Nitrito (mg/L)	0,1
Fósforo total (mg/L)	$0,5 \pm 0,50$

4.2 Biodegradación del efluente

Durante el tiempo de operación de 7 y 13 días de los sistemas, se determinó la biodegradación de materia orgánica, frente a las relaciones de nutrientes estudiadas (100:5:1 y 100: 1: 0,2) utilizando lodo microbiano procedente de la planta de tratamiento de efluentes de papel (PAS) y de aguas servidas (MAS) , como inóculo de los reactores. En la Figura 5, se observa la evolución de la eliminación de materia orgánica a través de la determinación de la DQO en 7 días y en la Figura 6 la evolución en 13 días, utilizando 2,5 y 5gSSV de lodo proveniente de PAS, respectivamente En los sistemas de mayor concentración de nutrientes (100: 5: 1), se evidenció reducción de materia orgánica, con un rango entre 180,84 – 300,8 mgDQO/L durante 7 días con una eficiencia de eliminación de 39,21 %, y una reducción entre el rango de 104,9 - 169,2 mgDQO/L, con una eficiencia de eliminación de 44,16 % durante 13 días.

La eficiencia de eliminación para la relación de dosificación (100:1:0,2) es de 25,83 %, con un rango entre 194,22 – 300,8 mgDQO/L durante 7 días y una eficiencia de eliminación de 38,89 % durante 13 días de operación con un rango entre 109,6 – 169,2 mgDQO/L.

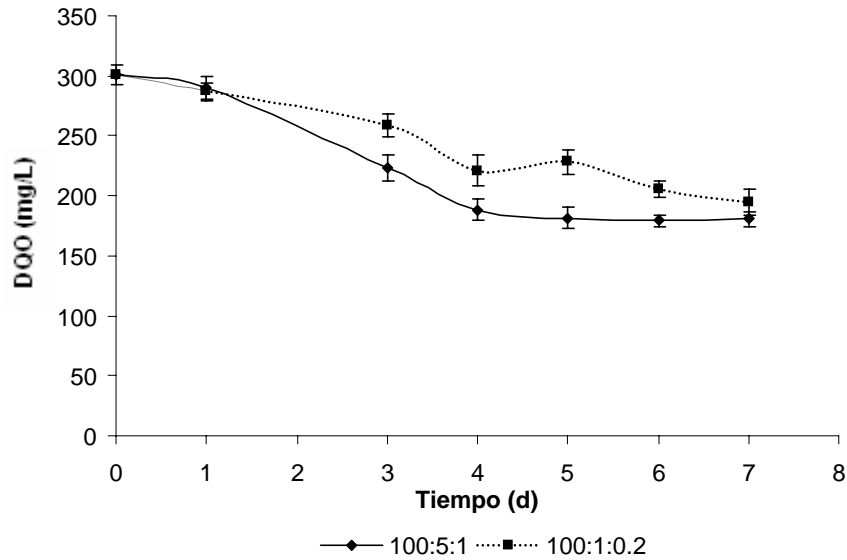


Figura 5: Evolución de la DQO utilizando lodo de PAS a una concentración de 2,5gSSV/L

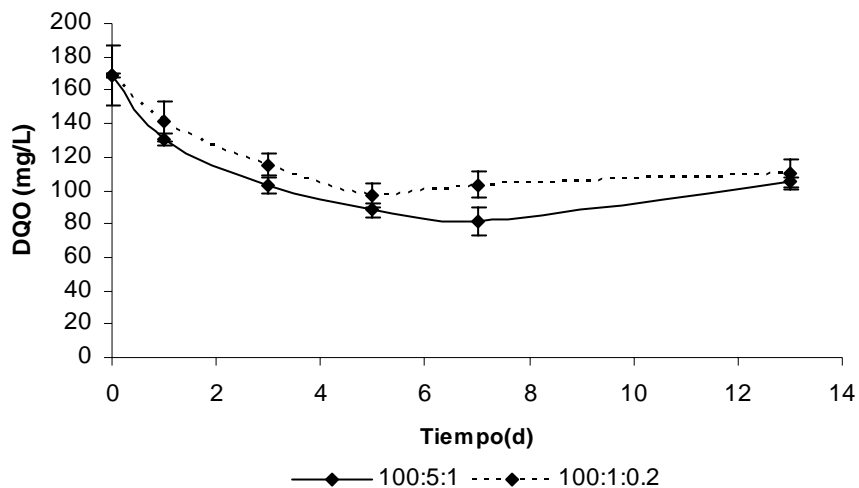


Figura 6: Evolución de la DQO lodo de PAS a una concentración de 5gSSV/L

En la Tabla 3 y 4 se muestra los resultados de biodegradación utilizando 2,5gSSV/L y 5gSSV/L proveniente de PAS de operación en batch, para ambos casos la relación de nutrientes con la cual se obtiene la mayor eficiencia de eliminación de materia orgánica, corresponde a la relación de 100: 5: 1-

Tabla 3: Biodegradación utilizando lodo de PAS con una concentración de 2,5gSSV/L

Parámetro	100:5:1	100:1:0.2
pH.	7,5	7,7
DQO (mg/L)	180,84	194,22
DBO ₅ (mg/L)	29,40	44,61
Nitrógeno total (mg/L)	5,99	1,14
Fósforo total (mg/L)	1,26	–
Eliminación de DQO (%)	39,88	35,43
Eliminación de DBO ₅ (%)	79,10	68,31

Condiciones iniciales: pH 7,2; 300,8 mgDQO/L; 140,8 mgDBO₅/L; 7,05mgN/L;1,41 mgP/L en la relación (100:5:1). 1,4 mgN/L;0,5mgP/L en la relación (100:1:0,2)

Valores son el promedio de tres experimentos batch. Las diferencias entre los valores observados es menor que el 5% en todos los casos.

Tabla 4: Biodegradación utilizando lodo de PAS con una concentración de 5gSSV/L

Parámetro	100:5:1	100:1:0.2
pH	7,4	7,5
DQO (mg/L)	104,9	109,6
DBO ₅ (mg/L)	11,38	18,16
Nitrógeno total (mg/L)	1,92	-
Fósforo total (mg/L)	0,5	-
Eliminación de DQO (%)	38,01	35,2
Eliminación de DBO ₅ (%)	83,79	74,13

Condiciones iniciales: pH 7,0; 169,2 mgDQO/L; 70,2 mgDBO₅/L; 3,51mgN/L;0,70 mgP/L en la relación (100:5:1). 0,7 mgN/L;0,5mgP/L en la relación (100:1:0,2)

Valores son el promedio de tres experimentos batch. Las diferencias entre los valores observados es menor que el 5% en todos los casos.

En los reactores batch inoculados con lodo proveniente del sistema de tratamiento de aguas servidas (MAS) a una concentración de 5gSSV/L (Figura 7) con la mayor concentración de dosificación de nutrientes (100: 5: 1), se evidenció reducción de materia orgánica, con un rango entre 80,68 – 132,8 mgDQO/L con una eficiencia de eliminación de 38,88 %, y una reducción al utilizar la relación (100: 1: 0.2) entre el rango de 98,43 – 132,8 mgDQO/L, con una eficiencia de eliminación de 25,43 % durante 7 días.

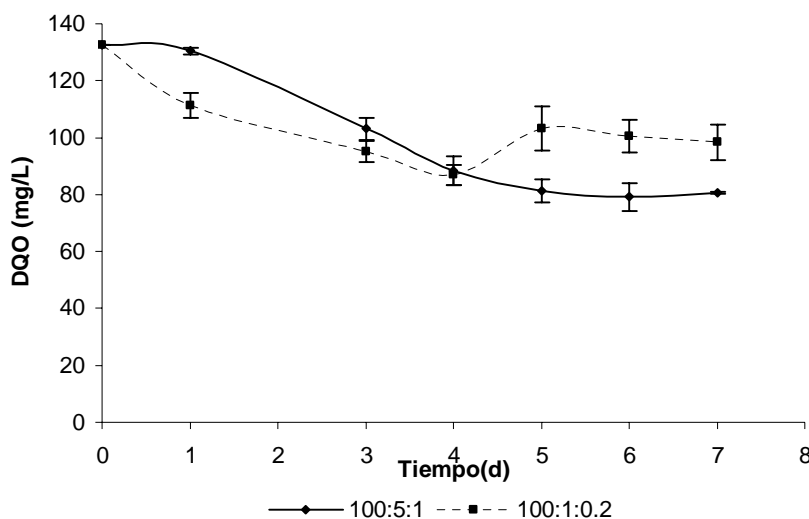


Figura 7: Evolución de la DQO utilizando lodo de MAS a una concentración de 5 gSSV/L

En la Tabla 5 se muestra los resultados de biodegradación utilizando 5gSSV/L proveniente de MAS obteniéndose la mayor eficiencia de eliminación de materia orgánica con la relación de 100: 5: 1-

Tabla 5: Biodegradación utilizando lodo de MAS con una concentración de 5gSSV/L

Parámetro	100:5:1	100:1:0.2
pH	7,5	7,7
DQO (mg/L)	80,68	98,43
DBO ₅ (mg/L)	25,53	30,64
Nitrógeno total (mg/L)	1,26	-
Fósforo total (mg/L)	1,05	-
Eliminación de DQO (%)	38,88	25,43
Eliminación de DBO ₅ (%)	59,23	48,73

Condiciones iniciales: pH 7,2; 132mg DQO/L; 65,62mg DBO₅/L.

Valores son el promedio de tres experimentos batch. Las diferencias entre los valores observados es menor que el 5% en todos los casos

4.3 Cinética de crecimiento microbiano

Durante el tiempo de operación de los reactores batch, se monitoreo el aumento de la concentración de la biomasa bacteriana proveniente de PAS, a través de la determinación indirecta de la concentración de proteínas utilizando el método de Lowry, frente a las distintas relaciones de nutrientes estudiadas (100: 5: 1 y 100: 1: 0,2). En la Figura 9, se observa la evolución de la biomasa midiendo la concentración de proteínas durante 7 días, con una concentración de biomasa de 2,5 g SSV/L. En los sistemas de mayor concentración de nutrientes 100: 5: 1, se evidencia un aumento lineal de la concentración de proteínas hasta el día 5, a diferencia de la relación 100:1:0,2 en donde la cinética de crecimiento de la biomasa no es exponencial la cual podría deberse a la carencia de nutrientes N y P los cuales son necesarios para la formación de nueva biomasa bacteriana, además se presentan los blancos que constan de lodo biológico sin efluente como sustrato (BL.lodo). Una estimación de los requerimientos de N y P está basado en la determinación de los sólidos suspendidos volátiles del licor de mezcla (SSVLM) que contienen aproximadamente 12% de su peso seco como N y 2% como P (Ramalho,1991). La concentración de proteínas representa entre el 40-60% del peso seco de la biomasa bacteriana.

