



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

**ALGUNOS ASPECTOS DE LA BIOLOGIA DE LOS LODOS
ACTIVADOS Y SU RELACION CON LA DEGRADACION
DE DETERGENTES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ROSA MARIA ESPINOSA VALDEMAR

MEXICO

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el departamento de Biotecnología y Bioingeniería - del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del - IPN, bajo la dirección del M en C. Teodoro Gutiérrez C. y del IBQ Vicente López M.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

A él porque lo admiro y respeto por haberme puesto el ejemplo de que todo lo que uno se propone puede lograrse a base de esfuerzo, sacrificio y trabajo, a ambos por su amor, su apoyo, sus consejos y la confianza .

A ella por su sacrificio y abnegación y sobre todo por ser la mujer admirable que es.

A ustedes dedico este trabajo como una pequeña muestra de que su confianza y apoyo empiezan a dar sus frutos. A los dos con Amor.

A MIS HERMANOS:

Octavio, Edmundo, Daniel, Ramiro y Paco por su apoyo, su paciencia y comprensión durante esta etapa de mi vida.

A MI QUERIDA HERMANA:

Ana Luisa de quién espero mucho y para quién auguro y deseo un feliz desenvolvimiento en su vida futura y su realización plena, sobre todo como mujer,

A:

Efraín con Amor

A:

Nela, Gaby, Lilia, Marcela, Lety, César y Jose Luis

Por nuestra Amistad.

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al I.B.Q. Vicente López Mercado y al M. en C. Teodoro Gutierrez C. por su apoyo, sus enseñanzas, sus críticas, sus consejos y todo lo que me brindaron para la realización de este trabajo. Asimismo quiero expresar mi admiración a ambos por ser personas sinceras y sobretodo humanas.

A la I.Q. Thalia Flores M. por su valiosa colaboración y apoyo en la determinación de los parámetros físico-químicos

A los Q.B.P. Jovita Martinez C. y Joel Alva Flores por su dirección y ayuda en la caracterización microbiana.

Al Biol. Sabino Ibarra por su colaboración en la realización de las figuras y por todo lo que me brindó.

A Leticia, mi cuñada, por su valiosa cooperación y apoyo contante para la realización de mis trabajos a lo largo de mi carrera.

a mi primo Rodolfo por su estimulante apoyo durante la la carrera.

Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

Hay peces que se dicen libres en el agua,
y aves que lo mismo dicen en el aire,
aire y mar no bastan, pues dice el hombre
que no hay hambre con alimento y que
no habra libertad sin pensamiento.

Quetzalcoatl.

C O N T E N I D O

RESUMEN	ix
INTRODUCCION	
1. El Proceso De Lodos Activados.....	2
2. Detergentes.....	7
OBJETIVO.....	17
MATERIAL Y METODOS	
PRIMERA Y SEGUNDA ETAPA	
1. Muestreo.....	19
2. Cuantificación Microbiana.....	23
3. Criterios de Aislamiento.....	26
TERCERA ETAPA	
1. Caracterización Microbiana.....	27
2. Actividad De Las Cepas Aisladas Sobre El Detergente.....	32
RESULTADOS	
PRIMERA Y SEGUNDA ETAPA	
1. Muestreo Y Cuantificación Microbiana.....	40
2. Criterios de Aislamiento.....	48
TERCERA ETAPA	
1. Caracterización Microbiana.....	48
2. Actividad De Las Cepas Aisladas Sobre El Detergente.....	49

DISCUSION Y CONSLUSIONES

PRIMERA Y SEGUNDA ETAPA

1. Experimentos En Lodos Activados.....57

TERCERA ETAPA

1. Caracterización Microbiana.....61
2. Actividad De Las Cepas Aisladas Sobre El Detergente.....64

APENDICE.....67

BIBLIOGRAFIA.....75

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al caracterizar a la población bacteriana aerobia que predomina en un sistema de lodos activados y se determinó el efecto que los detergentes de tipo aniónico tienen sobre ella.

Partiendo de un sistema de lodos activados con un tiempo de residencia celular de 6 horas, una concentración de sólidos suspendidos volátiles de 1.25 g/l y una carga orgánica en la alimentación de 500 mg/l de DQO, se midió el efecto que concentraciones de 10 y 50 mg/l de detergente aniónico tienen tanto en los parámetros cinéticos del sistema como en la población presente en dichas condiciones.

Se encontró que la población se encuentra constituida por 7 familias que son: Halobacteraceae, Enterobacteraceae, Bacillaceae, Nocardiaceae, Corynebacteraceae, Pseudomonadaceae y Vibrionaceae.

Para las concentraciones de detergente utilizadas, la velocidad de crecimiento global del sistema disminuye en un 12 y un 50% respectivamente, mientras que la remoción tanto de materia orgánica como de detergente disminuyó en casi un 50% al trabajar con la concentración de 50 mg/l de detergente.

Ambas concentraciones dan lugar a una sucesión poblacional de manera tal que sólo los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Aeromonas** resistieron y predominaron en el sistema, aunque con una menor actividad degradativa.

Al probar la actividad individual de microorganismos pertenecientes a estos tres géneros sobre el detergente utilizado, se encontró que degradan el detergente en un 18%, 22% y 20% respectivamente.

INTRODUCCION

El deterioro del ambiente es un proceso que viene desde épocas remotas y que es debido principalmente al aumento de las poblaciones humanas y al desarrollo agrícola e industrial asociado a ellas.

Con la construcción de los abastecimientos de agua para las poblaciones y la industria, se empezó a utilizar el agua como un vehículo que transporta con relativa facilidad una gran parte de los desechos producidos por la actividad humana, dando lugar a lo que en la actualidad conocemos como agua residual, que no es otra cosa que agua adicionada de algunos compuestos orgánicos e inorgánicos en forma ya sea disuelta, coloidal o suspendida y que comúnmente se vierte en los cauces, corrientes o cuerpos de agua más cercanos. Esto incorpora materiales y sustancias a las aguas cambiando sus características naturales dando lugar a su contaminación. La práctica generalizada de vertir residuos sin tratamiento en ríos, lagos o mar, por considerar que es el sistema de disposición más económico, crea cambios en las condiciones ecológicas de las aguas que los reciben.

Lo anterior pone de manifiesto la importancia de los sistemas de tratamiento de aguas residuales y uno de los aspectos más importantes lo constituye la selección del sistema adecuado que permita eliminar de ellas compuestos y materiales contaminantes que se le agregan al usarla, lo que desde un punto de vista técnico implica desarrollar metodologías que sean eficientes y económicas para lograrlo.

En México hasta 1981 existían cerca de 150 plantas de tratamiento de aguas residuales y un número casi igual de proyectos, la gran mayoría de dichas instalaciones se construyeron, o se proyectan construir con la finalidad de reusar el agua, pues

son contados los casos en los que el agua residual es tratada - para evitar daños al ambiente (48).

EL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS.

Entre los métodos más empleados para reducir el contenido de materia orgánica de los desechos líquidos diluídos, se tienen los que utilizan en tratamiento biológico en condiciones aerobias y entre éstos se encuentra el de lodos activados que constituye uno de los métodos de purificación de aguas más usado. El lodo activado es un sistema contínuo abierto con recircula - ción que se caracteriza por soportar el crecimiento de una po - blación heterogénea, fundamentalmente aeróbica.

Físicamente consiste de un tanque en donde los resí - duos son aereados y soportan el crecimiento de una población microbiana mixta, al desarrollarse ésta y emplear las sustancias que se encuentran presentes en el desecho, crea la necesidad de separarlas del agua en la cual se encuentran suspendidas, lo - cual se logra mediante el acoplamiento al sistema del tanque se sedimentación.

Los lodos activados deben cumplir 3 requerimientos - biológicos esenciales para que funcionen en forma adecuada (53):

- a) La población mixta deberá crecer en las condicio - nes ambientales que presenta el tanque de aerea - ción.
- b) La población mixta debe ser capaz de crecer y de - gradar en consecuencia de las sustancias presen - tes en el resíduo.
- c) Los organismos deben crecer de forma tal que pue - dan sedimentarse en el clarificador en un tiempo razonable.

Desde el punto de vista ecológico, se requiere obtener las condiciones para que crezcan los organismos que son deseables, lo cual se logra generalmente mediante la variación de las condiciones ambientales, hasta encontrar las que permitan lograr el objetivo anterior.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo del proceso es el de crecer una población heterogénea sobre un residuo - cuya característica principal es la de ser un medio diluído si se compara con los medios que se emplean en el laboratorio para el cultivo de microorganismos. Para la medición de la concentración de sustrato oxidable en los residuos se han establecido parámetros tales como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), - que indica la cantidad de materia oxidable por los microorganismos que se encuentren presentes en el residuo, a través de la cantidad de oxígeno que se requeriría para lograrlo.

Estudios realizados hasta ahora (10, 15, 16 y 17) - - muestran los principales grupos de organismos, así como la función que desempeñan, pudiendo catalogarse como sigue:

- a) Hongos. Los hongos que se han identificado son - básicamente de los géneros: *Cladosporium*, *Margarinomyces*, *Aureobasidium*, *Geotrichum* y *Trichoderma*; aunque esporádicamente se han reportado hongos - pertenecientes a los géneros: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, - *Giocladium* y *Phialophora*.

Se ha sugerido (V. López M. comunicación personal) que la presencia de hongos en los flóculos (constituidos principalmente por bacterias), pueden tener un papel importante en la sedimentación.

También ha sido detectada la presencia de levaduras de los géneros; *Cándida*, *Rhodotorula*, *Turulop*

sis y *Tricosporum*, las cuales pueden ser importantes en la degradación de materia orgánica.

Un caso especial, lo constituyen los hongos que atrapan rotíferos y nemátodos, los cuales son respectivamente identificados, como *Zoopagus insidians* y *Arthrobotrys*, los cuales además de saprófitos son predadores de organismos indeseables pues originan problemas en la sedimentación de los lodos.

- b) Protozoarios. Entre los que se han encontrado en forma más abundante en los lodos activados, se tiene que la mayoría de los géneros pertenecen a la clase de los Ciliados, Flagelados y Rhizopodos. Se ha detectado que estos organismos tienen actividad saprofita aunque no tan intensa como las bacterias y además actúan como predadores de organismos unicelulares, principalmente bacterias.
- c) Invertebrados. Entre los invertebrados presentes, se pueden citar a los Rotíferos y a los Nemátodos y en forma menos frecuente insectos y sus larvas.
- d) Bacterias. Constituyen la mayor parte de la biomasa de los sólidos suspendidos de los lodos activados y también forman el nivel básico de la cadena trófica presente (17). Las bacterias predominantes son saprófitas, esto es, que obtienen la energía y los nutrientes por la descomposición progresiva y la eventual desmineralización de los compuestos orgánicos en los desechos, sin embargo algunos géneros y en especial las bacterias nutritivas (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*) son quimio-litotróficas, siendo capaces de sintetizar su propio material celular a partir del carbono inorgá-

nico, por la utilización de energía en la oxidación de minerales, en este caso amonio y nitrito respectivamente (41). La comunidad de los lodos activados es menos compleja y diversa que la de otros sistemas biológicos (42), esto implica, desde el punto de vista ecológico, que es más especializada y sujeta a grandes presiones de selección (28).

La característica principal que permite que las bacterias lleven a cabo, de manera eficiente, la degradación de materiales de desecho, en comparación con otros organismos, es además de su gran capacidad metabólica, su tamaño pequeño, lo que da una relación área-volumen celular muy grande comparada con organismos de mayor tamaño, esto aunado a que su capacidad para intercambiar nutrientes y catabolitos con el líquido es también mayor.

El estudio ecológico de las bacterias en las plantas de tratamiento, al igual que en otros habitats, puede llevarse a cabo por: Microscopía, por técnicas de cultivo y por técnicas metabólicas. El principal uso de las técnicas de microscopía y de cultivo radica en la obtención de cuentas viables y totales de células que se utilizan para el estudio de poblaciones. Para la estimación de biomasa, velocidades de crecimiento específicas y substrato consumido, los métodos metabólicos y cinéticos son más adecuados.

Pocas bacterias tienen forma distintiva como para permitir que se reconozcan microscópicamente, así las bacterias son generalmente identificadas por sus reacciones en cultivos puros y con pruebas bioquímicas específicas. Una cuarta opción es la investigación de los flujos energéticos en los diferentes niveles tróficos de la cadena alimenticia de sistemas de tratamiento, esto es teóricamente atractivo. Porqué una recircula -

ción eficiente del desecho supone que habría la mínima retención de energía en el ecosistema para la producción de materiales celulares en forma de lodo y que mucha energía sería disipada en la oxidación de contaminantes orgánicos a bioxido de carbono, agua y amoniaco (41).

Aunque la estabilización de los desechos en los lodos activados es el resultado de la actividad microbiana, pocas investigaciones han sido conducidas al estudio de la microflora de los lodos activados. Después de los experimentos pioneros de Butterfield (8) se supuso que, generalmente, *Zooglea ramigera* era la única bacteria capaz de estabilizar el desecho líquido con flóculos biológicos prefabricados por estos organismos. Heukelekian y Littman y Wattie (41) trabajaron también en el aislamiento de *Z. ramigera* de lodos activados. Sin embargo poco después se cuestionó si otros formadores de flóculos estaban involucrados; Mc Kinney (36 y 37) aisló algunos otros formadores de flóculos en lodos activados, estos organismos fueron no sólo capaces de producir flóculos, sino que también estabilizaban la materia orgánica.

Una vez que se descubrió el papel que *Z. ramigera* desempeñaba en el sistema se empezaron a implementar técnicas y métodos para aislar e identificar a la población aerobia bacteriana, con el propósito de conocer la estructura de la población de los lodos activados y el papel que los microorganismos juegan en el sistema de lodos activados.

Los métodos clásicos para describir poblaciones bacterianas son aquéllos en que se aíslan e identifican un número suficiente de cepas al azar, esta labor puede simplificarse si se usa la técnica de réplica en placa, como en los estudios de Prakasam y Dondero (44 y 45) y Lighathart y Oglesby (33), o por el método de multiinoculadores (26 y 27) que es utilizado para inocular diferentes medios para las pruebas utilizadas en la

identificación.

Una modificación del método de Harris de frecuencia de dilución en placa es actualmente utilizado para la estimación de poblaciones mediante el método estadístico del número más probable (NMP). Datos cuantitativos o semicuantitativos obtenidos por tales métodos están disponibles para su análisis de correlación (33, 45 y 47). Todos estos métodos son capaces de dar una descripción más o menos compleja de las reacciones del ecosistema a los cambios a los que está sujeto, los cuales originan variación en los microorganismos presentes bajo condiciones fluctuantes de operación.

La mayoría de las bacterias descritas para lodos activados corresponden al tipo de los bacilos Gram negativos con muy pocos ejemplos de bacterias Gram positivas, lo cual se muestra en la Tabla 1, observándose predominancia de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Favlobacterium* *Bacillus* y *Zooglea*.

DETERGENTES.

Por otro lado existen varios problemas en el tratamiento de aguas y en el control de la contaminación que no son de origen microbiológico y que sin embargo podrían contribuir al conocimiento de la ecología de este ecosistema, entre los que se presentan en las plantas de tratamiento de lodos activados se encuentra la presencia de grandes volúmenes de espuma (50), provocada por la fuerte aereación utilizada en el sistema y que se debe a la presencia de detergentes que es uno de los problemas graves que necesita ser resuelto de inmediato, no sólo por su presencia en las plantas de tratamiento sino porque se ha detectado en cuerpos de agua natural como ríos y lagos, sobre todo en donde éstos son el punto de desembocadura de aguas de desecho ya sean industriales, domésticas e incluso agrícolas. Aunado a ésto se han observado efectos que el detergente tiene

T A B L A I

PRINCIPALES GENEROS DE BACTERIAS REPORTADOS EN
ESTUDIOS TAXONOMICOS DE LODOS ACTIVADOS

Género	Referencia No.
<i>Pseudomonas</i>	(4), (52), (33), (43), (36) (*)
<i>Comamonas</i>	(19)
<i>Lophomonas</i>	(*)
<i>Nitrosomonas</i>	(*)
<i>Zooglea</i>	(8), (19), (36), (*)
<i>Sphaerotilus</i>	(*)
<i>Azotobacter</i>	(19)
<i>Chromobacterium</i>	(4)
<i>Achromobacter</i>	(19), (36), (4), (33), (*)
<i>Flavobacterium</i>	(52), (33), (1), (43), (36), (*)
<i>Alcaligenes</i>	(33), (36)
<i>Bacillus</i>	(43), (36), (33), (*)

(*) Tomado de la referencia No 42.

sobre las poblaciones, lo que lleva a revisar brevemente el desarrollo de este tipo de compuestos.

Se denomina detergente a aquél compuesto que tiene una porción hidrofóbica y otra hidrofílica y que es capaz de cumplir una función limpiadora sin causar corrosión o abrasión (2). La presentación comercial de los detergentes incluye además de los grupos anteriores, que constituyen su principio activo, una serie de compuestos como fosfatos, carbonatos y silicatos que actúan como formadores en las formulaciones.

La combinación entre grupos hidrofóbicos e hidrofílicos así como la estructura de éstos puede ser ilimitada y de esta manera se obtiene una gran variedad de detergentes que puede satisfacer en forma total o parcial los requisitos mencionados. Las sustancias de superficie activa se clasifican de acuerdo a la forma como se disocian en el agua en los siguientes tipos:

Aniónicos. Son los que al disociarse generan una carga negativa y en general son derivados de grupos sulfonatos, sulfato o carboxilo.

No Iónicos. Contienen grupos hidrofílicos que no se disocian de manera apreciable en solución acuosa. Son de gran importancia comercial ya que comprenden del 20 al 25% del volumen total de detergentes.

Catiónicos. Son los que al disociarse generan una carga positiva. Son derivados de sales cuaternarias de amonio; su uso está restringido ya que son caros y no tan efectivos como los aniónicos.

Dentro del primer grupo de detergentes podemos citar a los alquilbencensulfonatos (ABS) que están constituidos por una cadena alquílica ramificada y un fenilo substituido con un grupo sulfona-

to y se encuentran entre los detergentes que hicieron su aparición a finales de la Segunda Guerra Mundial debido a que en este período hubo una gran escasez de ácidos grasos que son el componente principal de los jabones, por lo que éstos tenían que ser substituidos. Los ABS son ampliamente usados por sus excelentes propiedades de detergencia, su bajo costo y por las propiedades físicas de su formulación (9).

Como ya se mencionó, estos productos causan serios estragos en diferentes ecosistemas acuáticos, aunque es importante mencionar que tales problemas no sólo son debidos a las propiedades de superficie activa de los detergentes, sino que contribuyen a ellos la gran cantidad de fosfatos que se adicionan en las formulaciones comerciales para cumplir otras funciones. Con el propósito de encontrar la solución al problema mencionado se realizaron un gran número de trabajos, encontrándose como las causas principales las siguientes:

- a) Cadenas Olefínicas muy ramificadas.
- b) Gran número de Substituyentes

En países desarrollados se optó por cambiar este principio activo por otro cuya estructura fuese más accesible al ataque microbiano, así se introdujeron los alquilbencensulfonato lineales (LAS), cuya estructura no es ramificada por lo que son biodegradados más rápidamente, sin embargo en nuestro país este cambio no se ha realizado y se siguen utilizando los ABS ramificados.

Los detergentes al ser vertidos en diferentes cuerpos receptores entran en contacto con los microorganismos de manera que pueden ser biodegradados si las condiciones físicas son adecuadas.

De los estudios que sobre biodegradación de detergen -

tes en el sistema de lodos activados se han realizado, se tiene que son tres los requisitos para probar la biodegradabilidad de un detergente: los métodos analíticos, el agente biológico y las propiedades y el tipo de detergente a utilizar (50).

Cibulka (12) describe un programa para comparar la capacidades degradativas de cultivos puros y mixtos de bacterias en lodos activados y sus resultados no van más allá de la selección de los parámetros de operación que deben ser usados en las pruebas de Warburg. Mc Kinney (35) en experimentos previos a éste, indicó que lodos activados preparados a partir de cultivos puros, previamente aislados de lodos activados, fueron menos eficientes que los lodos mixtos en la eliminación de la DBO.

Bernarde y Col (6) observaron que la porción sulfonato del ABS puede ser atacada por ciertos cultivos puros y mixtos si se adiciona glucosa como fuente de carbono. Posteriormente Hovart y Koft (30) utilizando cultivos puros de *Pseudomonas sp.* HK-1 en un medio con sales y glucosa, demostraron la susceptibilidad del ABS a la degradación por el ataque microbiano, mediante cometabolismo.

Existe un gran número de publicaciones sobre degradación de detergentes, en los que cada autor fija las condiciones, los sustratos y los sistemas que emplea para estudiarlos lo que da por resultado que los valores de degradación obtenidos no sean fácilmente reproducibles y que presenten una gran variación de un experimento a otro siendo entonces poco comparables.

En México, los estudios que el Instituto de Ingeniería de la UNAM ha hecho sobre pruebas de biodegradabilidad (31), tienen características similares a las mencionadas (poca reproducibilidad), ya que emplearon en sus estudios tres tipos diferentes de detergentes, los cuales fueron evaluados en tres sis-

temas, peceras, nefelométricamente y en plantas de tratamiento operando en ocasiones en lote o en continuo. Obviamente sus resultados presentan grandes fluctuaciones ya que sus valores van desde 50% en plantas de tratamiento hasta un 98% en peceras adicionadas de nutrientes y leche.

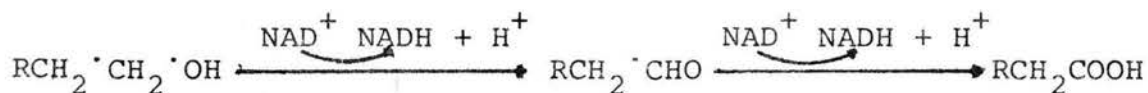
Finalmente y con el propósito de dar fin al problema mencionado la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) así como la Asociación Americana de Jabones y Detergentes, dictaron una serie de medidas tendientes a estandarizar las pruebas que debe satisfacer un detergente para ser considerado biodegradable o no (39).

Dada la importancia comercial de los ABS se han realizado numerosas investigaciones para el estudio de biodegradación destacando entre ellas la de Higgis y Burns (29) quienes proponen las siguientes rutas metabólicas para la degradación del ABS.

Estos autores proponen que algunos microorganismos, probablemente absorben y metabolizan el ABS, siguiendo una desulfonación extracelular del detergente, siendo el punto inicial del ataque el grupo metilo terminal del lado de la cadena alquílica. Esta reacción es catalizada por un alcano monooxigenasa.



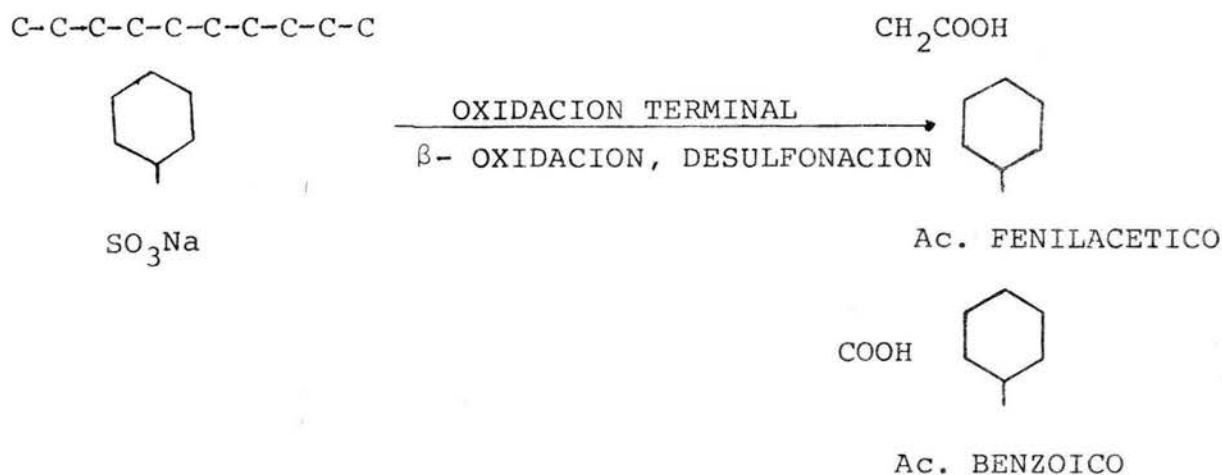
X es usualmente NAD o NADP y el sistema enzimático contiene al citocromo P-450 ó rubredoxin. El alcohol formado en esta reacción es convertido, por vía del aldehído, a ácido carboxílico por dos enzimas deshidrogenasa:



La capacidad de oxidar un grupo metilo a un grupo car

boxilo de esta manera está muy extendido entre los microorganismos. Como los primeros pasos involucran la incorporación de una molécula de O_2 , el proceso es dependiente de condiciones aeróbicas. El siguiente paso en el metabolismo de los ABS involucra la oxidación de la porción ácida alcanoica a unidades de Acetil Co A aunque la β -oxidación no es el único proceso involucrado en la degradación de la cadena, ya que el ciclo del glioxilato puede ser otra vía. Los átomos de carbono son casi siempre detectados por sustratos con átomos de carbono iguales y viceversa sugiriendo que está involucrado el proceso de β -oxidación.