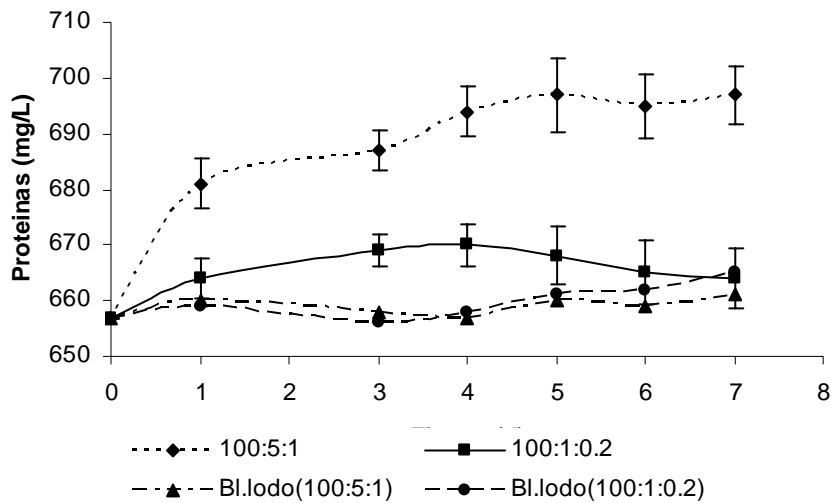


Figura 9: Evolución de la concentración de proteínas a una concentración de 2,5g SSV/L

Se estudió el comportamiento del aumento de la concentración de proteínas durante 13 días, con una concentración de biomasa bacteriana en peso seco de 5 gSSV/L, como se evidencia en la Figura 10.

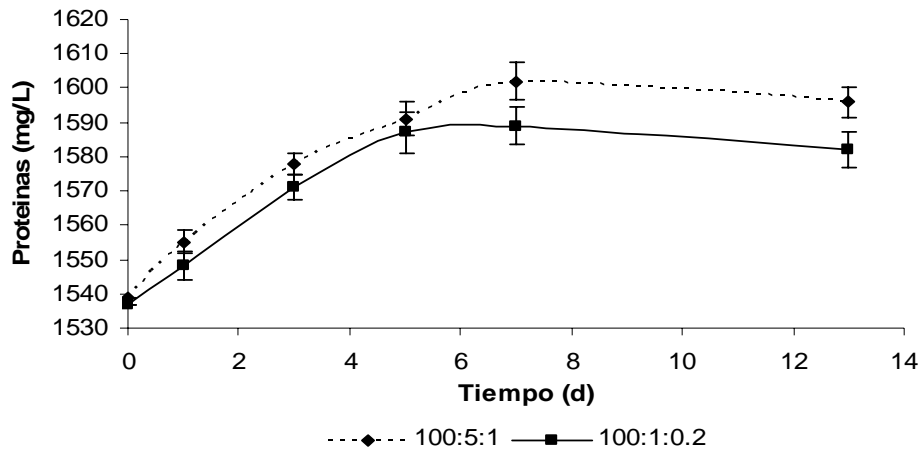


Figura 10: Evolución de la concentración de proteínas a una concentración de 5 gSSV/L

4.4 Obtención de parámetros cinéticos

Se evaluaron los parámetros cinéticos del lodo proveniente de PAS y MAS en relación a la dosificación de nutrientes. La concentración de sustrato, que es la materia orgánica del efluente de celulosa se determina mediante la DQO y la concentración de microorganismos mediante la determinación de proteínas en la biomasa bacteriana, a intervalos de tiempo seleccionados mediante extracción de muestras para su análisis, lo que permite determinar las constantes cinéticas como μ_m y K_s (Ramalho, 1996), como se determina a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros cinéticos de lodos de PAS utilizando la relación de nutrientes 100:5:1

Tiempo (d)	DQO (mg/L)	Proteínas (mg/L)	$\ln(X/X_0)$	μ	1/S	1/ μ	$Y_{x/s}$
0	300,8	657	0,000	0,000	0,003	0,000	
1	289,4	681	0,036	0,036	0,003	27,778	0,148
3	216,8	687	0,045	0,015	0,005	66,667	
4	195,4	694	0,055	0,014	0,005	71,429	
5	181,225	697	0,059	0,012	0,006	83,333	
6	179,125	695	0,056	0,009	0,006	111,111	
7	180,84	697	0,059	0,008	0,006	125,000	

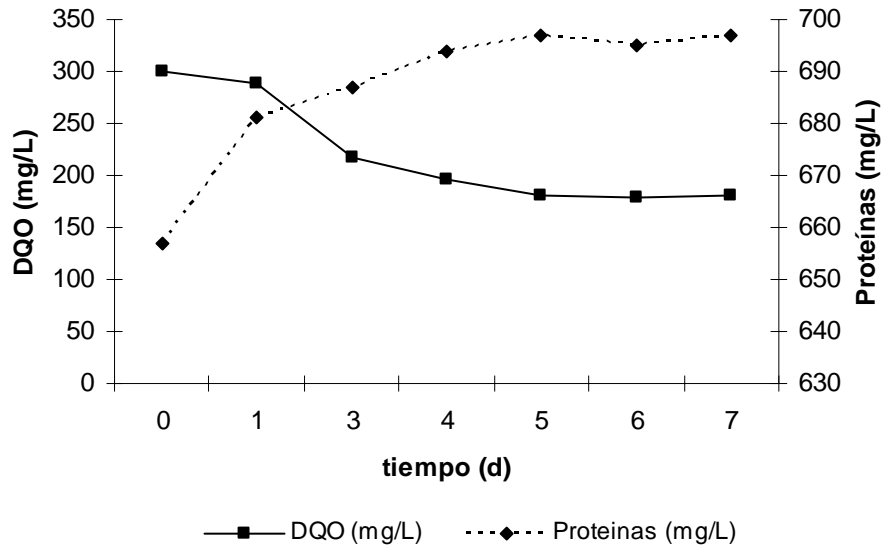


Figura 11: Evolución de la DQO y proteínas utilizando la relación 100:5:1 con inóculo de PAS

Las constantes cinéticas μ_m que es la velocidad específica máxima de crecimiento y K_s la constante de saturación o afinidad del microorganismo por el sustrato, se evalúan a partir de una linealización del tipo Lineweaver-Burk mediante una representación de $1/u$ frente a $1/S$ la cual se gráfica a continuación.

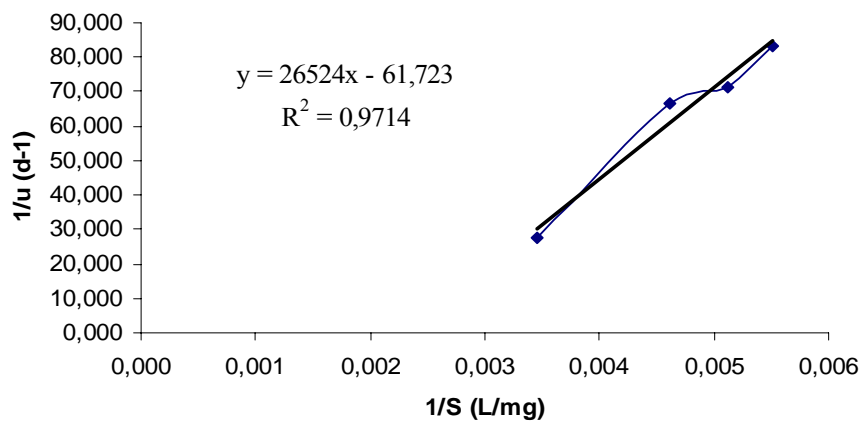


Figura 12: Linealización obtenidos de la relación 100:5:1 utilizando lodo de PAS

Tanto la velocidad de crecimiento máximo (μ_{max}) como la constante de saturación (K_s) se obtienen de la linealización de $1/u$ frente a $1/S$.

$$1/u_{max} = 61,723$$

$$K_s/u_{max} = 26524$$

$$u_{max} = 0,0162 \text{ (d}^{-1}\text{)}$$

$$K_s = 429,68 \text{ (mg/L)}$$

Tabla 7: Parámetros cinéticos de lodos de PAS utilizando la relación de nutrientes 100:1:0.2

Tiempo (d)	DQO (mg/L)	Proteínas (mg/L)	$\ln(X/X_0)$	μ	1/S	1/ μ	$Y_{x/s}$
0	132,700	657	0	0	0,008	0	0,319
1	111,250	663	0,040	0,040	0,009	25	
3	95,150	669	0,050	0,017	0,011	60	
4	86,900	670	0,065	0,016	0,012	61,538	
5	103,175	667	0,049	0,009	0,009	102,040	
6	100,500	665	0,052	0,009	0,009	115,384	
7	98,430	663	0,056	0,008	0,010	125,000	

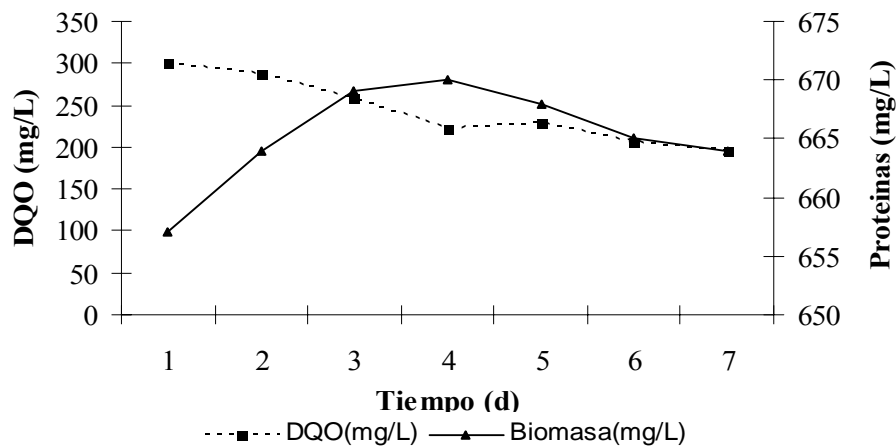


Figura 13: Evolución de la DQO y proteínas utilizando la relación 100:1:0,2 con inoculo de PAS

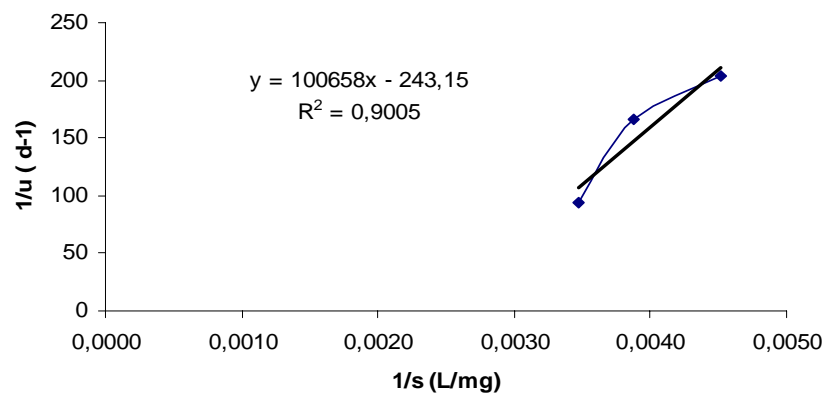


Figura 14: Linealización obtenidos de la relación 100:1:0.2 utilizando lodo de PAS

Los parámetros cinéticos obtenidos en la experiencia utilizando una relación de dosificación de nutrientes 100:1:0.2, a partir de la linealización de $1/u$ frente a $1/S$, son los siguientes:

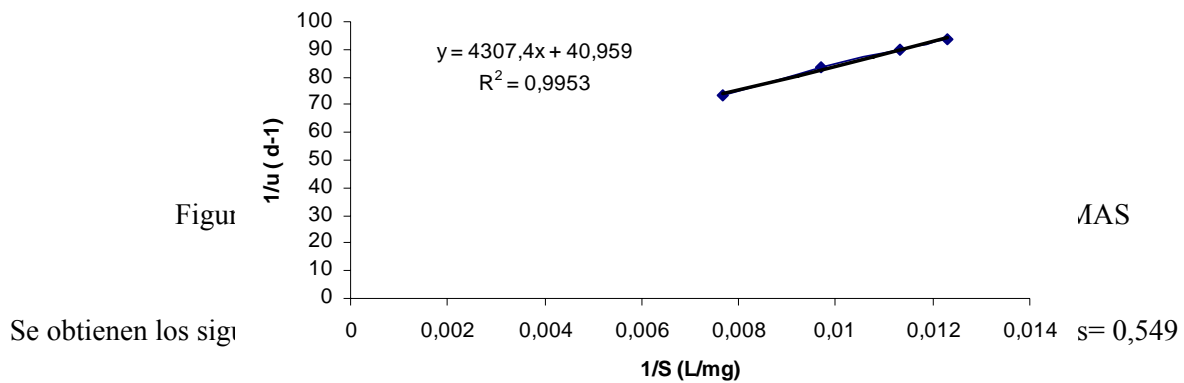
$$1/\mu_{\max} = 243,15$$

$$K_s/\mu_{\max} = 100658$$

$$\mu_{\max} = 0,0041(\text{d}^{-1})$$

$$K_s = 413,97 \text{ (mg/L)}$$

Con respecto a los parámetros cinéticos obtenidos de lodos proveniente de MAS se muestra la linealización de los datos en la figura 15 y 16.



Se obtienen los sigi

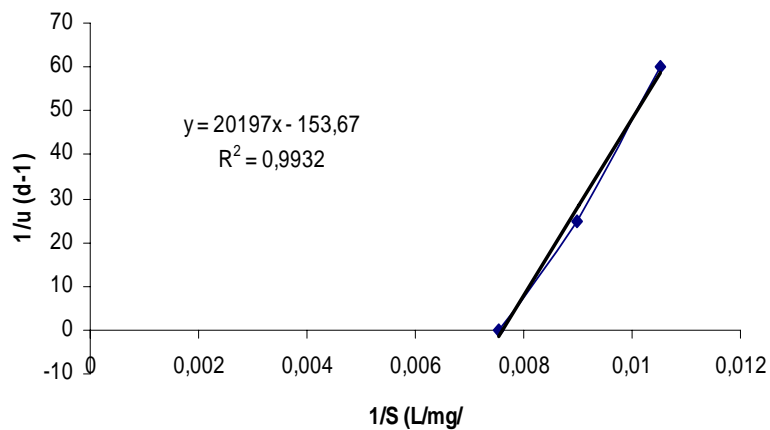


Figura 16: Linealización obtenidos de la relación 100: 1:0,2 utilizando lodo de MAS

Se obtienen los siguientes parámetros cinéticos $\mu_{\max} = 0,0065(\text{d}^{-1})$; $K_s = 131,43 \text{ (mg/L)}$; $Y_{x/s} = 0,905$

En la tabla 8 se resumen las constantes cinéticas que han sido determinadas para las relaciones de dosificación estudiadas con lodos provenientes de plantas de tratamiento de papelera (PAS) y de aguas servidas (MAS)

Tabla 8: Constantes cinéticas obtenidas del modelo de Monod

Origen de la biomasa bacteriana	DBO ₅ :N:P	K _s (mg/L)	μ _{max} (1/d)	Y _{x/s}
	100:5:1	429,68	0,0162	0,148
Biomasa bacteriana de lodo PAS	100:1:0,2	413,97	0,0041	0,319
	100:5:1	105,16	0,0244	0,549
Biomasa bacteriana de lodo MAS	100:1:0,2	131,53	0,0065	0,905

4.5 Actividad heterotrófica de la biomasa bacteriana

La Tabla 9, muestra la actividad específica de la biomasa bacteriana utilizada en los ensayos en batch. Se determinó tanto la actividad heterótrofa como nitrificante utilizando como sustrato acetato de sodio y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y NaNO_2 , respectivamente. Mediante los ensayos respirométricos se detectó actividad bacteriana con los 3 tipos de sustratos utilizados, presentando una mayor velocidad de utilización de oxígeno (VUO) y actividad total, los ensayos en los cuales se suministró acetato, con valores de 0,131 $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ y 0,04 $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$, respectivamente. En el caso de los otros sustratos adicionados, el CNO obtenido fue ligeramente inferior con valores de 0,035 $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ para los ensayos realizados con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y de 0,029 $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ para los ensayos realizados con NaNO_2 . El mismo comportamiento se presentó con la determinación de la actividad total en donde la razón de respiración es proporcional a la cantidad de microorganismos, presentándose valores de 0,125 $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$ ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) y 0,093 $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$ (NaNO_2). Se evaluó la actividad heterotrófica del lodo a inocular en el sistema continuo MBBR, proveniente de la industria de papelera encontrándose una mayor VUO de 0,212 $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ con una actividad heterotrófica específica al suministrar 100 μl efluente de 0,106 $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$

Tabla 9: Parámetros cinéticos obtenidos a partir de ensayos respirométricos

Muestras	VUO $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$	CNO $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$	Actividad total $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$	Actividad específica $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$
L	0,090	0	0,090	0
LA	0,131	0,040	0,131	0,040
LAm	0,125	0,035	0,125	0,035
LN	0,093	0,029	0,093	0,029

L: lodo; A: acetato; Am: sulfato de amonio; N: nitrito de sodio; VUO: Velocidad de utilización de oxígeno; CNO: Consumo neto de oxígeno

4.6 Recuento viable y acumulación de PHA por la biomasa bacteriana

Con el fin de evaluar la acumulación de PHA v/s concentración de biomasa bacteriana viable se realizó un recuento total de las células vivas y muertas teñidas mediante tinciones específicas. Las células intactas aparecen verdes debido a la tinción SYTO 9 tinción de ácidos nucleicos y las células permeables, que es la pérdida de la integridad de la membrana, la tinción ioduro de propidio ingresa a la célula mostrando el color rojo. Se consideraron 10 campos de visualización, en la figura 15 se muestra un campo de visualización del filtro con bacterias vivas y muertas.

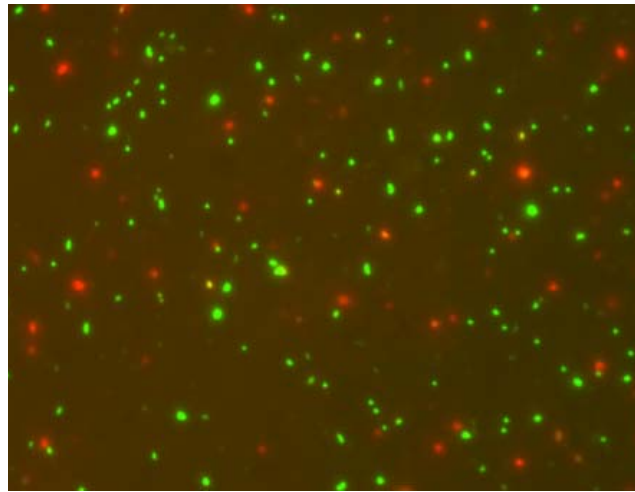


Figura 17: Visualización de células vivas y muertas presentes en el reactor

Tabla 10: Recuento celular mediante microcopia de epifluorescencia

Campos	Recuento (Células/ml)	
	Vivas	Muertas
1	$6,0 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$
2	$5,8 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$
3	$5,1 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$
4	$6,4 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^6$
5	$4,4 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$
6	$3,8 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$
7	$5,4 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$
8	$6,4 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$
9	$5,2 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$
10	$4,6 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$

En la tabla 10 se evidencia el recuento de células vivas y muertas de una muestra de 1 mL de lodo, obteniéndose en promedio $5,3 \cdot 10^6$ células vivas y $3,2 \cdot 10^6$ células muertas.

La muestra se obtuvo de la biomasa suspendida del reactor MBBR, operado con un TRH de 2 días y una VCO $0,235 \text{ gDQO/L}\cdot\text{d}$ e inoculado con una concentración de biomasa bacteriana de $3,2 \text{ gSSV/L}$.

Se evaluó la cinética de acumulación de PHA tanto del inóculo bacteriano proveniente del lodo de PAS (figura 16), y de MAS (figura 17) bajo variaciones en la dosificación $\text{DBO}_5\text{:N:P}$ durante 13 días de operación, previa tinción de la muestra con rojo de Nilo y cuantificadas mediante espectrofluorometría a una longitud de onda de excitación entre 290 nm y a un máximo de emisión entre 570nm y 605 nm. Se obtuvieron muestras de 1 ml del reactor con el fin de evaluar la acumulación de PHA v/s recuento de células viables, en el caso de la acumulación de PHA utilizando lodo de PAS se obtuvo el máximo de acumulación al quinto día de operación utilizando la relación de dosificación de nutrientes 100:1:0.2, corroborando que la limitación de nutrientes N y P con respecto a la fuente de carbono, resulta en una alta acumulación de PHA, luego se evidencia una disminución de la acumulación de PHA. En el gráfico se presenta el comportamiento del experimento control, en el cual el lodo microbiano es inoculado en ausencia de efluente de celulosa kraft como fuente de carbono, evidenciándose una disminución de la intensidad de fluorescencia. La cinética de acumulación de PHA, evidencia el mismo comportamiento al utilizar lodo proveniente de MAS, sin embargo el máximo de acumulación de PHA se encuentra al tercer día de operación en batch, utilizando la relación de dosificación de nutrientes 100:1:0.2n del gránulo de PHA.