Las preparaciones comerciales de los detergentes contienen todos los isómeros del ABS excepto el 1-fenil. En todos los casos la cadena alquílica es atacada, probablemente, para producir ácido benzoico o ácido fenilacético.

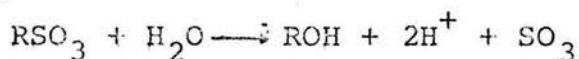


Usualmente por este proceso, el grupo sulfonato ha sido removido previamente.

La velocidad a la cual un grupo alquil dado es degradado se incrementa con el aumento en la distancia entre el anillo benzénico del grupo metilo terminal. Esto se describe como el principio de distancia.

Algunos cultivos puros de bacterias que crecen en ABS sólo degradan el lado de la cadena alquílica, aunque muchos cultivos puros y mixtos degradan también el anillo aromático. Los productos formados después de la degradación de la cadena y la desulfonación (benzoato y fenilacetato) son además metabolizados a difenoles (p.j. catecol) por una monooxigenasa antes que el anillo se rompa.

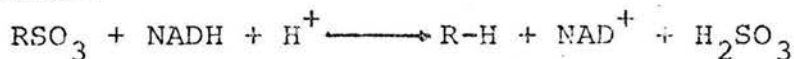
La remoción del grupo sulfonato de los ABS es un paso importante en su biodegradación, de los estudios que se han realizado con más detalle se encuentran los de *Bacillus* en el cual se encuentran involucradas dos enzimas en la formación del sulfato, la enzima de desulfonación misma y un sulfito citocromo C oxido reductasa. El producto inmediato es muy probablemente un sulfito el cual puede ser oxidado a sulfato. El mecanismo para la reacción no es totalmente conocido, pero se sugiere que puede estar involucrado un ataque hidroxilativo sobre el grupo sulfonato:



También es posible que la enzima catalice una monooxigenación:



en algunos organismos, sin embargo, el producto es un fenilalcanoato no hidroxilado indicando que un mecanismo reductivo está involucrado:



El estado de biodegradación en el cual ocurre la desulfonación varía entre los diferentes microorganismos. Esto es una evidencia de que, en muchos casos, la desulfonación ocurre extracelularmente, en la superficie exterior del organismo y que a ésto corresponde que el fenilalcano sea tomado y metabolizado.

Un aspecto interesante e importante en las investiga-

ciones recientes dentro del metabolismo microbiano del ABS se ha revelado para *Pseudomonas putida* en la cual parece ser que muchas de las enzimas codificadas extracromosomicamente. Esto se supuso cuando se encontró que cultivos puros perdían frecuentemente su habilidad para degradar ABS después de muchas resiembras en medios de cultivos ricos. Esto es similar a la pérdida de factores de la resistencia en bacterias entéricas (29).

Otro factor importante dentro del estudio de la biodegradación de detergentes es la toxicidad, ya que grandes concentraciones de detergentes pueden dañar o inhibir a las bacterias de tal manera que éstas sean incapaces de efectuar una degradación que tal vez pudiera llevarse a cabo en presencia de concentraciones más bajas de detergentes.

Los efectos que el detergente tiene sobre las bacterias han sido estudiados por Glassman (25), Putnam (46), Fischer (23), Dychala (20) y Margaritis (34) entre otros. Algunos de los resultados a que han llegado estos autores son, que existen relaciones entre el tipo de detergentes y los valores de pH, así se tiene catiónicos a pH neutro son generalmente más tóxicos: su efectividad se incrementa a valores de pH mayores y disminuye a valores más bajos (54).

La acción antibacteriana de los detergentes puede disminuir considerablemente por la presencia de proteínas o algún otro tipo de materia orgánica. Bacterias de diferentes especies pueden mostrar amplias diferencias en sensibilidad a un detergente dado. En general las especies Gram positivas son más susceptibles a los detergentes aniónicos que las Gram negativas, aunque con detergentes catiónicos ambos tipos de bacterias se ven afectadas, encontrándose además que un incremento en el tamaño de la cadena de los aniónicos parece volverlos más tóxicos. Por otro lado los detergentes conservan sus propiedades espumantes en aguas naturales, en concentraciones tan pequeñas como una par

te por millón, por lo que su presencia reduce la velocidad de absorción de oxígeno en el agua (50).

Finalmente si los detergentes son sólo parcialmente degradados en las plantas de tratamiento, una porción considerable de ellos es descargada en ríos y lagos, lo que necesariamente - tendrá un efecto negativo en la vida presente en ellos. Lo anterior permite ver que la alternativa más viable para evitar estos daños ecológicos es cambiar el principio activo de los ABS por - LAS y moderar el uso de aditivos en la formulación comercial, pero como en nuestro país por diversas razones este cambio no se - ha realizado y es difícil además que se realice a corto plazo, - siendo éste un problema que amerita trabajar en él, por lo que - para este estudio se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVO:

Realizar la caracterización de la población heterótrofa bacteriana aerobia que predomina en un sistema de lodos activados, evaluar el efecto que los detergentes tienen sobre ella y estudiar su capacidad para degradar detergente.

MATERIAL Y METODOS

Se establecieron 3 etapas de trabajo para conocer la biología de los lodos activados en condiciones óptimas para la remoción de materia orgánica y poder establecer la relación con la degradación de detergentes (7).

1. Se determinó la población microbiana que se encuentra en el sistemas de lodos activados en ausencia de detergente. Evaluandose desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo a los grupos microbianos presentes.
2. Se estudió el efecto que dos concentraciones de detergente tienen sobre la flora microbiana presente comparándola con el experimento de la primera fase, el cual sirvió como testigo.
3. Consistió en la caracterización microbiana de las cepas predominantes que se aislaron en la primera y segunda etapa. - Dicha caracterización se realizó hasta nivel de familia en forma general, aunque en algunos casos llegó hasta género. El principal logro de esta etapa es tratar de predecir en función de las características bioquímicas y fisiológicas - de las cepas dominantes la capacidad que el sistema tendrá para remover o no a los detergentes, así como las características que el sistema de lodos activados tendrá cuando se encuentre en presencia de las cantidades de detergentes utilizadas. Además de realizar la comparación mencionada, las cepas aisladas de la segunda etapa, se probaron en cuanto - al efecto que en forma individual tienen sobre los detergentes lo que constituyó la prueba de degradabilidad de este estudio.

Las dos primeras etapas fueron en realidad el proceso de conteo y aislamiento de los microorganismos empleados en la tercera, lo que se describe a continuación:

PRIMERA Y SEGUNDA ETAPA.

1. MUESTREO.

Anterior a este trabajo, el sistema de lodos activados fué optimizado para remover materia orgánica y corresponde a un sistema con mezclado completo y recirculación interna, simplificando la operación del mismo (38) (Figura 1). El sistema consta de dos partes principales, un tanque de aereación en donde se desarrolla la flora microbiana responsable de la degradación de la materia orgánica y de un tanque de sedimentación o clarificador secundario en donde los sólidos suspendidos se separan y permiten en consecuencia tener un efluente libre de material en suspensión y al mismo tiempo una recirculación de lodos continua sin necesidad de bombeo adicional.

Las unidades experimentales que se emplearon en este estudio contienen en un mismo recipiente los tanques de aereación y sedimentación, sólo separadas por una mampara deslizable en la forma como está descrito por Eckenfelder (21). El material empleado para su construcción es lucita, los difusores son de piedra porosa y las conexiones de acero inoxidable 304 (Figura 2).

El funcionamiento de la unidad (Figura 3) consiste en alimentar el agua residual a tratar a través del tubo alimentador (1) al tanque de aereación en donde es aereada y mezclada por efecto de los difusores de aire (2) que están conectadas a la línea de aire y a un rotámetro (3). Una vez transcurrido el tiempo de contacto (θ_h) requerido, el material pasa por la parte inferior de la mampara (4) en donde se sedimenta en el clarificador para finalmente ser colectado en el vertedero que funciona por nivel (5). Las mamparas 6 y 7 colocadas en los extremos tienen el propósito de

evitar los efectos de esquina en la unidad.

a) Parámetros Matemáticos.

Como ya fué demostrado, (24) el modelo al que corresponde el sistema que en forma esquemática se representa en la Figura 2, está dado por la ecuación:

$$S = \frac{S_0 Y \theta_c - X \theta_h (K_d \theta_c + 1)}{Y \theta_c} \dots \dots \dots (1)$$

En donde:

- S. Concentración de materia orgánica a la salida del sistema (g DQO/l).
- S₀. Concentración inicial de materia orgánica (gDQO/l).
- Y. Constante de rendimiento celular (g de células/ g sus - trato).
- θ_c. Tiempo medio de residencia celular (días).
- X. Concentración celular en el tanque de aereación (gSSV/l)
- θ_h. Tiempo medio de residencia celular hidráulico (horas) -
- K_d. Constante de muerte (días⁻¹).

El tiempo medio de residencia celular está definido como el tiempo que permanece una partícula microbiana en el sistema y está dado por:

$$\theta_c = \frac{V X}{Q_W X + X_e (Q - Q_W)} \dots \dots \dots (2)$$

En la ecuación 2, cuando el clarificador funciona eficientemente, X_e es practicamente igual a 0, lo que nos da:

$$\theta_c = \frac{V}{Q_W} \dots \dots \dots (3)$$

La ecuación 3 implica la posibilidad de calcular θ_c con sólo conocer el valor de Q_w (flujo de lodo desechado) y el volúmen del tanque de aereación para una concentración celular constante.

El tiempo de residencia hidráulico se define como:

$$\theta_h = \frac{V}{Q} \dots\dots\dots(4)$$

Donde Q es el flujo de agua residual alimentada al sistema (1/hr.).

La ecuación 1 permite conocer la calidad de un efluente cuando se conocen sus características (S_0), el tipo de reactor (θ_h) y el sistema microbiano (Y , θ_c y K_d).

En nuestro caso, para una carga orgánica S_0 , una concentración celular X y un flujo de lodo de desecho Q_w constante y necesario para mantener la concentración celular en el valor requerido, se calculo el valor de θ_c con la ecuación 3 y el valor de K_d al substituir todos los valores anteriores en la ecuación 1.

b) Parámetros Físicoquímicos.

Los parámetros de diseño manejados en el modelo son:

Concentración celular, medidos como sólidos suspendidos volátiles (SSV).

Concentración de sustrato S_0 , medido como demanda química de oxígeno (DQO).

En forma adicional se hicieron determinaciones de sólidos suspendidos (SS), sólidos sedimentables (SD), oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura, respiración e índice volumétrico de lodos, todos medidos en el tanque de aereación. También se midieron las demandas químicas de oxígeno del agua de alimentación y del agua tratada.

c) Detergentes.

Los detergentes empleados en el estudio corresponden a los reportados en otra comunicación (22 y 24) y son en general de tipo industrial. La concentración de ellos en los estudios se determinó como sustancias activas al azul de metileno (SAAM) que es una forma de medir los detergentes de tipo aniónico.

Todos los parámetros mencionados se evaluaron siguiendo la metodología recomendada por los manuales de análisis de agua y agua residual (11 y 34).

Las condiciones de operación en las que se trabajó fueron las óptimas encontradas para la remoción de materia orgánica en un sistema de este tipo (7) y que son:

$$S_0 = 500 \pm 25 \text{ mg DQO/l} \quad X = 1250 \text{ mg SSV/l}$$

$$\theta_h = 6 \text{ h}$$

En cada caso el estado estacionario se consideró alcanzado cuando 3 valores de θ_c eran similares lo que se logra en un período de aclimatación de 10-15 días. En la primera etapa se trabajo sin detergente y en la segunda se realizó con 10 y 50 mg/l de SAAM.

El agua residual empleada en los estudios, equivale a la especificada por la OECD para este tipo de pruebas (39) y su composición se muestra en el apéndice No.1.

El procedimiento seguido para la toma de muestras de la unidad consistió en quitar la mampara deslizable para permitir que la unidad se homogenizara durante 5 minutos. Se tomó una muestra de 100 ml en un matraz Erlenmeyer previamente esterilizado y se procedió a homogenizar en una licuadora esteril durante dos minutos.

2. CUANTIFICACION MICROBIANA.

Si se requiere terminar el tamaño de la población bacteriana, se puede recurrir al método de recuento de microorganismos vivos, el cual se basa en el hecho de que, a partir de cada microorganismo vivo se desarrollara una colonia (13). Dentro de estos métodos se encuentra el procedimiento de cuenta en placa o cuenta viable que proporciona una medida de la densidad de las bacterias, las que combinadas con el medio adecuado indicará el número de los organismos heterótrofos, aerobios y/o anaerobios facultativos en el agua. Esta es una medida empírica, ya que las bacterias crecen aisladas, en pares, en cadenas, racimos o paquetes y es difícil que un medio de crecimiento y una serie de condiciones ambientales puedan satisfacer los requerimientos fisiológicos de todas las bacterias en una muestra de agua. Consecuentemente el número de colonias puede ser substancialmente más bajo que el número real de bacterias viables presentes (11), es decir en general la cuenta viable hace una selección de la población.

Si se requiere una cuenta total el método de conteo directo en microscopio, en general dá valores más altos que el método de conteo en placa. Desafortunadamente, el conteo microscópico incluye no sólo a las bacterias vivas sino también a las bacterias muertas. El método aquí usado es una modificación del método propuesto por Trolldenier (51), el cual se basa en que después de añadir naranja de acridina, las bacterias vivas presentan una fluorescencia, verde, mientras que las bacterias muertas presentan una fluorescencia roja.

Para propósitos de establecer alguna posible relación entre estos dos métodos de muestreo, en este trabajo se utilizaron ambos y las metodologías son las siguientes:

a) Cuenta Viable.

Se emplearon dos medios de cultivo de los recomendados por la literatura (42) para este tipo de pruebas y que son: agar nutritivo y casitona-glicerol-extracto de levadura (la composición detallada de los medios de cultivo se muestra en el apéndice No.1), para elegir el medio de cultivo a utilizar.

Como los lodos de los que se parte son en general flóculos en los que se encuentran aglutinados los microorganismos que se desea evaluar, se estudió el efecto que la dispersión de flóculos en licuadora tenía sobre los valores de la cuenta viable obtenida.

Finalmente y considerando que los lodos activados trabajan a temperatura ambiente se experimentaron las temperaturas de 20, 25 y 37°C para encontrar aquella en donde se presenta el máximo crecimiento.

De los experimentos mencionados se seleccionó el medio CGY la inoculación con dispersión y la incubación a 25°C (ver resultados). Con estas condiciones se midió la cuenta viable al experimento de la primera etapa y a las dos de la segunda, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

A la muestra de lodo tomada de la unidad en cada caso se colocó en un vaso de licuadora estéril y se dispersó durante 2 minutos. Enseguida se prepararon diluciones de las muestras desde 10^{-1} hasta 10^{-7} mediante la adición sucesiva de 10 ml de cada dilución a botellas de dilución que contenían 90 ml de agua estéril.

De las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se tomaron por triplicado alicuotas de 0.1 ml y se depositaron en cajas de

petri que contenían medio CGY estéril y solidificado, - dicha alicuota se dispersó en la superficie del medio - con una espátula de vidrio previamente flameada con alcohol y enfriada en la superficie del medio. Hecho lo anterior se incubaron durante 72 hrs. en una incubadora a 25°C (Hotpack Co USA). La cuenta viable se realizó - mediante el conteo directo de las colonias desarrolla - das y el valor reportado es el promedio del triplicado de la dilución que menos variación presentó.

Los muestreos y las cuentas se efectuaron diariamente - durante 10 días.

b) Cuenta total.

A la misma muestra que se dispersó para cuenta viable - posteriormente se diluyó 10 veces con agua estéril y se dispersó 5 minutos más en licuadora, 4.5 ml. de dicha - dilución se colocaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca y se le adicionó 1 ml de una solución de agar bac - teriológico (Bioxón*) al 1%, lo anterior es con el fin de aumentar la viscosidad del medio y disminuir la movi - lidad de las bacterias. El tubo de ensayo se agitó vi - gorosamente en un vortex (Lab-line Mod supermixer 1290) y se tomó una alicuota que fué colocada en una cámara - de Petroff-Hausser (C.A. Hausser & Son. Phila USA), di - cha alicuota se tiñó con una solución 1/10000 de naran - ja de acridina (Sigma) se dejó secar a temperatura am - biente y se observó a inmersión en un microscopio de - fluorescencia (IV/F Zeiss, West Germany).

* (Todos los reactivos empleados en este estudio, salvo que - se indique lo contrario son Baker, R.A.).

El número total de microorganismos se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} Ct &= C_m \times 20000 \times 12.2 \times 10^6 \text{ bact/l} \\ &= C_m \times 2.44 \times 10^{11} \end{aligned}$$

en donde:

C_m = número de promedio de bacterias contadas al microscopio.

20000 = Conversión del volúmen de la cámara de Petroff-Hausser a mm^3 .

12.2 = Factor de dilución.

10^6 = Conversión de mm^3 a litros.

3. CRITERIOS DE AISLAMIENTO.

En ambas etapas al realizar la cuenta viable, el hecho de hacer un recuento de las colonias permitió llevar a cabo observaciones sobre las características que las colonias presentaban y de una forma indirecta tener una idea sobre la diversidad de los grupos bacterianos presentes en el sistema, así como la frecuencia de los mismos.

Lo anterior necesariamente (acorde con el objetivo del trabajo) condujo a un criterio de aislamiento y selección para obtener las cepas con las cuales llevar a cabo la caracterización a nivel de familia.

Durante la primera etapa, el criterio seguido consistió en aislar las cepas que presentaban características diferentes con el propósito de tener una idea sobre la diversidad inicial de microorganismos en el sistema y en la segunda etapa el criterio fué la frecuencia con la que los microorganismos se presentaban y poder así medir el efecto selectivo ejercido por las condiciones de esta etapa en la población del sistema.

Los criterios de frecuencia y diversidad los dieron las características macroscópicas de las colonias, figurando entre las más importantes durante la primera etapa: tamaño de la colonia, pigmentación y forma, adicionalmente en la segunda etapa: bordes, elevación, luz transmitida, luz reflejada, aspecto y superficie.

TERCERA ETAPA.

1. CARACTERIZACION MICROBIANA.

Con el fin de identificar en la medida de lo posible a los diversos grupos bacterianos del sistema que sirvieron como indicadores de las características ganadas o perdidas, se llevó a cabo la caracterización siguiente:

Se identificó, siguiendo los criterios de Cowan (14), a nivel de grandes grupos (Familias) a las poblaciones de bacterias aerobias heterótrofas que fueron obtenidas al muestrear por primera vez el sistema y a nivel de género, siguiendo el criterio de Bergey (5), a las bacterias que predominaron cuando el sistema se uso con 10 y 50 mg de detergente.

Es importante mencionar que estos criterios proponen una serie de pruebas suficientes para ubicar, en algunos casos, a ciertas cepas a nivel de género, razón por la cual en la primera caracterización no se realizaron todas las pruebas que propone el autor, pues no era necesario para saber a que familia pertenecían. En la identificación a nivel de género se realizaron todas las pruebas propuestas, por lo menos las que pertenecen al grupo de las primarias, puesto que las secundarias sólo fueron necesarias en algunas de las cepas a identificar. Así aunque en ocasiones se hable de una misma prueba en ambas caracterizaciones, ésta puede variar en el método y los reactivos usados en cada caso o en el número de repeticiones y/o metodologías empleadas. Esto se especifica

en más detalle en el desarrollo de las técnicas utilizadas - en cada caracterización.

Cowan y Bergey, proponen utilizar un número determinado de - pruebas para hacer la identificación, unificando estos crite - rios se puede hacer una división de las pruebas como sigue:

a) Pruebas Primarias.

Con este nombre se conoce a las pruebas que permiten la ubicación inicial de una cepa en alguno de los ordenes - conocidos a la fecha. Como las más importantes de éstas tenemos: tinción de Gram, movilidad, requerimientos de - oxígeno, requerimientos nutricionales, esporas, catalasa, oxidasa, catabolismo de carbohidratos, la prueba O/F.

Para asegurarse que se está trabajando realmente con cul - tivos puros se hace un examen microscópico de las colo - nias, en donde se incluye la observación de las caracte - rísticas como son: forma, bordes, elevación, luz transmi - tida, luz reflejada, aspecto, consistencia, superficie y color. Se realiza también un examen microscópico de la célula, en donde se observa su forma, la presencia de es - poras, inclusiones, si es posible observar tanto en mi - croscopio compuesto como en el de contraste de fases.

Las pruebas mencionadas, como ya se dijo se aplicaron - tanto a las cepas aisladas durante la primera etapa como durante la segunda.

Pureza. La pureza de los cultivos se verificó en creci - mientos obtenidos a partir de las cepas conservadas a - 4°C en medio CGY y sembradas por estría cruzada en - - Agar nutritivo e incubadas a 25°C durante 48 hrs. Una - vez obtenido el cultivo, se observó microscópicamente ta

maño, pigmento y forma colonial. Al microscópio (Standard K 7 Zeiss, West Germany) se observó morfología, presencia de esporas y se realizó tinción de Gram.

Adicionalmente a las cepas aisladas durante la segunda etapa se les hicieron preparaciones frescas y tinción de Gram a las 12, 24, 48 y 72 hrs., y se observaron tanto en microscópio compuesto como en el de contraste de fases. Las características coloniales observadas fueron: forma, bordes, elevación, luz transmitida, luz reflejada, aspecto, consistencia, superficie y color.

Movilidad. En las cepas de la primera etapa, los cultivos se sembraron por picadura en tubos con medio sólido para movilidad incubándose a 37°C durante 48 hrs. La prueba se considera positiva si hay dispersión del crecimiento dentro del tubo.

Las cepas aisladas durante la segunda etapa se probaron además en los medios de SIM, Craigie y B-105. En SIM los tubos conteniendo medio se sembraron por picadura y se incubaron a 26°C por 40-72 hrs., observándose la zona de crecimiento. En el de Craigie los tubos de hemolisis con el medio inclinado y un tubo de medio para contener el inóculo en el centro se inocularon con pipeta Pasteur, incubándose en las mismas condiciones que el caso anterior y observando la forma como se obtuvo el crecimiento. Finalmente en el caso del medio B-105 los tubos de hemolisis se sembraron por picadura observando el crecimiento transcurrido un período similar de incubación (48 hrs. a 25°C).

Prueba O/F.- Para las cepas de la primera etapa se utilizaron los medios de Hugh y Leifson y el medio rojo de fenol.

En el primer caso los tubos con medio líquido fueron sembrados por asada e incubados a 37°C durante 48 hrs. El resultado es oxidativo si hay color amarillo en la superficie, si es en el fondo es fermentativo. En el caso del medio rojo de fenol, los tubos también fueron sembrados por asada e incubados en las mismas condiciones que el caso anterior leyendo finalmente producción de ácido.

Las cepas aisladas en la segunda fase se les hizo la prueba del rojo de fenol con: glucosa, sacrosa, maltosa, almidón, lactosa y fructosa, todos con una campana de Durham para ver producción de gas. Además se hizo la prueba con un medio base de azul de bromotimol y los mismos azúcares para ver su utilización por vía oxidativa y medir la producción de ácido.

Catalasa y Oxidasa. Para estas pruebas, las cepas fueron sembradas por estría cruzada en agar BHI e incubadas a 37°C durante 48 hrs.

Para la prueba de catalasa, se adicionó sobre los cultivos 5 gotas de agua oxigenada al 3%, observando la presencia o ausencia de efervecencia.

Para la prueba de citocromo oxidasa, se adicionó reactivo de tetrametil-para-fenilendiamina (clorhidrato de tetrametil parafenilendiamina al 1% en agua) y se observó si las colonias presentaban cambios de coloración (rosa-rojo o negro). La presencia de estos colores indican la positividad de la prueba.

Requerimientos de Oxígeno. Se utilizaron los medios de triptona-extracto de levadura y caldo nutritivo. En el primer caso se sembró por asada cuando el medio aún estaba líquido (aproximadamente a 40°C), se dejó solidificar para finalmente incubarse a 26°C por un período de 48-72

hrs. El resultado lo da el tipo de crecimiento que se manifiesta en el tubo. En el caldo nutritivo éste se sem-bró por asada y se incubó en las mismas condiciones que - el caso anterior, procurando no mover para no tener fal - sas observaciones.

Requerimientos Nutricionales. Para verificar los requerimientos de carbono y energía de las cepas, se utilizó el medio de lascelles, para lo cual las cepas crecidas en tubos de agar nutritivo y con una edad de 48-72 hrs. fueron suspendidas en 3 ml. de agua destilada estéril, transfi-riéndose a un tubo de centrífuga y centrifugándose en condiciones asépticas a 10,000 RPM por 5 minutos, una vez logrado lo anterior se decantó el sobrenadante y el paquete celular se suspendió en 5 ml. de agua destilada estéril. Con esta suspensión se inocularon 4 matraces de 125 ml. - por cepa, 2 con 20 ml. de medio y tapón de algodón y 2 totalmente llenos de medio con tapón de plástico. Un ma - traz de cada lote se cubrió con papel aluminio y todos se incubaron en presencia de luz a 26°C. durante 2-3 sema-nas para lograr crecimiento.

b) Pruebas Secundarias.

A este grupo de pruebas corresponde el identificar carac-terísticas bioquímicas o metabólicas específicas y que - por consecuencia descriminan más eficientemente una cepa de otra. Las pruebas que se realizaron a las cepas aisladas en la segunda etapa fueron: hidrólisis de almidón, hidrólisis de caseína, hidrólisis de gelatina y reducción - de nitratos de nitritos.