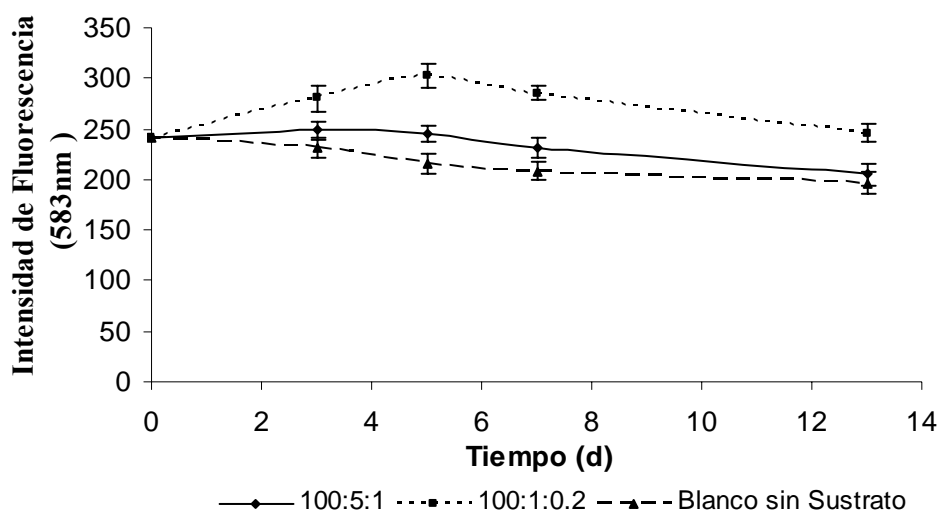


Figura 18: Cinética de acumulación de PHA utilizando lodo proveniente de PAS

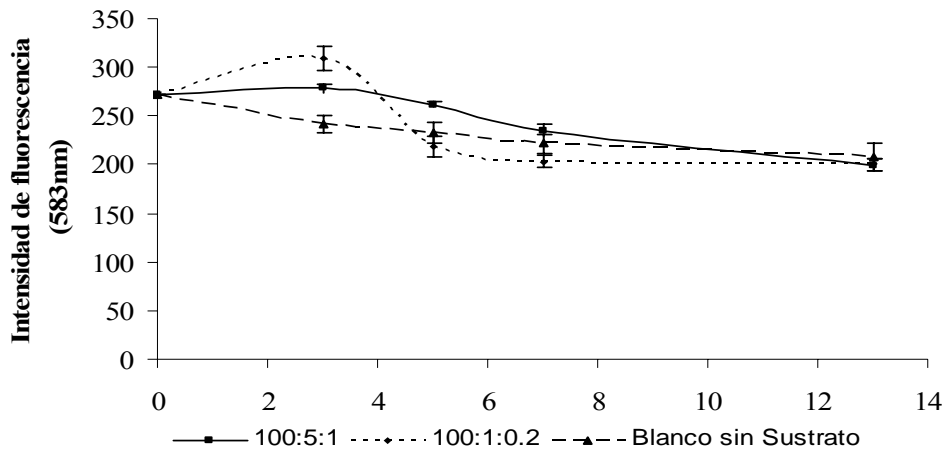


Figura 19: Cinética de acumulación de PHA utilizando lodo proveniente de MAS

4.7 Biodegradación de compuestos específicos

En la Figura 20, se observa la evolución de los compuestos aromáticos, utilizando ambas relaciones de nutrientes en la dosificación, el comportamiento de la degradación es similar, con idéntico rango de concentración (0,07 – 0,09 mg/L). El mismo comportamiento se observa para los compuestos lignosulfónicos (Figura 21) con concentraciones que fluctúan entre 0,01 – 0,03 mg/L y 0,01- 0,02 mg/L, correspondiendo a la relación de 100: 5: 1 y 100: 1: 0,2, respectivamente. Las ligninas (Figura 22 y Figura 23), cuyas concentraciones se midieron tanto en el UV_{272} como también en el UV_{280} , se obtienen para ambas relaciones de nutrientes, valores entre 0,05 – 0,07 mg/L.

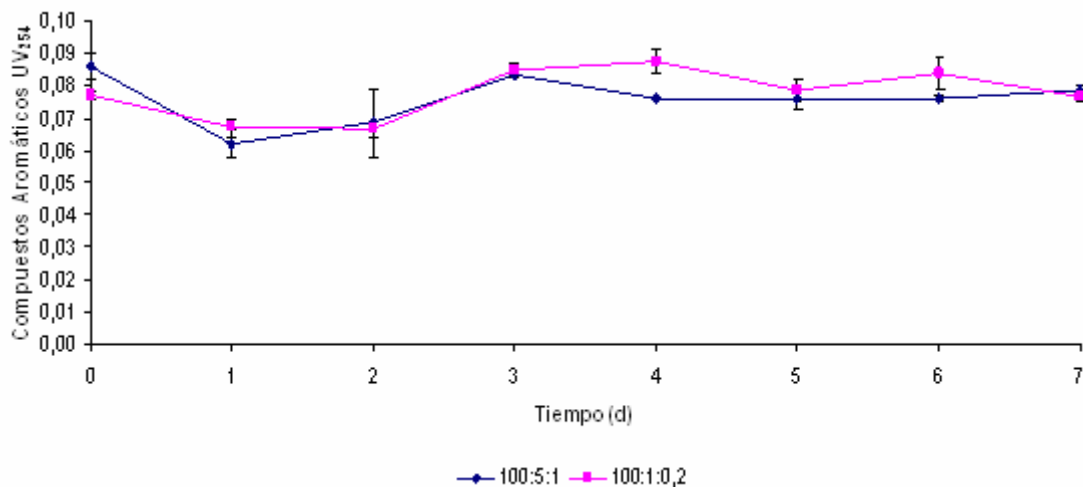


Figura 20: Evolución de los compuestos aromáticos durante 7 días de operación batch

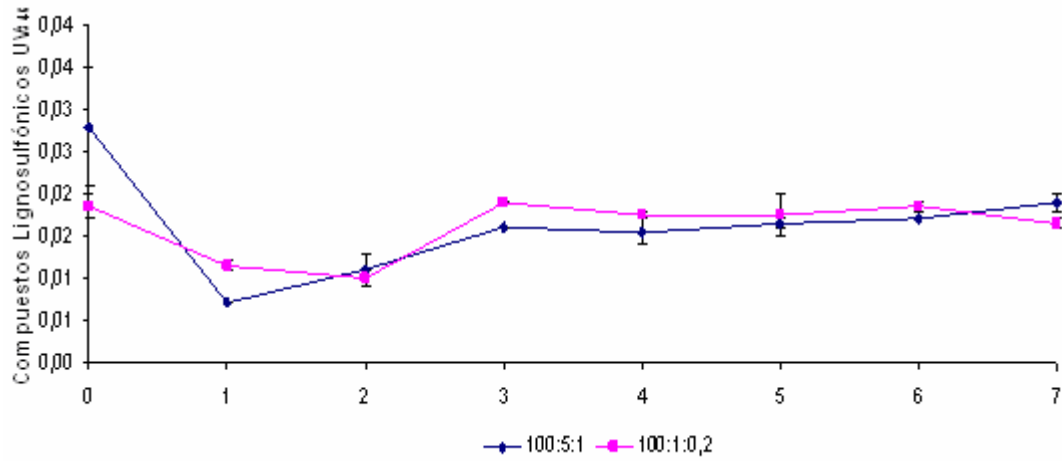


Figura 21: Evolución de los compuestos lignosulfónicos durante 7 días de operación batch

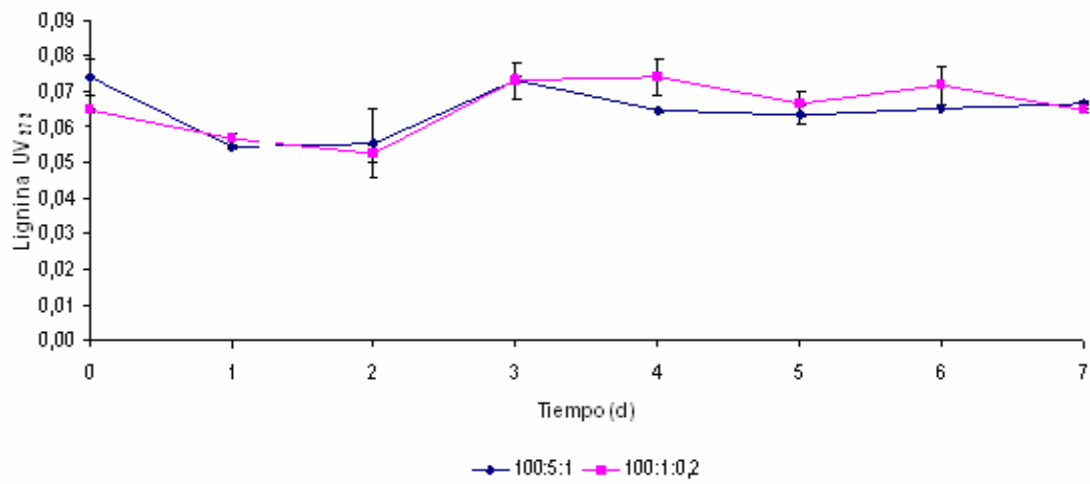


Figura 22: Evolución de la Lignina UV₂₇₂ durante 7 días de operación batch

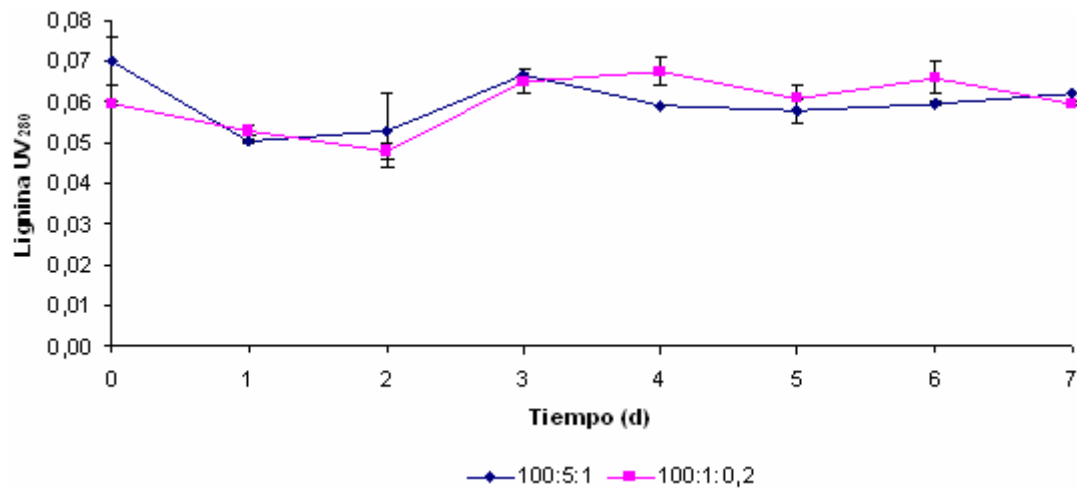
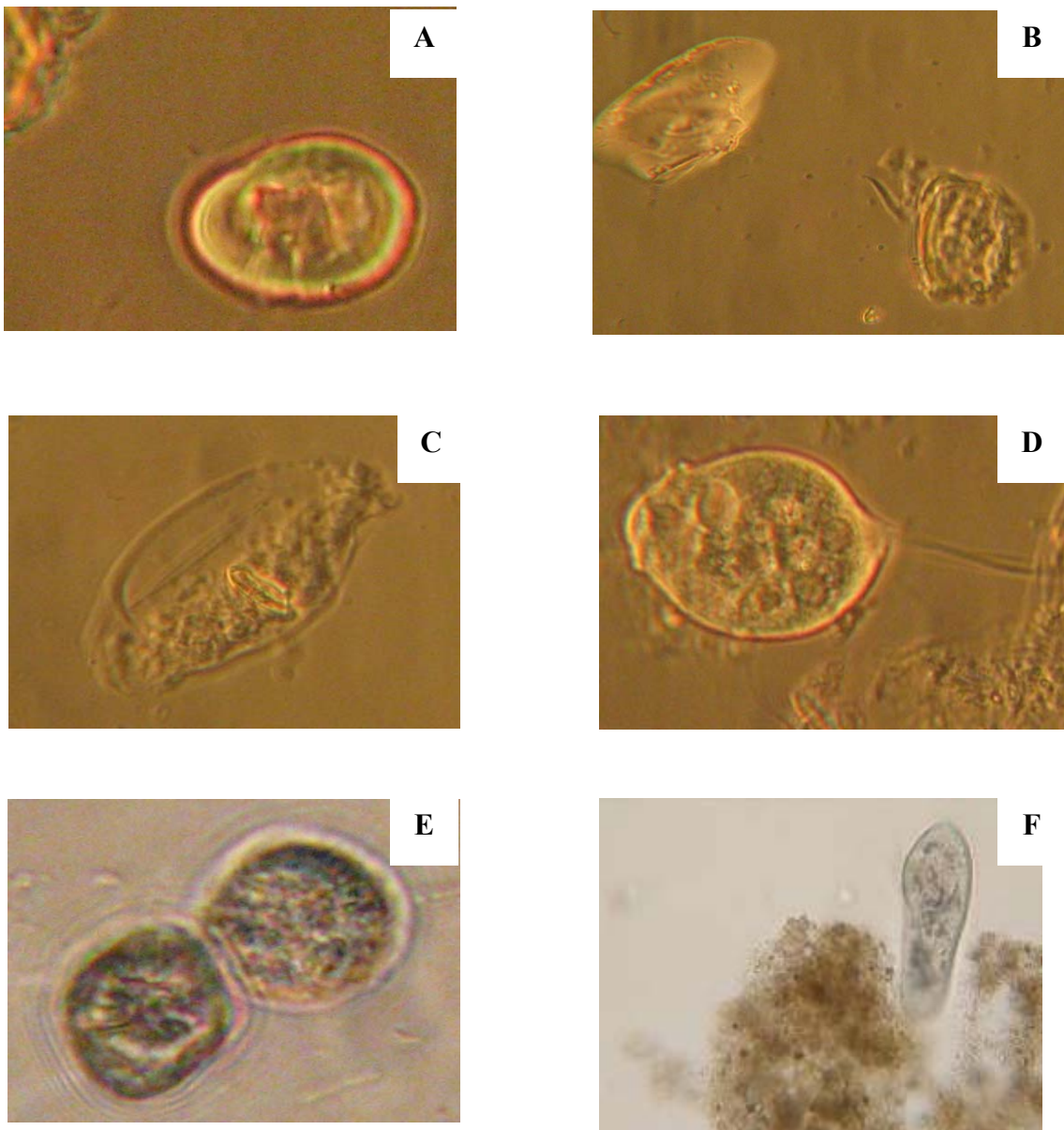