En los cuatro casos mencionados su importancia radica no sólo en la presencia o ausencia de la (s) enzima (s) involucradas, sino que la velocidad con la que lo hacen es un parámetro que en ocasiones ayuda a distinguir una cepa de

otra. En forma breve las pruebas se hicieron como sigue:

Hidrólisis de Almidón. Se sembraron por estría cruzada - cajas de petri con agar nutritivo y 2% de almidón soluble e incubaron a 25°C por 72 hrs.. Una vez obtenido el crecimiento, se aplicó sobre las colonias lugol. La presencia de un anillo alrededor de las colonias indica una prueba positiva.

Hidrólisis de Caseína. Se sembraron por estría cruzada - cajas de petri con medio de leche descremada y se incubaron a 26°C. durante 72 hrs. La prueba es positiva cuando se observa un anillo incoloro alrededor de las colonias.

Hidrólisis de Gelatina. Se utilizaron tubos con medio de gelatina, dichos tubos fueron sembrados por picadura e incubados a 26°C. durante 72 hrs.. Una vez obtenido el crecimiento se añadieron unas gotas de ninhidrina (Sol. alcohólica al 2%) y se colocó en baño maría por 5 minutos. - Un color morado indica que la prueba es positiva.

Reducción de Nitratos a Nitritos. En tubos que contienen caldo nitrato se sembraron las cepas por asada e incubaron a 26°C. durante 72 hrs.. Una vez obtenido el crecimiento, la presencia de nitritos se detecta con la adición de unas gotas de una mezcla 1.1 de ácido sulfanílico a los tubos. La formación de un color rojo se toma como reacción positiva y negativa cuando aparece el color rojo con la adición de polvo de zinc.

2. ACTIVIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS SOBRE EL DETERGENTE.

Tomando como criterio el hecho de que las cepas que se aislaron durante la segunda fase en los experimentos con 10 y 50 mg. de SAAM/L indican esencialmente que son cepas resistentes a las concentraciones de detergente empleadas o bien

que son cepas que tienen la capacidad para metabolizarlas en alguna forma, se decidió probar la acción de dichas cepas cuando se usan como única fuente de carbono al detergente, para lo cual se consideró conveniente emplear condiciones de la prueba presuntiva recomendada por la OECD (46).

En la prueba presuntiva (nivel 1), que es utilizada en este trabajo, el detergente bajo prueba se adiciona como única fuente de carbono y energía a un medio de cultivo mineral con una composición igual al agua de dilución usada en la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno, esto es: KH_2PO_4 , 8.5 mg., K_2HPO_4 , 21.75 mg., Na_2HPO_4 , 33.4 mg., NH_4Cl , 1.7 mg., MgSO_4 22.5 mg., CaCl_2 , 27.5 mg. y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg., todo por litro de agua destilada. El detergente se adiciona en una concentración de 5 mg./l en matraces erlenmeyer de 2,000 ml. conteniendo 900 ml. del medio. Se incuban a 25°C. con agitación suficiente para no tener limitación por oxígeno. Como inóculo se emplean 0.5 ml. de efluente del clarificador secundario de una planta de tratamiento de agua residual.

La prueba consiste en medir el contenido de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) con respecto al tiempo. Se considera que un detergente es biodegradable cuando en un período que no exceda a los 19 días se degrade en 90% ó más, y no biodegradable si no alcanza ese valor en el tiempo mencionado.

a) Preparación del Inóculo.

Como en nuestro caso lo que se desea es probar la capacidad degradativa de las cepas aisladas además de la biodegradabilidad de los detergentes empleados, se realizaron 2 series de experimentos, una con las cepas -

aisladas en el experimento con 50 mg/l de ABS y la - -
otra con las aisladas en el experimento con 10 mg/l de
ABS. El inóculo de cada cepa se preparó de la forma -
siguiente: cultivos en medio inclinado de 48 hrs. de -
las cepas fueron suspendidas en 5 ml. de agua destila-
da estéril y transferidas a tubos de centrifuga con ta
pón en condiciones estériles, se centrifugaron a - - -
10,000 RPM/10 min., se eliminó el sobrenadante y se re-
suspendió en 5 ml. de agua destilada estéril, centrifu
gándose nuevamente a 10,000 RPM/min.. Finalmente se -
transfirieron a celdas Coleman en condiciones estéri -
les y se leyó su D.O. a 652 nm. La cantidad necesaria
para el inóculo se obtuvo igualando la D.O. obtenida -
de cada cepa, con la densidad óptica del efluente del
clarificador de lodos activados.

b) Muestras para Cuantificación de Detergente.

La manera como las muestras fueron tomadas durante el
curso de los experimentos fué como sigue: en un cuarto
de siembra con campana de flujo laminar horizontal, el
matraz correspondiente para la toma de muestra se colo
có sobre un agitador y en el interior del matraz se co
locó un magneto, previamente impregnado en alcohol y
flameado, se puso en agitación durante 5 minutos apro
ximadamente, ésto con el objeto de tomar la muestra lo
más homogéneamente posible. Se tomaron 20 ml. de mues
tra con una pipeta estéril y se transfirieron a un tu
bo de ensaye. Esta muestra sirvió para realizar la -
técnica de SAAM. La frecuencia del muestreo fué a in
tervalos de 4 días, excepto el primero que se tomó a -
los 5 días.

En las Tablas 2 y 3 se muestran las características de
ambos experimentos.

T A B L A 2

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ENSAYOS DE BIODEGRADACION DE CEPAS BACTERIANAS CRECIDAS EN LODOS ACTIVADOS (10 mg. ABS/1).

M A T R A Z	AGUA DE DILUCION	SISTEMA MICROBIANO	CONCENTRACION DETERGENTE
1	900 ml.	cepa 1	5 mg/1
2	900 ml.	cepa 2	5 mg/1
3	900 ml.	cepa 3	5 mg/1
4	900 ml.	cepa 4	5 mg/1
5	900 ml.	cepa 5	5 mg/1
6	900 ml.	cepa 6	5 mg/1
7	900 ml.	cepa 7	5 mg/1
8	900 ml.	cepa 8	5 mg/1
9	900 ml.	cepas 1-8	5 mg/1
10	900 ml.	ninguno	0 mg/1
11	900 ml.	ninguno	5 mg/1
12	900 ml.	lodos activados	5 mg/1

T A B L A 3

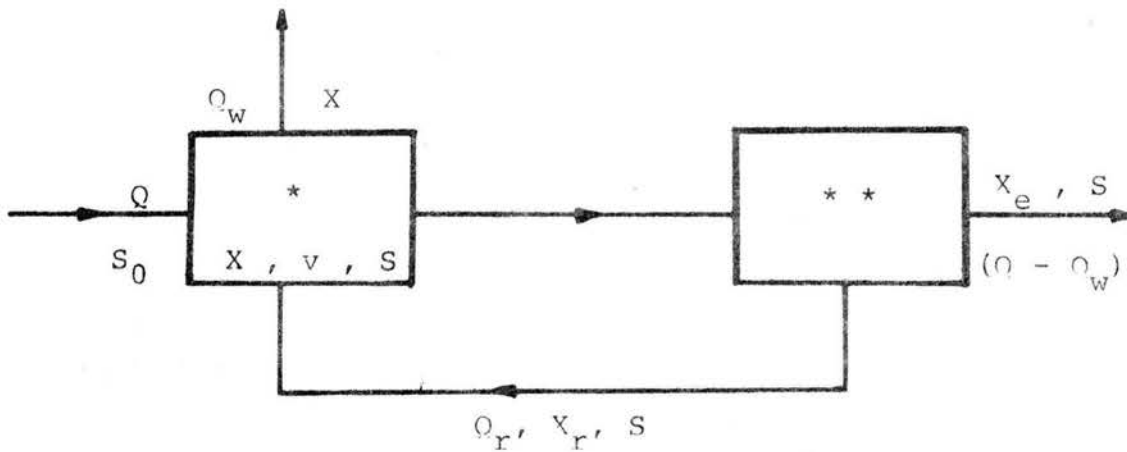
DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ENSAYOS DE BIODEGRADACION DE CEPAS BACTERIANAS CRECIDAS EN LODOS ACTIVADOS (50 mg. ABS/1).

M A T R A Z	AGUA DE DILUCION	SISTEMA MICROBIANO	CONCENTRACION DETERGENTE
1	900 ml.	cepa 8	5 mg/1
2	900 ml.	cepa 9	5 mg/1
3	900 ml.	cepa 10	5 mg/1
4	900 ml.	cepa 11	5 mg/1
5	900 ml.	cepa 12	5 mg/1
6	900 ml.	cepas 8-12	5 mg/1
7	900 ml.	* cepas 8-12	5 mg/1
8	900 ml.	Lodo activado	5 mg/1
9	900 ml.	** Lavado	
10	900 ml.	Lodo activado	5 mg/1
11	900 ml.	ninguno	0 mg/1
	900 ml.	ninguno	5 mg/1

* En función del efecto encontrado en el primer experimento (ver resultados) se decidió considerar la posibilidad de una degradación cometabólica, para lo cual se añadió glucosa al 0.1% como sustrato (30).

** El lodo activado que denominamos lavado, es una muestra en la que se deseaba eliminar algunos de los residuos de lodos activados que pudiera servir como sustrato para lo cual dicha muestra fué procesada de la siguiente manera: 100 ml. de efluente secundario se dejaron sedimentar, en un vaso de precipitados de 250 ml., aproximadamente 30 minutos, se tomó el sobrenadante y se aforó nuevamente con agua destilada a 100 ml. y se dejó sedimentar nuevamente durante 30 minutos repitiéndose esta operación una vez más y al sobrenadante final se le leyó su D.O. para igualarla con la D.O. del lodo activado sin lavar.

FIGURA 1



ESQUEMA DEL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS
CON MEZCLADO COMPLETO Y RECIRCULACION.

- * Tanque de Aereación
- ** Tanque de Sedimentación
- Q. Flujo de Alimentación l/h
- S_0 . Concentración de Materia Orgánica Inicial mg DBO/l
- X. Concentración Celular en el Tanque de Aereación mg/l
- V. Volumen del Tanque de Aereación l
- S. Concentración de Materia Orgánica a la Salida g DBO/l

FIGURA 2

DIAGRAMA DE LA UNIDAD PARA Lodos ACTIVADOS A ESCALA DE LABORATORIO

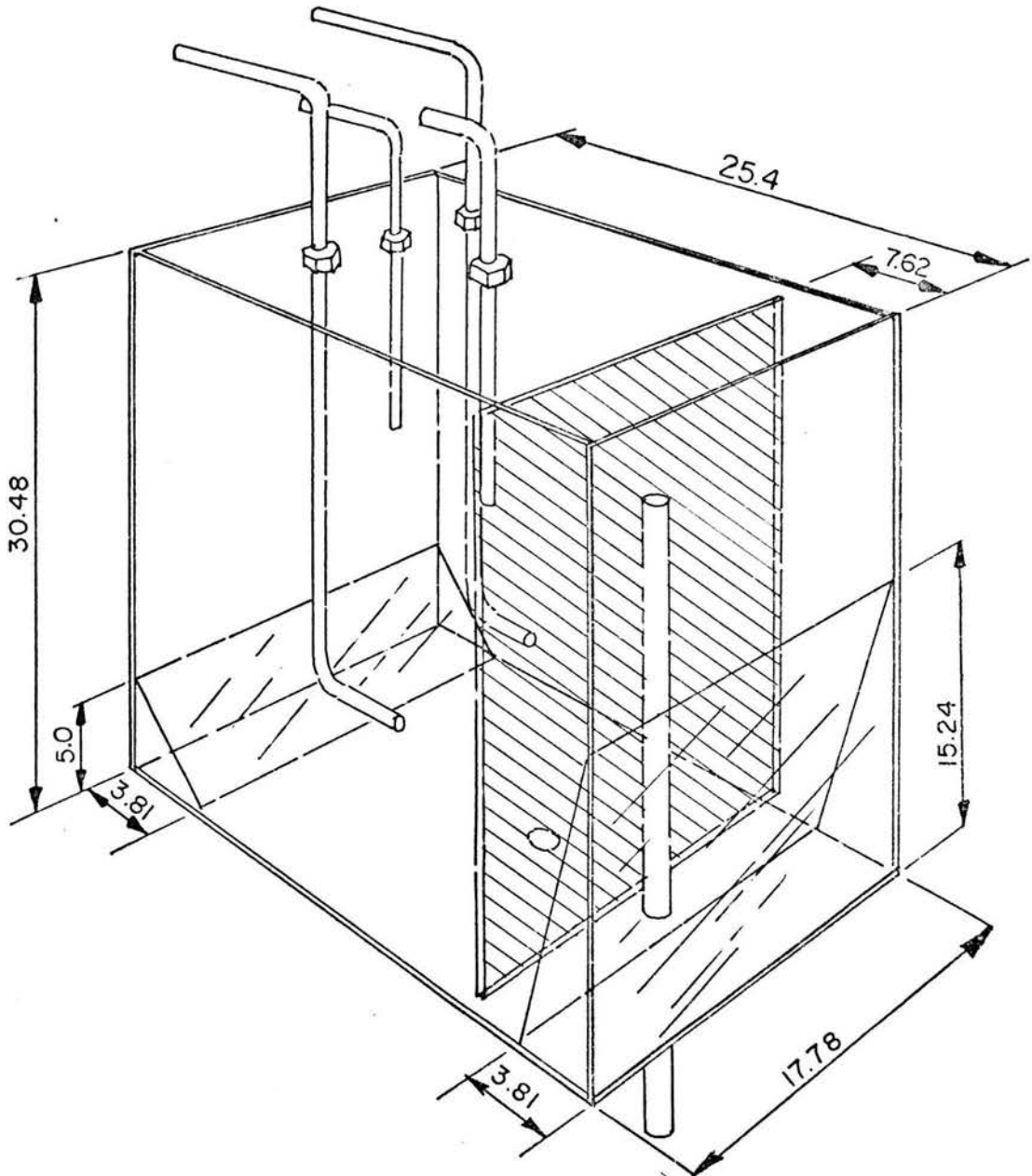
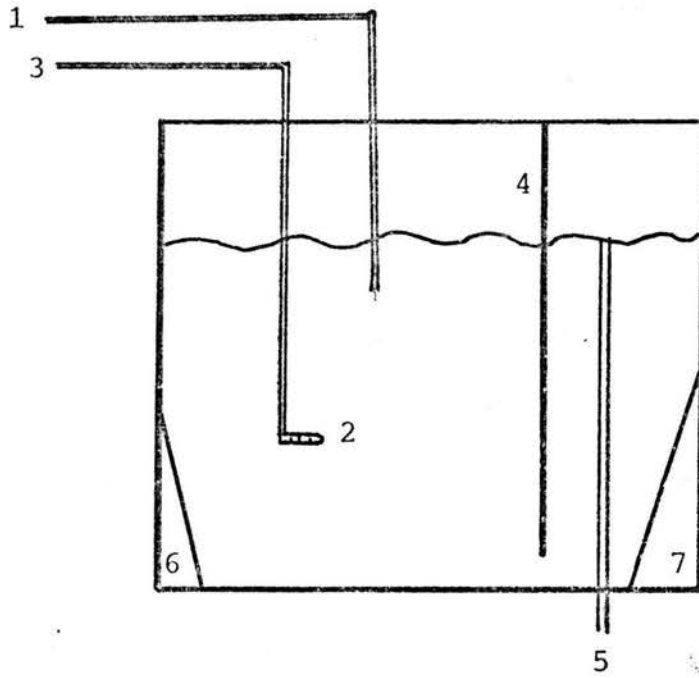


FIGURA 3



ESQUEMA DEL MODELO DE LABORATORIO PARA LODOS
ACTIVADOS.

RESULTADOS

PRIMERA Y SEGUNDA FASE

1. MUESTREO Y CUANTIFICACION MICROBIANA.

En la Tabla 4 se muestra el efecto que los medios empleados tienen sobre la cuenta viable de las muestras de lodos activados.

T A B L A 4

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO

Diluciones	Agar Nutritivo	C. G. Y.
	No. de Bacterias/ml.	No. de Bacterias/ml.
10^{-5}	64×10^5	56×10^5
10^{-6}	10×10^5	40×10^5
10^{-7}	0.2×10^5	0.3×10^5

En la Tabla 5 se presenta el efecto que la dispersión de los flóculos del lodo ocasiona sobre la cuenta viable, cuando ésta es realizada en medio CGY, y en la Tabla 6 se muestran los resultados de los experimentos realizados para evaluar el efecto de la temperatura.

Los resultados de los 3 experimentos anteriores permitieron seleccionar un procedimiento para llevar a cabo la cuenta viable de los experimentos de la primera etapa y los dos de la segunda, en ésta última se midió además cuenta total de microorganismos.

T A B L A 5

EFFECTO DE LA DISPERSION EN MEDIO CGY

Dilución	Muestra Dispersa No.de Bacterias/ml.	Muestra sin Dispersar No. de Bacterias/ml.
10^{-5}	40×10^6	13×10^6
10^{-6}	95×10^6	85×10^6
10^{-7}	70×10^6	80×10^6

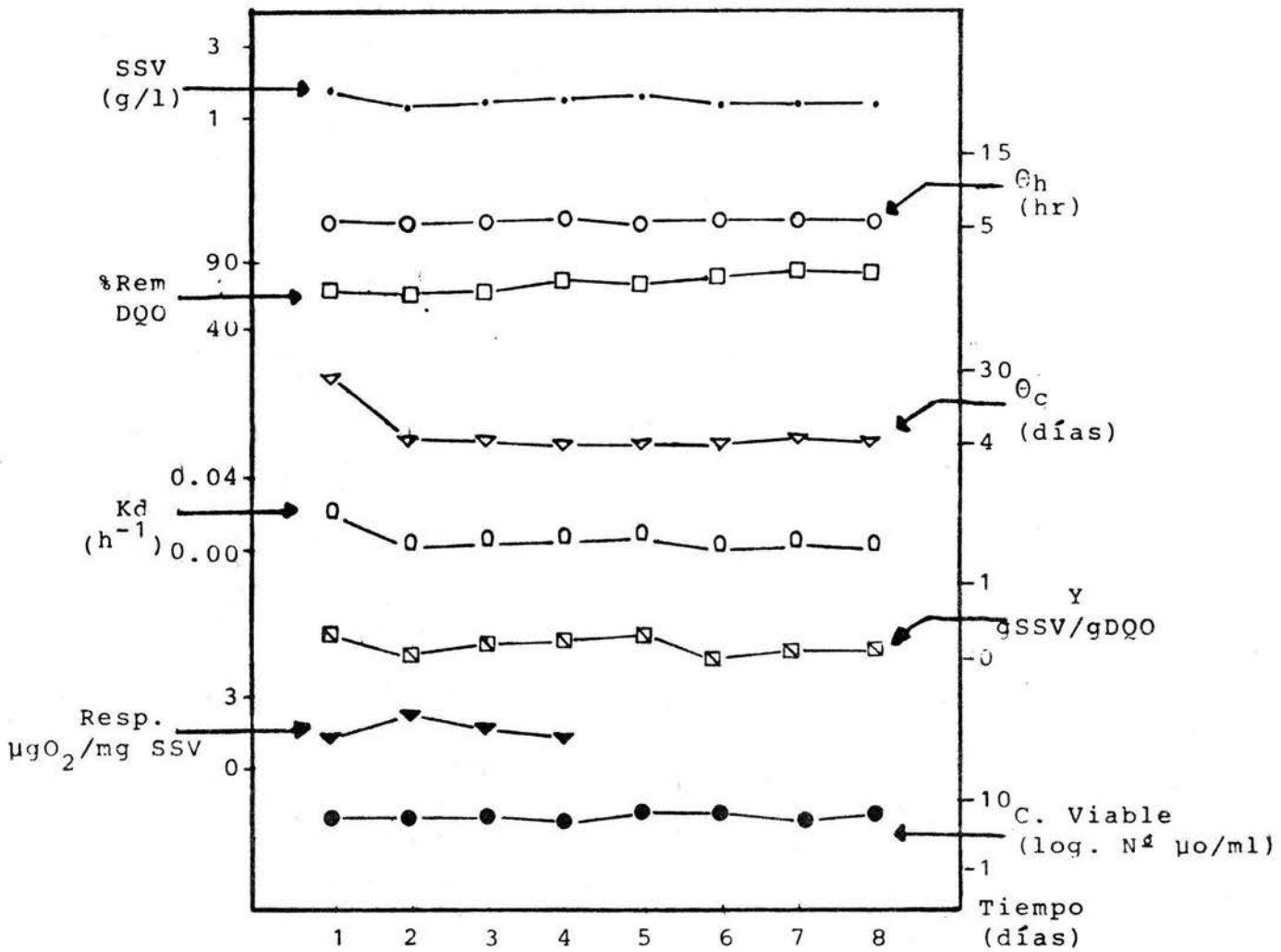
T A B L A 6

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN MEDIO CGY

Dilución	20°C.	25°C.	37°C.
	No. de Bacterias/ml.		
10^{-}	440×10^5	480×10^5	440×10^5
10^{-}	510×10^5	500×10^5	700×10^5
10^{-}	300×10^5	900×10^5	700×10^5

Los resultados de los experimentos efectuados en las dos primeras etapas se muestran en las Figuras 4, 5 y 6 para el testigo y las concentraciones de 10 y 50 mg. de detergente respectivamente, se muestran además de la cuenta viable, el comportamiento de parámetros como son: eficiencia del sistema para remoción de materia orgánica (DQO), la variación del tiempo de residencia celular (θ_c), la concentración de sólidos suspendidos y volátiles (SSV), la constante de rendimiento celular (Y) y la constante de muerte (Kd), en el caso de la segunda etapa se muestra además de estos parámetros, cuenta total y remoción de detergentes, los valores promedio para los parámetros de dichos experimentos se muestran en las Tablas 7, 8 y 9.

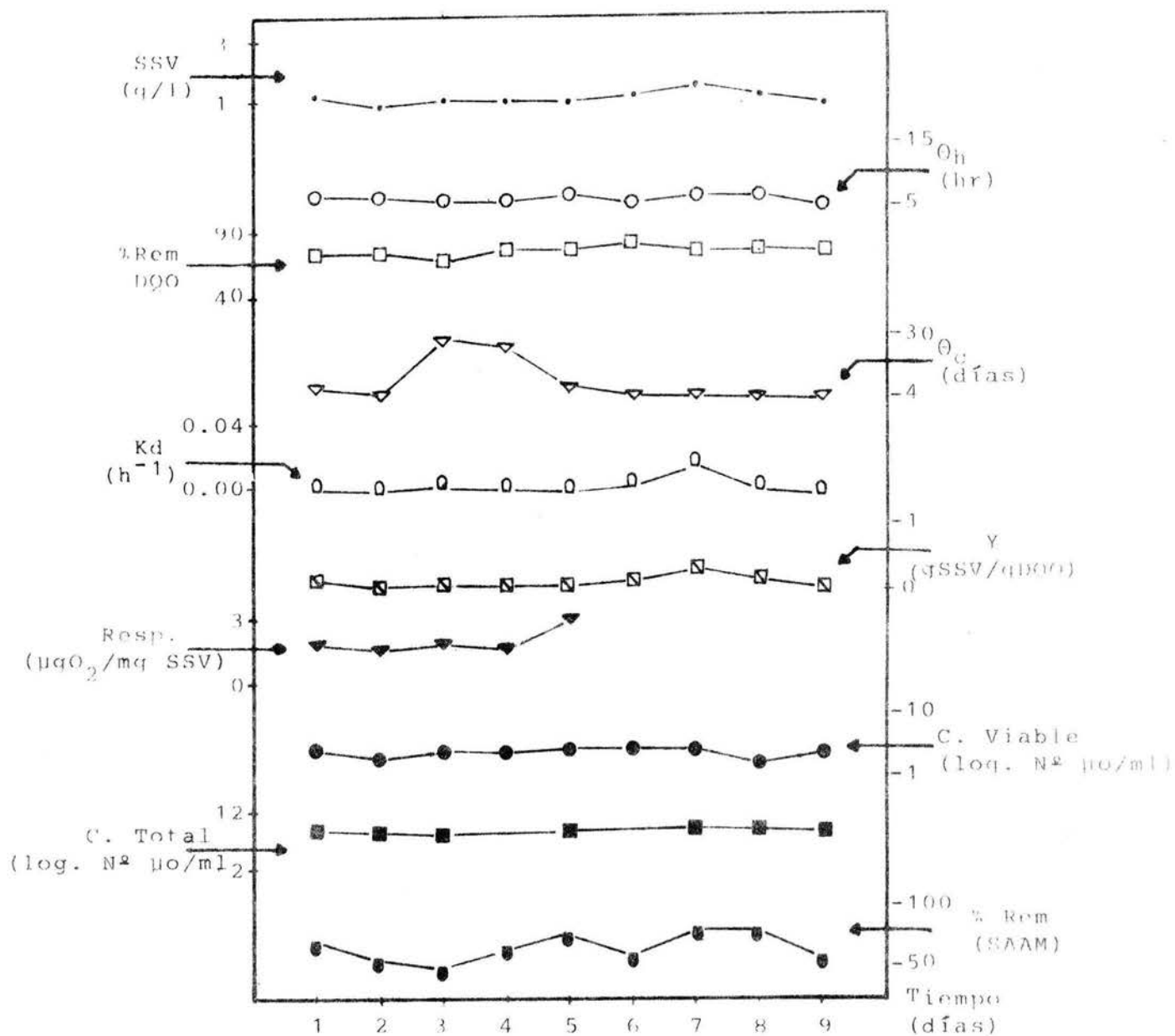
FIGURA 4



COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS
Y CUENTA VIABLE DE BACTERIAS

$$\theta_h = 6 \text{ hr} \quad \text{SSV} = 1.25 \text{ g/l} \quad S_0 = 500 \pm 25 \text{ mg/l}$$