Figura 23: Evolución de la Lignina UV₂₈₀ durante 7 días de operación batch

4.8 Caracterización microscópica del lodo

A partir de la evaluación de las poblaciones de biomasa pluricelular es posible evaluar la calidad del lodo que trata estos vertidos como también aspectos de operación del reactor como lo es la carga orgánica o determinadas condiciones ambientales del sistema en ese momento. En la imagen A y D se visualizan ciliados nadadores del género *Holophrya*, en la imagen B y C se observan protozoos de la especie *Aspidisca costata*. La imagen E muestra el protozoario Arcella y la imagen F presenta al protozoo holótrico *Paramencium caudatum*

Figura 24: Caracterización microscópica de la biomasa pluricelular



4.9 Operación del reactor continuo MBBR

Se evaluaron las condiciones operacionales óptimas en la operación del reactor continuo, para el TRH de 2 días. En la Figura 25 se muestra el comportamiento de la relación A/M y su relación con la eficiencia de eliminación de la DBO₅. Los resultados obtenidos, mostraron la tendencia de la biomasa suspendida presente en el sistema, a comportarse como un lodo disperso para TRH de 2 días, con eficiencia de eliminación entre 70-80%. Los rangos óptimos de la relación A/M están entre 0,3 y 0,6 gDBO₅/gSSV·d para la formación de un lodo operación para lograr la formación de lodo floculante (Ramalho,1996)

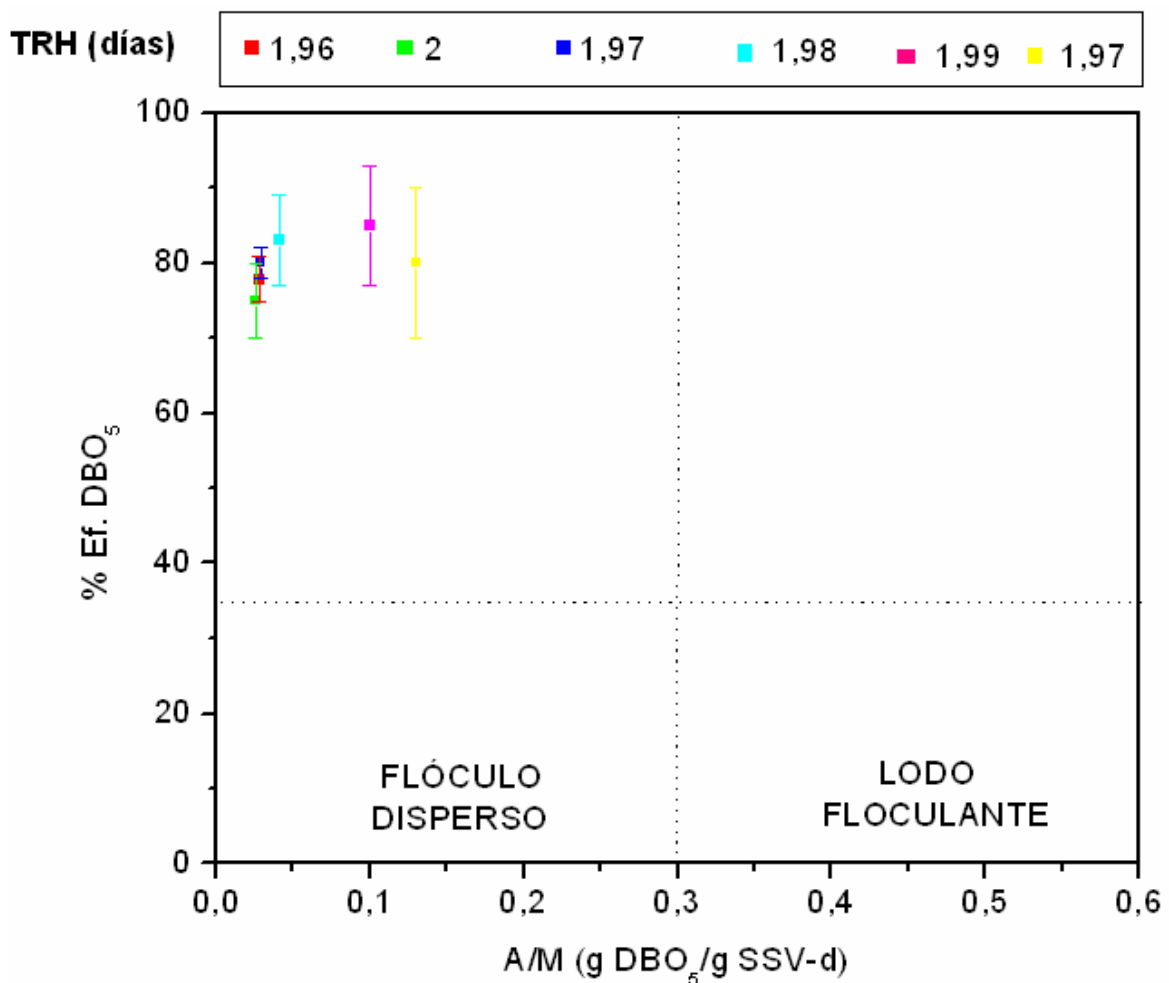


Figura 25: Efecto de la variación A/M en la eliminación de DBO₅ a un TRH de 2 días

La figura 26, muestra la relación entre el IVL y la relación A/M, observándose, que para un TRH de 2 días la sedimentabilidad de la biomasa suspendida medida como IVL, no se encontró dentro del rango óptimo de operación, el cual es 35 a 135 mL Sol.Sed/g SSV (Ramalho,1996)

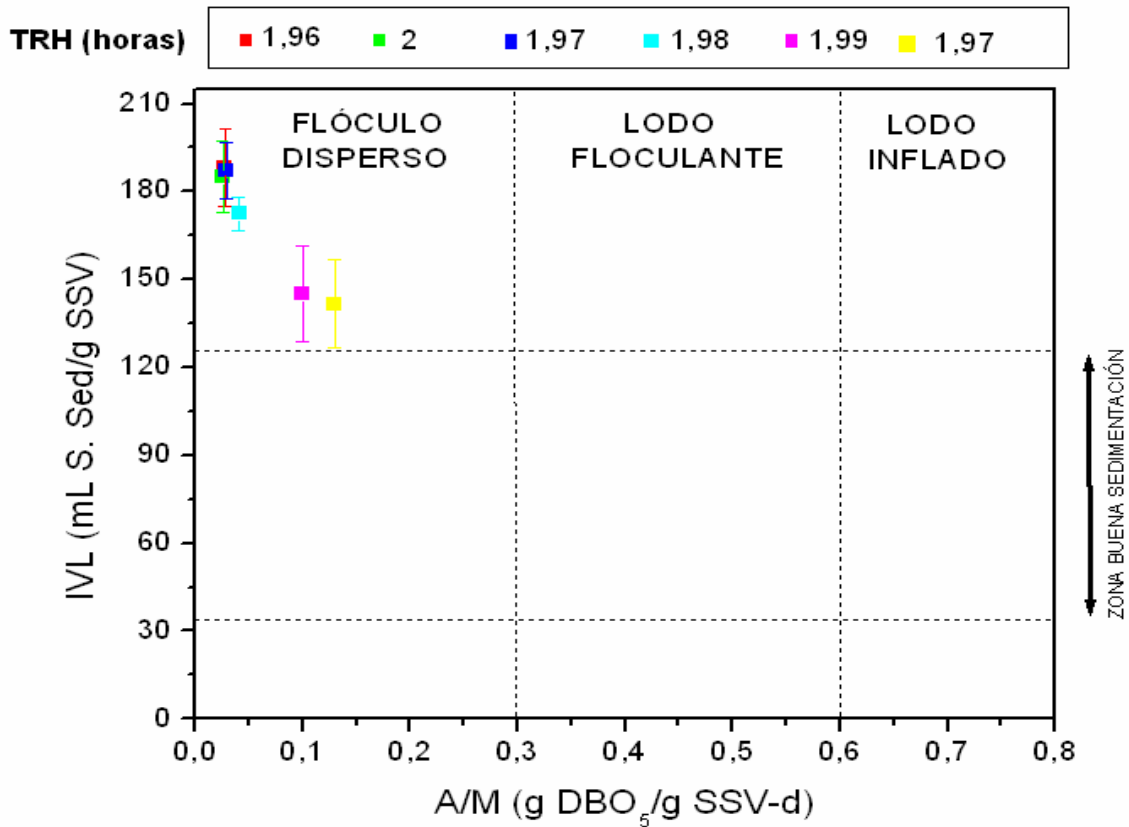


Figura 26: Relación entre el IVL y la razón A/M

En la figura 27 se muestra la acumulación de PHA a un TRH de 2 días. En la figura 28 se evalúa la acumulación de PHA en comparación a cultivos microbianos puros como los de la cepas *Sphingopyxis chilensis* S37 cepa acumuladora de PHA y *Escherichia coli* K12 cepa no acumuladora de PHA.