FIGURA 5

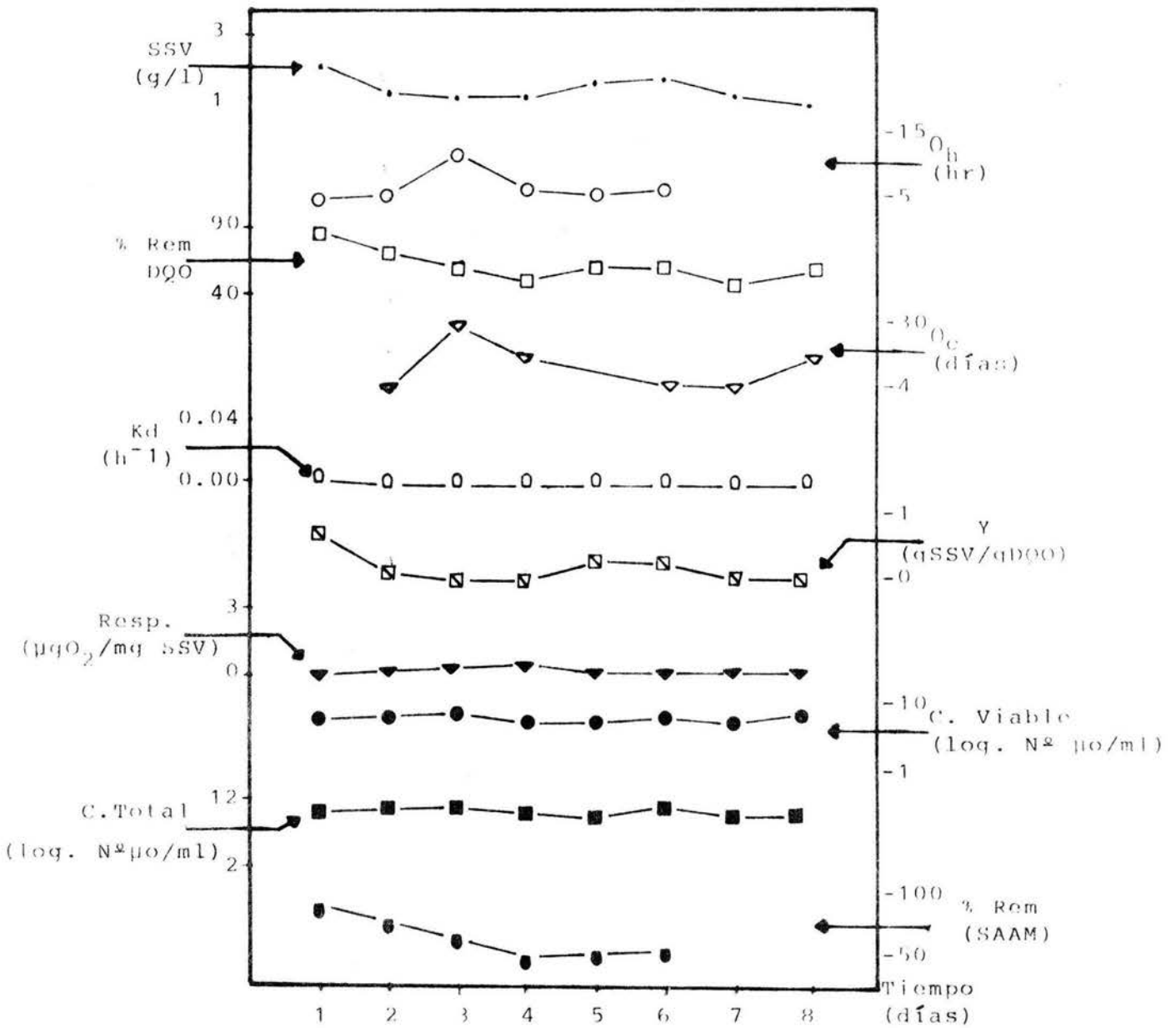


COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS
Y CUENTA VIABLE Y TOTAL DE BACTERIAS

$Q_h = 6 \text{ hr}$ $SSV = 1.25 \text{ g/l}$ $S_0 = 500 \pm 25 \text{ mg/l}$

SAAM = 10 mg/l

FIGURA 6



COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS
Y CUENTA VIABLE Y TOTAL DE BACTERIAS

$\theta_h = 6 \text{ hr}$ $SSV = 1.25 \text{ g/l}$ $S_0 = 500 \pm 25 \text{ mg/l}$

SAAM = 50 mg/l

T A B L A 7

VALORES DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS PARA EL EXPERIMENTO
SIN DETERGENTE * .

PARAMETRO	VALOR
Remoción DQO	80.4%
Tiempo de residencia hidráulico	5.88 horas
Incremento de Biomasa	0.32 g/l
Tiempo de residencia celular	4.8 días
Oxígeno disuelto	5.6 mg/l
Velocidad específica de crecimiento	0.0083 hr ⁻¹
Velocidad específica de muerte	0.0039 hr ⁻¹
Rendimiento celular	0.23 gSSV/g DQO
Velocidad de respiración	1.63 mgO ₂ /g SSV min.
Indice volumétrico de lodos	166 ml/g
Cuenta viable	1.6 x 10 ⁸ bact/ml.

* Promedio de 8 determinaciones.

T A B L A 8

VALORES DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS PARA EL EXPERIMENTO -
CON 10 mg/l DE SAAM * .

PARAMETRO	VALOR
Remoción DQO	80.4%
Tiempo de residencia hidráulico	6.05 horas
Incremento de Biomasa	0.16 g SSV/l
Tiempo de residencia celular	5.6 días
Oxígeno disuelto	5.6 mg/l
Velocidad específica de crecimiento	0.0076 hr ⁻¹
Velocidad específica de muerte	0.0033 hr ⁻¹
Rendimiento celular	0.11 g SSV/gDQO
Velocidad de respiración	2.5 mgO ₂ /g SSV min.
Indice volumétrico de lodos	143 ml/g
Cuenta viable	2.57 x 10 ⁴ bact/ml.
Cuenta total	1.28 x 10 ⁸ bact/ml.
Remoción de SAAM	67.8%

* Promedio de determinaciones.

T A B L A 9

VALORES DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS PARA EL EXPERIMENTO -
CON 50 mg/1 DE SAAM * .

PARAMETRO	VALOR
Remoción de DQO	62.5%
Tiempo de residencia hidráulico	6.0 horas
Incremento de biomasa	0.22 g SSV/1
Tiempo de residencia celular	7.22 días
Oxígeno disuelto	7.0 mg/1
Velocidad específica de crecimiento	0.004 hr ⁻¹
Velocidad específica de muerte	0.0002 hr ⁻¹
Rendimiento celular	0.20 g SSV/g DQO
Velocidad de respiración	0.31 mgO ₂ /g SSV min.
Indice volumétrico de lodos	244 ml/g
Cuenta viable	2.26 x 10 ⁸ bact/ml.
Cuenta total	3.16 x 10 ¹⁰ bact/ml.
Remoción de SAAM	55.5%

* Promedio de 8 determinaciones.

2. CRITERIOS DE AISLAMIENTO.

Para la primera etapa el criterio de aislamiento de cepas - consistió en aislar a las cepas que representaban caracterís - ticas diferentes, obteniéndose un total de 89 cepas en base a las características como son: morfología, tinción, movilidad y presencia de esporas, los resultados se presentan en - la Figura 7.

Para la segunda etapa el criterio seguido fué el de la fre - cuencia con la que se encontraba a los microorganismos. Se aislaron 12 cepas, 7 correspondientes a la primera parte de esta etapa (50 mg/1 de SAAM) y 5 a la segunda 10 mg/1 de - SAAM.

TERCERA FASE

1. CARACTERIZACION MICROBIANA.

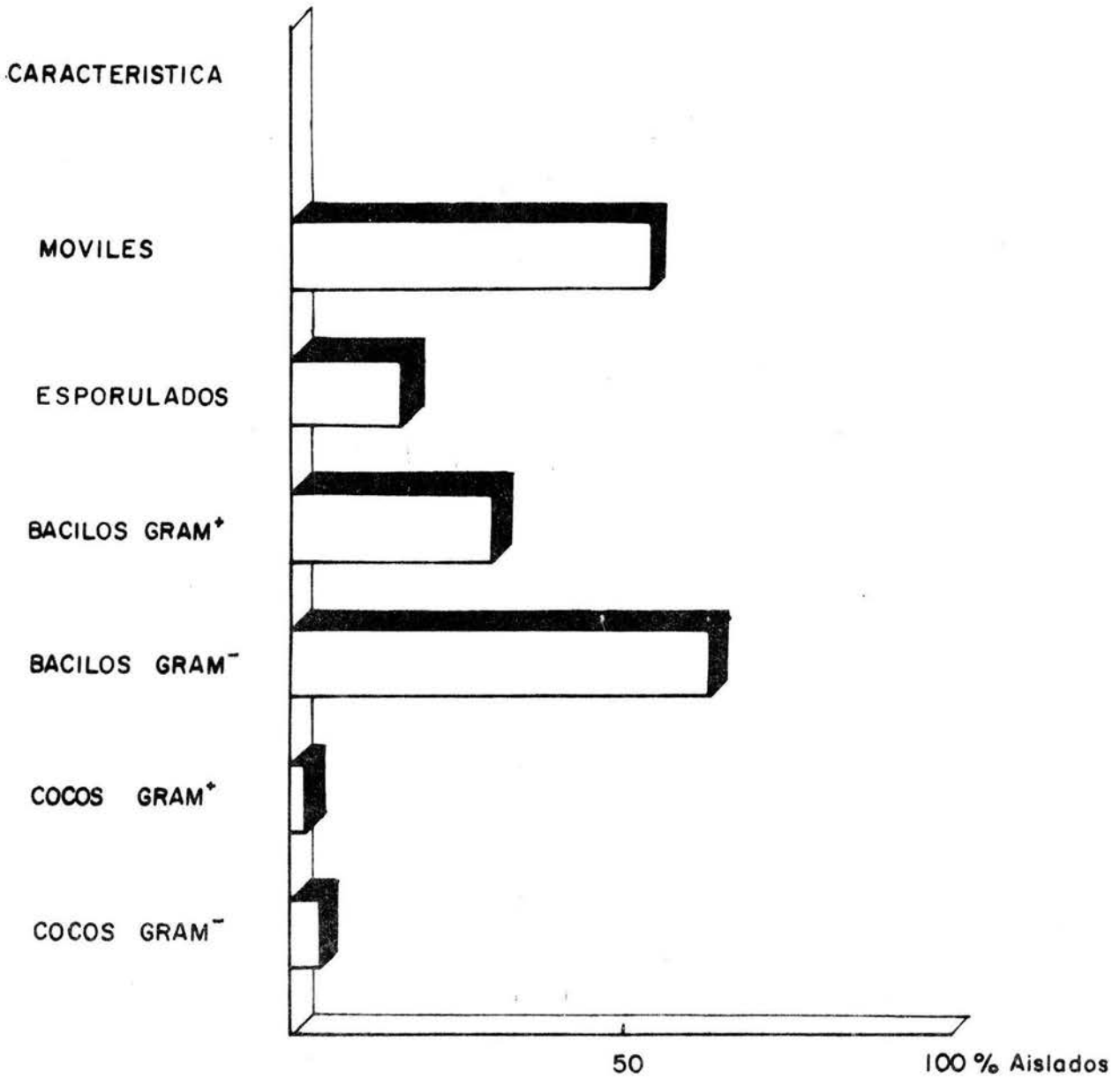
La caracterización a nivel de familia se realizó con las 89 cepas aisladas en la primera etapa. Los resultados obtenidos para las pruebas primarias, así como las familias a las que pertenecen se muestran en la Figura 8, en la cual se en - cuentran agrupadas todas las cepas, ésto en base a la simi - litud de su respuesta a las pruebas aplicadas. Además de - estas cepas se incluyen otras 15 a las que no se les aplica - ron las pruebas puesto que son bacilos Gram positivos esporulados, que es una característica distintiva del género - *Bacillus* (5).