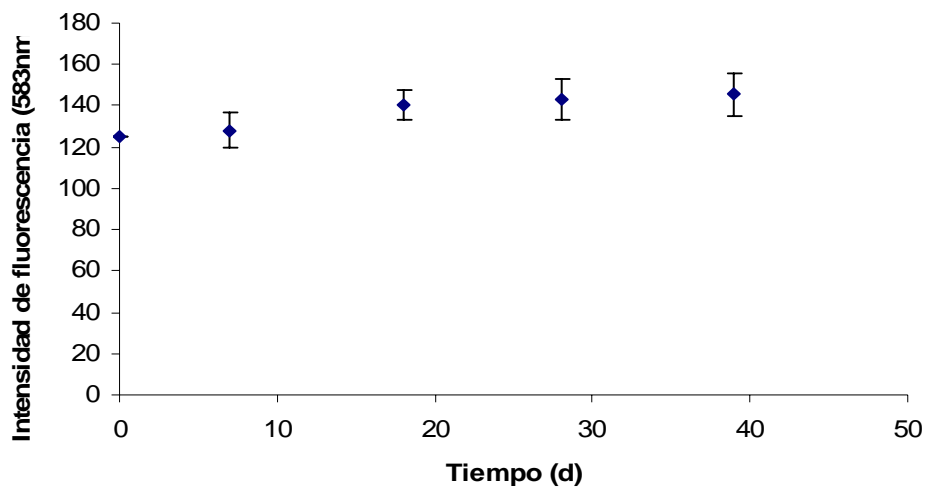


Figura 27: Acumulación de PHA a TRH de 2 días

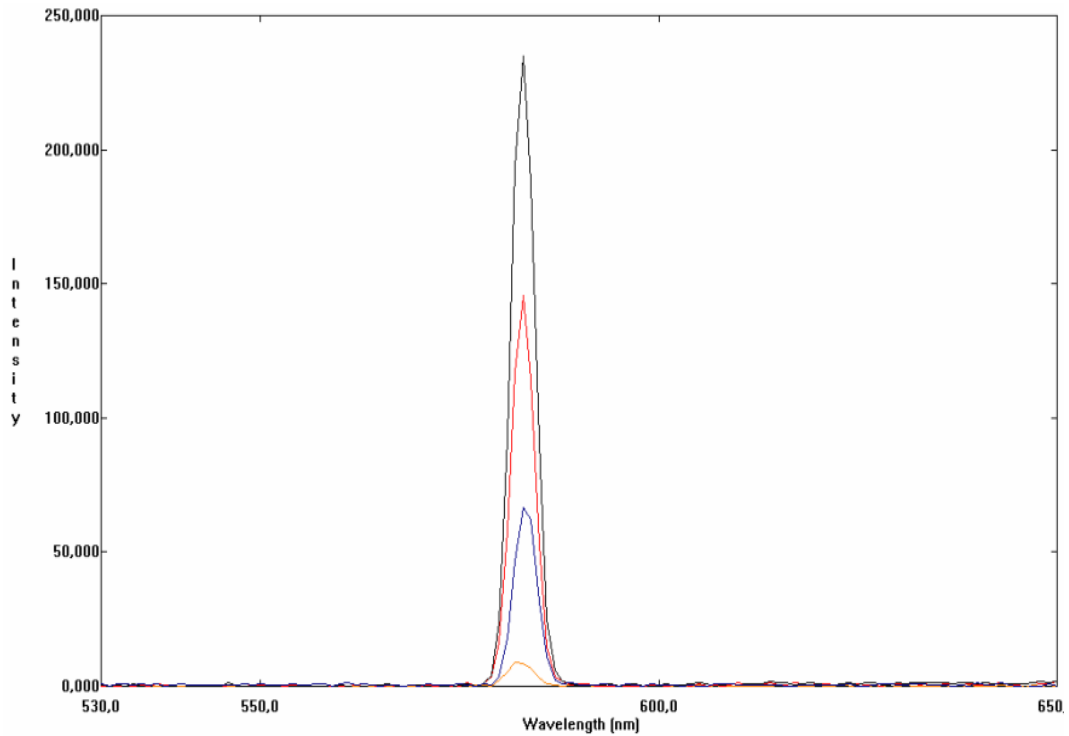


Figura 28 Comparación de la acumulación de PHA mediante espectrofluorimetría.

El control positivo *Sphingopyxis chilensis* S37 (espectro de absorción negro) el control negativo *Escherichia coli* K12 (espectro de absorción azul), muestra de lodo (espectro de absorción rojo al final del TRH:2d) El eje vertical indica intensidad de fluorescencia relativa relacionada con la acumulación de PHA.

En la figura 23 se muestra la caracterización microscópica pluricelular del lodo al final del TRH de 2 días evidenciándose en mayor proporción rotíferos y ciliados demostrando la buena calidad del lodo microbiano que trata estos vertidos.

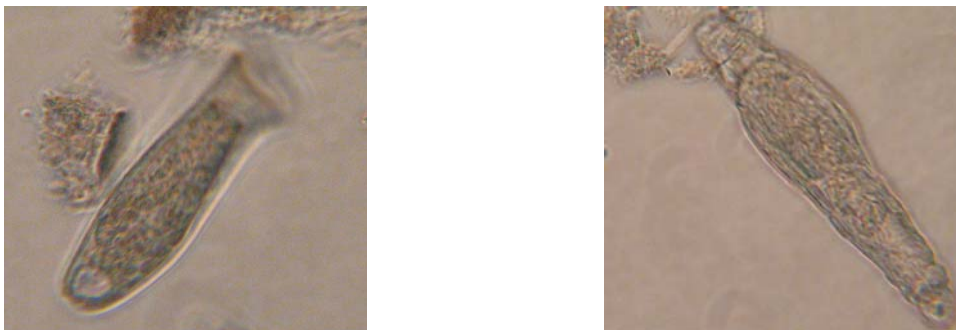


Figura 29 Rotíferos encontrados al final del TRH de 2 días

5 DISCUSION

5.1 Caracterización fisicoquímica del efluente de celulosa kraft

Las caracterización fisicoquímica del efluente de celulosa kraft evidenció que el efluente utilizado no es totalmente biodegradable, como se demuestra con el valor de la razón DQO/DBO₅ de 2,12. El valor de la DBO₅ es indicativo de los compuestos fácilmente biodegradables, compuestos como carbohidratos y ácidos orgánicos. Los bajos niveles de DBO₅ indican poca presencia de compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Los compuestos con alto peso molecular como la lignina no causan DBO₅ pero si una alta DQO y el color oscuro del efluente. El valor del pH no fue necesario ajustarlo debido a que se encuentra entre el rango de 6,6 a 7,2 al ingresar al reactor. La relación DBO₅ : N : P calculada para el efluente de celulosa kraft sin tratar 100: 0,75: 0,25 indica que los niveles de N y P no son suficientes para la operación de reactores que operan en continuo, por lo tanto se debe dosificar con nutrientes (Diez y *col.*, 2002). Bajas concentraciones de nitrógeno (0,9 mgNT/L) y fósforo (0,5 mgPT/L) se evidenciaron en estos efluentes provenientes del procesamiento de maderas de pino radiata, debido a que la composición química de la madera no presenta nitrógeno. La fracción de DQO correspondiente a compuestos fenólicos totales es del 53%, los que se generan de los residuos de lignina que al polimerizar son el principal generador del color de los efluentes de celulosa, sin embargo según el estudio de (Milestone y *col.*, 2004) sugieren que la formación de color se desarrolla en los sistemas de tratamiento biológicos anaeróbicos debido a la presencia de bacterias anaeróbicas presentes en los lodos que utilizan el material orgánico de alta masa molecular como aceptor de electrones para el crecimiento. Esta introducción de electrones provoca la reducción del material orgánico generándose polimerizaciones intramoleculares o formación de grupos funcionales cromofóricos, que aumentan el color del efluente, fenómeno que no debiese ocurrir en reactores aeróbicos.

5.1 Biodegradación del efluente de celulosa kraft en sistemas discontinuos o batch

Se evidenció que la cinética de biodegradación de materia orgánica del efluente para los sistemas implementados con la menor relación de nutrientes 100: 1: 0,2, tanto al utilizar lodo de PAS y MAS existe una tendencia lineal de degradación, sin embargo luego se genera un aumento de carga orgánica, la cual podría deberse a la presencia de lisis celular en los sistemas, producto de la disminución de algún nutriente esencial para la célula, ya sea carbono, nitrógeno u fósforo, efecto que no se evidencia al utilizar la relación de nutrientes 100: 5: 1. Se han realizado estudios de reducción de la DQO en sistemas de tratamiento aeróbicos de tipo continuo, obteniendo reducciones entre 25 % y 65% de la DQO (Diez y *col.*,

2002). Según los resultados obtenidos en este estudio, las dos relaciones de nutrientes estudiadas se encuentran dentro de este rango pero se debe considerar que son valores obtenidos en un sistema de tipo discontinuo por lo cual su óptimo funcionamiento podría verse alterado por problemas de evaporación del medio líquido y concentración de compuestos, entre otros. El ensayo de biodegradabilidad realizado en sistemas batch por (Diez y col., 2002) durante 7 días con la relación 100:5:1, evidenció reducción de DQO hasta aprox. 40% lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta experiencia. La cinética de biodegradación presenta el mismo comportamiento con un tiempo de 13 días de operación, disminuyendo después del día 7, la degradación, la carencia de nutrientes provoca lisis celular, que se evidencia por el aumento de la carga orgánica. Según el estudio de (Liu y Liss, 2007), en que evalúan el impacto de reducir los niveles de fósforo durante el tratamiento biológico de efluentes de celulosa, desde una relación 100:5:1 a 100:5:0,1 demuestran que no existen efectos significativos en la eliminación de DQO tanto a 4°C y 27°C, como también en el aumento de la concentración de SSV, además en este estudio se evidencia que la menor dosificación de fósforo mejora la sedimentabilidad del lodo bajo condiciones de temperatura bajas. Sin embargo se ha evidenciado en otras publicaciones como (Slade y col., 2004) que la limitación de nutrientes se asocia a problemas operacionales como bulking del lodo y pobre separación de sólidos, como también disminución de la eliminación de materia orgánica, lo que concuerda con los resultados obtenidos. Como se evidencia en las cinéticas de degradación no existen efectos significativos en la biodegradación al utilizar lodo proveniente de la planta de tratamiento de efluentes de papelera (PAS) como en la de aguas servidas (MAS) con lo cual se demuestra que no existe una aclimatación del inóculo a los compuestos específicos del efluente de celulosa kraft.

5.3 Cinética de crecimiento microbiano

Se evaluó el efecto de la concentración de nutrientes en el aumento de la concentración de biomasa, a partir de la cuantificación de proteínas en el tiempo. Se determinó que a menor dosificación de N y P se evidencia un menor aumento de la concentración de proteínas, lo que se explica porque los microorganismos presentes en el lodo son incapaces de obtener suficientes nutrientes para la actividad celular y enzimática, resultando en la limitación de su crecimiento y en el aumento de la biomasa. Estos resultados se corroboran con la biodegradación del efluente en que la capacidad de metabolizar los contaminantes orgánicos se ve reducida. Además de afectar el crecimiento microbiano la deficiencia de nutrientes genera cambios en los perfiles de especies bacterianas presentes en el lodo lo que no fue evaluado en esta tesis. A través de la utilización de experimentos control en donde no se suministró efluente como fuente de carbono y tampoco se dosificó con nutrientes el sistema se demostró que no existió un aumento de la concentración de proteínas durante el tiempo de operación batch. Estos resultados también son descritos por (Madigan y col., 2003) en donde se menciona que la concentración

de nutrientes afectan la velocidad de crecimiento y a la producción de microorganismos. A concentraciones muy bajas de un nutriente determinado la velocidad de crecimiento disminuye debido probablemente a que el nutriente no se transporta al interior de la célula lo suficientemente rápido como para satisfacer la demanda metabólica.

5.4 Obtención de parámetros cinéticos en sistemas discontinuos o batch

A partir de los datos obtenidos de la cinética de degradación de la materia orgánica en el sistema que se realizó mediante la determinación de la DQO y con el conocimiento del aumento de la concentración de proteínas como una medida indirecta del crecimiento de la biomasa, se determinaron la velocidad específica máximo de crecimiento (μ_{\max}) y la constante de saturación o afinidad por el sustrato (K_s) a partir de la ecuación de Monod desde datos de cultivo en batch, siguiendo del procesamiento de los datos con la ecuación Lineweaver-Burk y utilizando regresión lineal, considerando sólo los valores que siguen un crecimiento lineal en el tiempo. Los resultados demostraron que el inóculo bacteriano proveniente de PAS presenta una mayor K_s , por lo tanto mayor afinidad por el efluente de celulosa que el inóculo proveniente de MAS.

También es posible evaluar que para la relación con menor dosificación de nutrientes la biomasa bacteriana presente en el lodo proveniente de la industria papelera, requeriría un mayor tiempo de operación (144 días) para lograr el máximo crecimiento en sistemas batch, a diferencia de lo que ocurre con la utilización de una mayor dosificación de nutrientes en donde en 61 días se lograría el máximo crecimiento considerando el valor de u_{\max} obtenido.

Para la menor relación de dosificación de nutrientes el inóculo bacteriano proveniente de MAS requeriría un tiempo de operación de (153,8 días) para lograr el máximo crecimiento a diferencia de utilizar la relación de dosificación 100:5:1 en donde en 40,98 días se logra el máximo de crecimiento.

Con respecto a los resultados de los parámetros cinéticos encontrados, se puede concluir que no existen efectos significativos en la velocidad de crecimiento al utilizar inóculos provenientes desde distintas plantas de tratamiento que tratan efluentes de pulpa y papel como también de aguas servidas, lo que también se corrobora con la actividad heterotrófica presentando valores similares, al utilizar ambos tipos de lodo, evidenciando que ambos tipos de inóculos están aclimatados a los compuestos específicos de la industria de celulosa.

5.5 Actividad heterotrófica de la biomasa bacteriana

Mediante los ensayos respirométricos se detectó actividad metabólica bacteriana con los 3 tipos de sustratos utilizados, presentando un mayor consumo neto oxígeno (CNO) y actividad total, los ensayos en los cuales se suministro CH_3COOH , con valores de 0,04 $\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ y 0,13 $\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{min}$, respectivamente. En el caso de los otros sustratos adicionados, el CNO obtenido fue ligeramente inferior con valores de 0,03 $\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ para $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y NaNO_2 , como sustratos. Mismo comportamiento, presentó la actividad total con valores de 0,12 $\text{mg O}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$ y 0,09 $\text{mg O}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$, para el caso de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y NaNO_2 , respectivamente. Por lo antes mencionado, se concluye que la biomasa bacteriana evidenció mayor actividad heterotrófica, sin embargo existe actividad nitrificante, debido a que la relación C:N no es lo suficientemente alta como para seleccionar sólo el crecimiento de bacterias heterotróficas. Existe una competición entre las bacterias heterótroficas y las nitrificantes por el oxígeno disuelto, el nitrógeno y el espacio, lo que se corrobora en (Richardson,1985) en que se menciona que las heterótroficas biodegradan compuestos orgánicos que son inhibitorios para las nitrificantes. Sin embargo se han evidenciado efectos sinérgicos los que avalan los resultados de las actividades similares obtenidas en la respirometría, por ejemplo, (Furumai y Rittmann, 1992) evidencian que bacterias nitrificantes producen y eliminan productos microbiológicos solubles (PMS) que aumentan el suministro de sustrato para las heterótroficas, siendo éstas las encargadas de proteger a las nitrificantes y mejorar la agregación de ambos tipos microbianos en flóculos y biopelículas.

5.6 Recuento viable y acumulación de PHA por la biomasa bacteriana

A partir del recuento de células vivas y muertas se evidenció que la biomasa bacteriana presente en el lodo que se inoculó al reactor se encuentra en crecimiento estacionario. Las bacterias presentes en el lodo fueron capaces de acumular PHA cuando fueron cultivadas con efluente de celulosa kraft, y se evidenció mayor acumulación con condiciones deficientes de nutrientes al utilizar la relación de dosificación 100:1:0.2 tanto al utilizar lodos provenientes de PAS y MAS, al quinto y tercer día de operación en batch, respectivamente. como una estrategia de sobrevivencia a la inanición (Tobella y col., 2005). Debido al agotamiento de la fuente de carbono presente en el efluente de celulosa existe una degradación de PHA fenómeno conocido como metabolismo cíclico, utilizándose el gránulo de PHA como fuente de carbono y energía para sustentar el crecimiento de la biomasa bacteriana presente en el lodo (Punrattanasin y col., 2006). En el caso de los experimentos control en que la muestra de lodo fue cultivada en ausencia de efluente de celulosa kraft, se evidenció sólo degradación de PHA durante el tiempo de operación, debido a la inexistencia de un sustrato fácilmente biodegradable como fuente de carbono que pudiese ser usado como reserva de carbono a la forma de PHA.

5.7 Biodegradación de compuestos específicos

Durante 7 días de operación en batch, no se evidenciaron efectos significativos en la biodegradación de compuestos específicos producto de la disminución de nutrientes. Sin embargo, en trabajos previos (Chamorro, 2005) en sistemas continuos se evidenció que la eficiencia de eliminación de compuestos específicos (compuestos aromáticos, lignina y sus derivados) es dependiente del TRH y de la proporción de nutrientes produciéndose inestabilidades en el sistema que alteran la degradación, sin embargo al variar sólo la VCO, el sistema es capaz de asimilar este efecto, constituyéndose TRH mayores como amortiguadores y TRH menores, mayor capacidad degradativa. En estudios de eliminación de compuestos específicos de efluentes de celulosa kraft (Villamar y col., 2009) evidenciaron que la mayor eficiencia de eliminación de lignina se obtiene a TRH de 17 horas y utilizando una relación de nutrientes de 100:3:1 en donde se comprueba que el tiempo que permanece el efluente en el reactor como también la dosificación de nutrientes afectan la degradación en sistemas continuos. En este mismo trabajo se observó que al inicio de cada TRH se encontró caída en la eficiencia de eliminación.

5.8 Caracterización microscópica de lodos

Dentro de los microorganismos pluricelulares encontrados en el lodo proveniente de la industria papelera, que se utilizó como inóculo en el reactor MBBR se encontraron protozoos ciliados como *Aspidisca sp* lo cual indica un lodo de buena calidad e indicadores de buenas condiciones de depuración, estos protozoos se caracterizan por habitar reactores biológicos de baja carga, lo cual concuerda con la carga que se utiliza en el primer período de operación de 0,235gDQO/L·d. Se observó la presencia esporádica de *Paramencium caudatum* el cual se asocia con lodos jóvenes y en condiciones con altos niveles de oxígeno.

Como se evidencia los microorganismos que en mayor proporción se encuentran en la muestra de lodo son los protozoos, que son organismos unicelulares que pueden metabolizar tanto materia orgánica solubles como insolubles. Reducen la concentración de bacterias y ayudan a que el efluente sea más claro y de mejor calidad. Se han encontrado que en reactores biológicos de lodos activados, hasta 5.000 protozoos/ml formando parte del 5% del peso seco de los sólidos en suspensión del licor mezcla.

La no evidencia de rotíferos se debe a que en la puesta en marcha y la estabilización del reactor se producen sucesiones en las poblaciones de microorganismos. En la fase inicial dominan las bacterias dispersas y los protozoos que entran con el influente. Al aumentar el número de bacterias, aparecen los

ciliados nadadores libres, luego los flóculos se van formando y disminuye el número de bacterias libres y de protozoos flagelados. Se desarrollan los ciliados pedunculados y reptantes con estructuras bucales eficaces para la captura de alimento, estos acaban por desplazar a los ciliados nadadores. Más tarde, aparecen los metazoos por encontrarse en el final de la cadena.

5,9 Operación del reactor continuo MBBR

Durante el TRH de 2 días se evidenció que el lodo se presenta en forma de flóculo disperso lo que se debe a la relación A/M muy baja debido a la carga orgánica alimentada al sistema. Se ha demostrado en el estudio de Tsang, y col., 2006 que el IVL del lodo con presencia de bacterias filamentosas que generan la baja sedimentabilidad, puede cambiar rápidamente, mientras que en lodos no filamentosos este parámetro tiende a mantenerse constante, sin embargo la baja sedimentabilidad no sólo está asociado a crecimiento de bacterias filamentosas Diez y col. 2002 atribuye malas características de sedimentabilidad a un desbalance en la dosificación de nutrientes en la relación $DBO_5:N:P$ en el influente. Se ha evaluado el IVL para sistemas MBBR operados con TRH de 3 a 7,2 horas, del orden de 10 a 200 mL S.Sed/g SSV (Malmqvist y col., 2006) el cual es afectado, cuando se duplica la carga orgánica demostrando la influencia del TRH en la sedimentabilidad.

En el reactor continuo se evaluó la acumulación de PHA al TRH de 2 días mostrando una cinética de acumulación constante, sin embargo en comparación a la cepa bacteriana pura *Sphingopixis chilensis* S37 que acumula PHA se obtienen valores inferiores evidenciando que la carga orgánica no es suficiente para lograr una alta producción de PHA a partir de efluentes de celulosa kraft.

6 CONCLUSIONES

-En sistemas batch que operan con concentraciones de 2,5 y 5 gSSV/L la incidencia de disminuir la dosificación de nutrientes no afecta en forma significativa en la degradación de materia orgánica y en la cinética de crecimiento de la biomasa bacteriana hasta el día 4 de operación, a partir del cual se evidencia un aumento de la materia orgánica, lo que concuerda con la disminución de la concentración de proteínas, lo que se explica producto de lisis celular.

-Los parámetros cinéticos obtenidos demuestran que al disminuir la dosificación de nutrientes al sistema en la relación DBO₅ : N : P afecta especialmente en la constante u_{max} . Para una relación 100: 1:0.2 la biomasa bacteriana requeriría un mayor tiempo de operación para lograr el máximo crecimiento en sistemas batch evidenciado tanto al utilizar lodo proveniente de PAS y MAS, a diferencia de lo que ocurre con la utilización de dosificación de nutrientes 100:5:1 se lograría el máximo crecimiento en menor tiempo.

-El lodo proveniente de la industria papelera presenta una actividad heterotrófica de 0,106 mgO₂/ gSSVmin, muy similar a la actividad heterotrófica del lodo proveniente de la planta de aguas servidas que es 0,131 mgO₂/ gSSVmin, lo que demuestra en este caso que la aclimatación del lodo a compuestos específicos, no es un factor en la actividad heterotrófica como también en la degradación del efluente de celulosa kraft.

-El recuento de células vivas y muertas de la biomasa bacteriana presente en el lodo que se inoculó al reactor MBBR se encuentra en crecimiento estacionario. Las bacterias presentes en el lodo fueron capaces de acumular PHA cuando fueron cultivadas con efluente de celulosa kraft, y se evidenció mayor acumulación con condiciones deficientes de nutrientes al utilizar la relación de dosificación 100:1:0.2 tanto al utilizar lodo de PAS y MAS

-Durante 7 días de operación en batch, no se evidenciaron efectos significativos en la biodegradación de compuestos aromáticos, lignosulfónicos, lignina y sus derivados producto de la disminución de nutrientes desde una relación 100:5:1 hasta 100:1:0.2.

-

-La mayor proporción de microorganismos pluricelulares que se encuentran en la muestra de lodo inoculado al reactor continuo son protozoos, al final del TRH de 2 días, después de 60 días de operación del reactor continuo se evidencia alta concentración de rotíferos, indicando el buen funcionamiento del sistema.

- Para el TRH de 2 días la operación del reactor MBBR evidencia entre un 70 y 80% de eliminación de DBO_5 con baja sedimentabilidad del lodo, caracterizado por flóculos microbiano dispersos y baja producción de PHA en comparación a la de cultivos puros.

7 REFERENCIAS

APHA.(1998). Standard Methods, Examination of Water and Wasterwater 20th Ed. Washington,D.C.

Bengtsson, S., Werker, A. y Welander, T. (2008 a). Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater. *Water Sci. Technol.* **58.2**, 323-330.

Bengtsson, S., Werker, A. Christensson, M. y Welander, T. (2008 b). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour. Technol.*, **99**, 509–516.

Beun, J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M. y Heijnen, J.(2002). Poly-b-hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. *Water Res.* **36**, 1167–1180.

Bitton, G. (2006). Wastewater Microbiology. 3th edition. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Brown, M. y Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *PNAS.* **101**(46), 16085–16087.

Casas, C., González, G., Lafuente, F., Lema, J., Montesinos, J., Roca, E., Solà, C. y Valero, F. (2005). Ingeniería Bioquímica. Sintesis S.A., Madrid.

Çeçen, F. (2003). The use of uv-vis measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents. Seventh. international water association symposium on forest industry wastewaters. Seattle (USA), 1-4 June.

Chandra, R., Ghosh, A., Kumar, R. y Singh, S. (2006). Isolation and characterization of two potential pentachlorophenol degrading aerobic bacteria from pulp paper effluent sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **52**, 125–130.

Chaundhry, M. y Beg, S. (1998). A review on the mathematical modeling of biofilm processes: Advances in fundamentals of biofilm modeling. *Chem. Eng. Technol.*, **21**, 701-710.

Coats, E., Loge, F., Smith, A., Thompson, D. y Wolcott, M. (2007). Functional stability of a mixed microbial consortium producing PHA from waste carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **136–140**, 909- 925.

Correa, J., Dominguez, V., Martinez, M., Vidal, G. (2003). Aerobic degradation of 2,4,6- TCP content in ECF bleached effluent. *Environ. Int.*, **29**, 465-495

CMPC Celulosa. Proceso Productivo de la Celulosa..

Dias, J., Lemos, P., Serafim, L., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M., Ramos, A., Oliveira, R. y Reis, M. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* **6**, 885-906.

Diez, M. C., Castillo, G., Aguilar, L., Vidal, G. y Mora, M. L. (2002). Operational factors and nutrients effect on activated sludge treatment for phenolic compounds degradation from Pinus radiata kraft mill effluents. *Bioresour. Technol.* **83** (2), 132-138.

Dupla, M., Comeau, Y., Parent, S., Villemur, R. y Jolicoeur, M. (2006). Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification. *Water Res.* **40**, 249-258.

Fall, Ch., Cuenca F., Bâ K. y Solís C. (2006). Respirometry-based evaluation of the fate and possible effects of antifreeze on activated sludge. *J. Environ. Manage.* **80**, 83-89.

Furumai H., Rittmann, B. (1992). Advanced modeling of mixed populations of heterotrophs and nitrifiers considering the formation of exchange of soluble microbial products. *Wat. Sci. Tech.*, **26**, 493-502.

Gerardi, M. (2006). Nitrogen, Phosphorus, and Sulfur Bacteria. *Wastewater Bacteria*. pp 75-117. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Godoy, F., Bunster, M., Matus, V., Aranda, C., Gonzalez, B. y Martinez, M. (2003). Poly-b-hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**, 315–320.

Gorenflo, V., Steinbuchel, A., Marose, S., Rieseberg, M., Scheper, T. (1999). Quantification of bacteria polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 765-772.

Guisasola, A., Vargas, M., Marcelino, M., Lafuente, J., Casas, C. y Baeza, J. (2007). On-line monitoring of the enhanced biological phosphorus removal process using respirometry and titrimetry. *Biochem. Eng. J.* **35**, 371-379.

Gurieff, N. y Lant, P. (2007). Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresour. Technol.* **98**, 3393-3403.

Haygarth, P., Heathwaite, A., Turner, B. y Harris, G. (2005). The phosphorus transfer continuum: Linking source to impact with an interdisciplinary and multi-scaled approach. *Sci. Total Environ.* **344**, 5-14.

Jarhen, S., Rintala, J. y Odegaard, H. (2002). Aerobic moving bed biofilm reactor treating thermomechanical pulping whitewater under thermophilic conditions. *Water Res.* **36**, 1067-1075.

Lerner, M., Sthal, N. y Galil, N. (2007). Comparative study of MBR and activated sludge in the treatment of paper mill wastewater. *Water Sci. Technol.* **55**, 23-29.

Liu, J. y Liss, S. (2007). The impact of reduced phosphorus levels on microbial floc properties during biological treatment of pulp and paper wastewaters. *Water Sci. Technol.* **55**, 73-79.

Mahishi, L., Tripathi, G. y Rawal, S. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiol. Res.* **158**, 19-27.

Malmqvist, A., Welander, T. y Olsson, L. (2007). Long term experience with the nutrient limited BAS process for treatment of forest industry wastewaters. *Water Sci. Technol.* **55**, 89-97.

McChalicher, C. y Srienc, F. (2007). Investigating the structure–property relationship of bacterial PHA block copolymers. *J. Biotechnol.* **132**, 296-302.

Metcalf y Eddy (1995). Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse. 3th edition, McGraw-Hill, New York.

Milestone, C., Stuhridge, T., Fulthorpe, R. (2007). Role of High Molecular Mass Organics in Colour Formation During Biological Treatment of Pulp and Paper Wastewater. *Water Sci.Technol.* **55**, 191-198.

Mullan, A., Quinn, J. y McGrath, J. (2002). Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions. *Microb Ecol.* **44**, 69-77.

Pambrun, V., Paul, E. y Spérandio, M. (2008). Control and modelling of partial nitrification of effluents with high ammonia concentrations in sequencing batch reactor. *Chem. Eng. Process.* **47**, 323-329.

Plattes, M., Fiorelli, D., Gille, S., Girard, C., Henry, E., Minette, F., O’Nagy, O. y Schosseler, P. (2007). Modelling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor using respirometry for the estimation of kinetic parameters. *Biochem. Eng. J.* **33**, 253-259.

Pokhrel, D. y Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater. A review. *Sci. Total Environ.* **333**, 37-58.

Punrattanasin, W., Randall, A. y Randall, C. (2006). Aerobic production of activated sludge polyhydroxyalkanoates from nutrient deficient wastewaters. *Water Sci.Technol.* **54**, 1-8.

Ramalho, R.S. (1991). Tratamiento de aguas residuales. Reverte S.A., Barcelona, ES.

Richardson, M. (1985). Nitrification inhibition in the treatment of sewage, Thames Water Authority, Reading, United Kingdom.

Rusten, B., Ulgenes, Y., Lygren, E. y Eikebrokk, B. (2006). Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactor. *Aquacul. Engi.* **34**, 322-331.

Sharifi, M., Azimi, C. y Khalili, M. (2001). Isolation and Identification of Bacteria Present in the Activated Sludge Unit, in the Treatment of Industrial Waste Water *Iranian J. Publ. Health.* **30**, 91-94.

Sivard, A., Ericsson, T. y Larsson, B. (2007). Strategy for nutrient control in modern effluent treatment plants. *Water Sci. Technol.* **55**, 157-163.

Slade, A., Ellis, R., vanden Heuvel, M. y Stuthridge, T. (2004). Nutrient minimisation in the pulp and paper industry: an overview. *Water Sci. Technol.* **50**, 111-122.

Slade, A., Maclean, P. y Van Otterdijk, F. (2007). The impact of cleaner processing on nutrient availability in the bleached kraft industry. *Water Sci. Technol.* **55**,165-172.

Shumann, R., Schiewer, U., Karsten, U. and Rieling, T.(2003). Viability of bacteria from different aquatic habitats. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. *Aquat Microb Ecol.* **32**, 137–150.

Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T. (2002). PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating wastewater. *Water Sci. Technol.* **45**, 119-126.

Thompson, G., Swain, J., Kay, M. and Forster, C. (2001). The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresour. Technol.* **77**, 275-286.

Tobella, L., Bunster, M., Pooley, A., Becerra, J., Godoy, F., Martinez, M. (2005). Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoates by *Sphingopyxis chilensis* S37 *Wautersia* sp. PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing and 2,4,6-trichlorophenol *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 397–401.

Tsang, Y., Chua, H., Sin, S., Tam, C. (2006). A novel technology for bulking control in biological wastewater treatment plant for pulp and paper making industry. *Biochem. Eng. J.* **32**, 127-134.

Vidal, G., Nieto, J., Cooman, K., Gajardo, M., Bornhard, C. (2004). Unhairing effluents treated by an activated sludge sistem. *J. Hazard. Mater.*, **112**, 143-149.

Villamar, C.A, Jarpa., Decap, J., Vidal, G. (2009). Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparactive study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiate* and *Eucalyptus globulus* as raw material. *Water Sci. Technol.* **59.3**, 507-514.

Wang, Y., Hua, F., Tsang, Y., Chan, S., Sin, S., Chua, H., Yu, P., Ren, N. (2007). Synthesis of PHAs from waste under various C:N ratios. *Bioresour. Technol.* **98**, 1690–1693.

Wu, H., Sheu, D., Lee, C. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate- accumulating bacteria with spectrofluorometry. *J. Microbiol. Methods.* **53**, 131-135.

Xavier, C. y Vidal, G. (2003). Los residuos líquidos en la industria de celulosa: avances y desafíos. *Tecnología de Agua*. **243**, 42-50.

Yan, S., Tyagi, R. y Surampalli, R. (2006). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms. *Water Sci. Technol.* **53**, 175-180.