En la caracterización a nivel de género se trabajó con 12 - cepas de bacterias que predominaron en el sistema cuando se usaron 10 y 50 mg de detergente. Los géneros encontrados - en función de las pruebas realizadas se muestran en la Figu - ra 9.

2. ACTIVIDAD EN LAS CEPAS AISLADAS SOBRE LOS DETERGENTES.

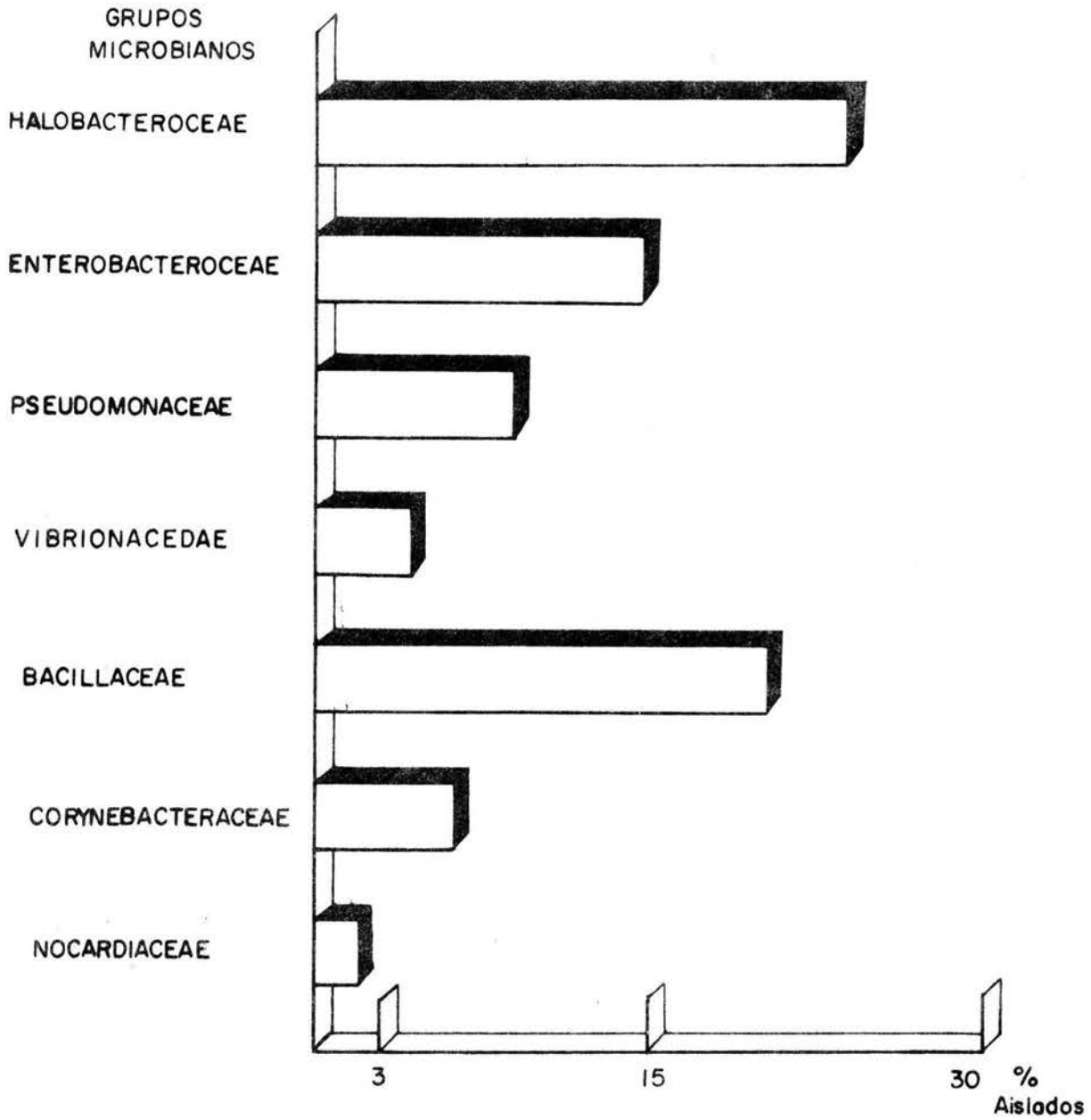
Los resultados de estas pruebas se agruparon según el género al que pertenecían las cepas probadas y que fueron únicamente 3; *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Bacillus*. Las Figuras 10, 11 y 12 muestran los resultados para *Pseudomonas*, *Aeromonas** y *Bacillus*, respectivamente cuando se observa concentración de detergente medido como SAAM con respecto al tiempo. Adicionalmente en la Figura 13 se muestra el comportamiento de los testigos empleados en ambos experimentos, así como el obtenido para las diferentes mezclas de cepas y lodos activados utilizados.

FIGURA 7



RELACION ENTRE MORFOLOGIA , TINCION, MOVILIDAD Y ESPORAS, POR LAS CEPAS AISLADAS EN LA PRIMERA FASE (89 CEPAS EN TOTAL) .

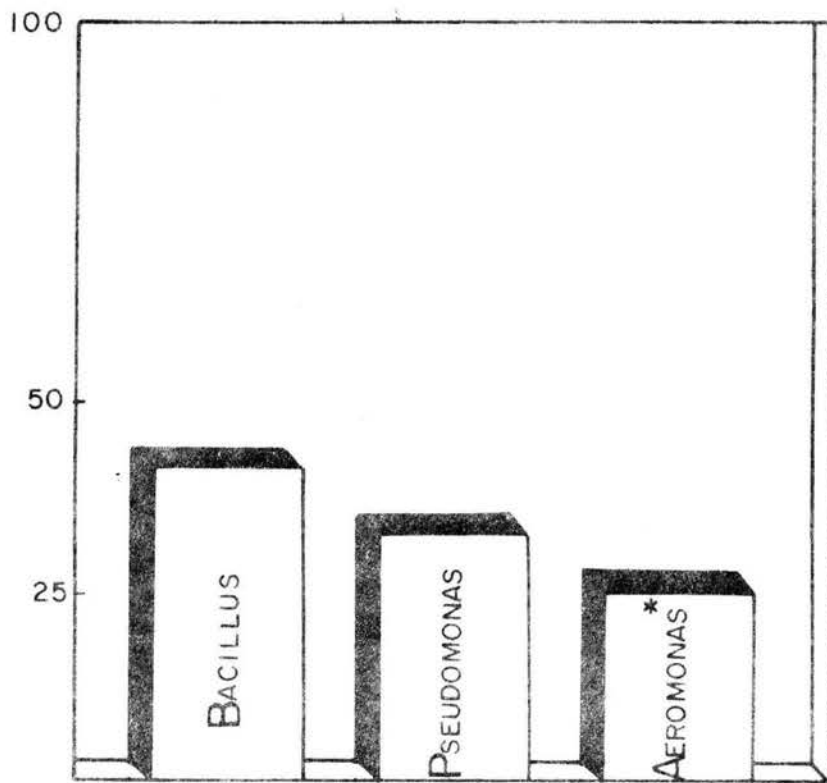
FIGURA 8



FAMILIAS ENCONTRADAS DURANTE LA PRIMERA FASE DEL TRABAJO.

% Aislados

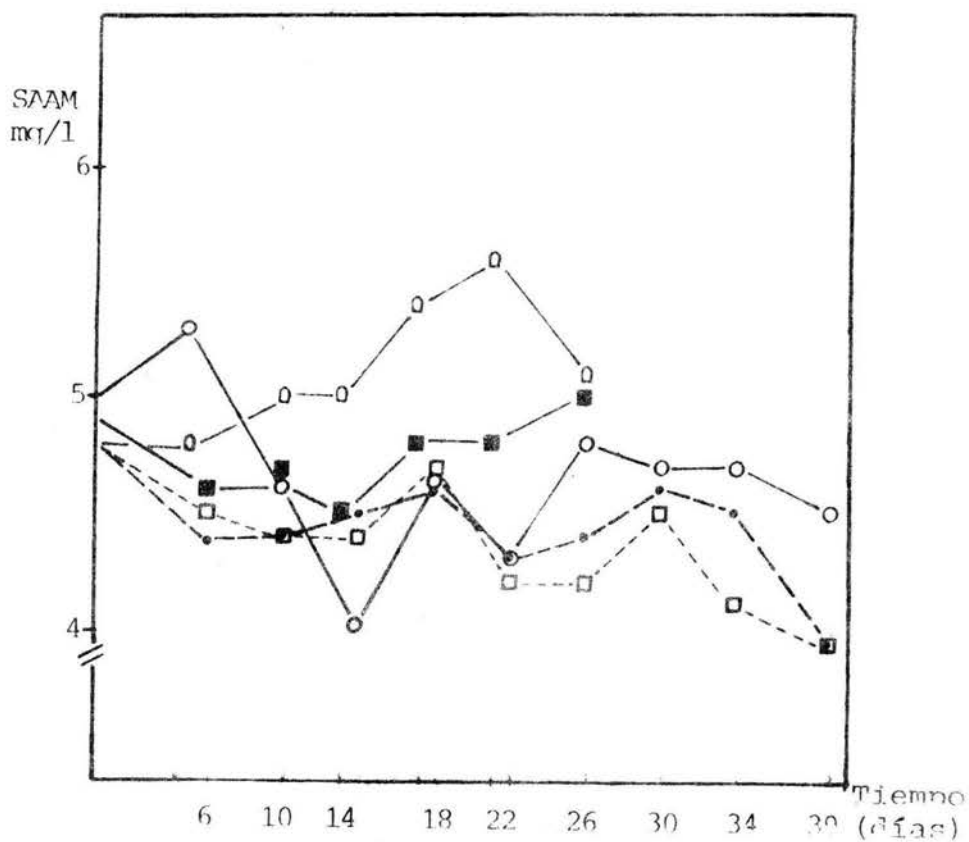
FIGURA 9



RELACION DE GENEROS AISLADOS EN LA 2a. ETAPA.

* PRESUNTIVAMENTE

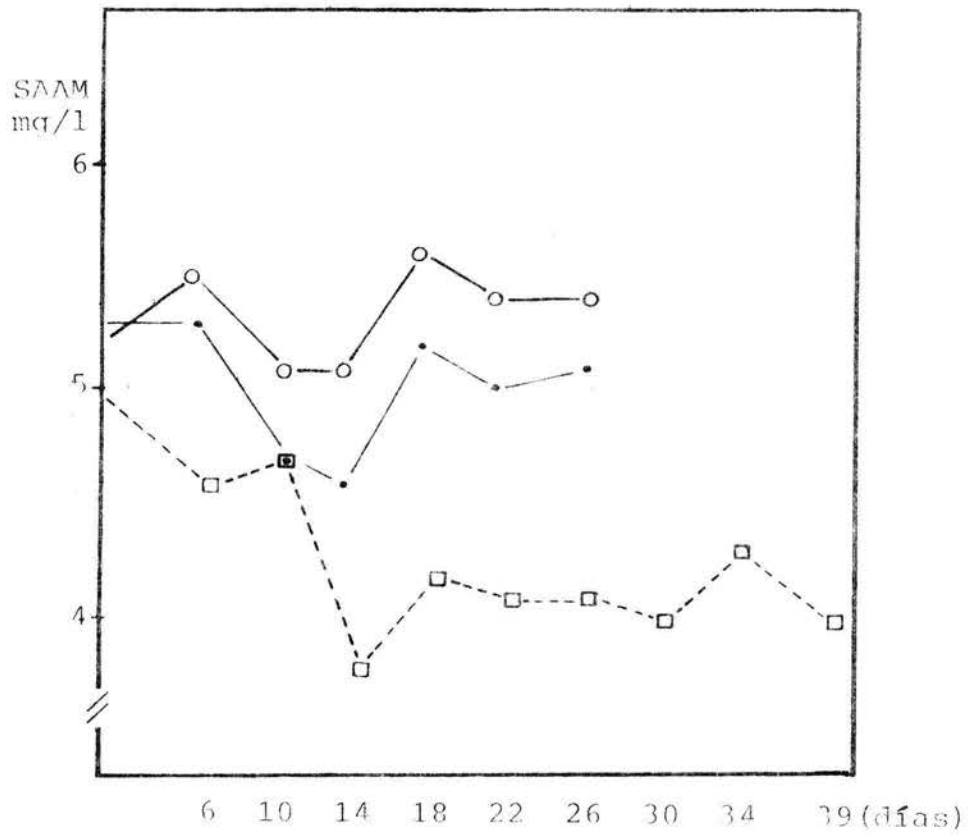
FIGURA 10



Efecto de las cepas del género *Pseudomonas* sobre los detergentes probados.

- cepa 5 (Exp. 1)
- cepa 6 (Exp. 1)
- cepa 9 (Exp. 2)
- cepa 10 (Exp. 2)
- cepa 11 (Exp. 2)

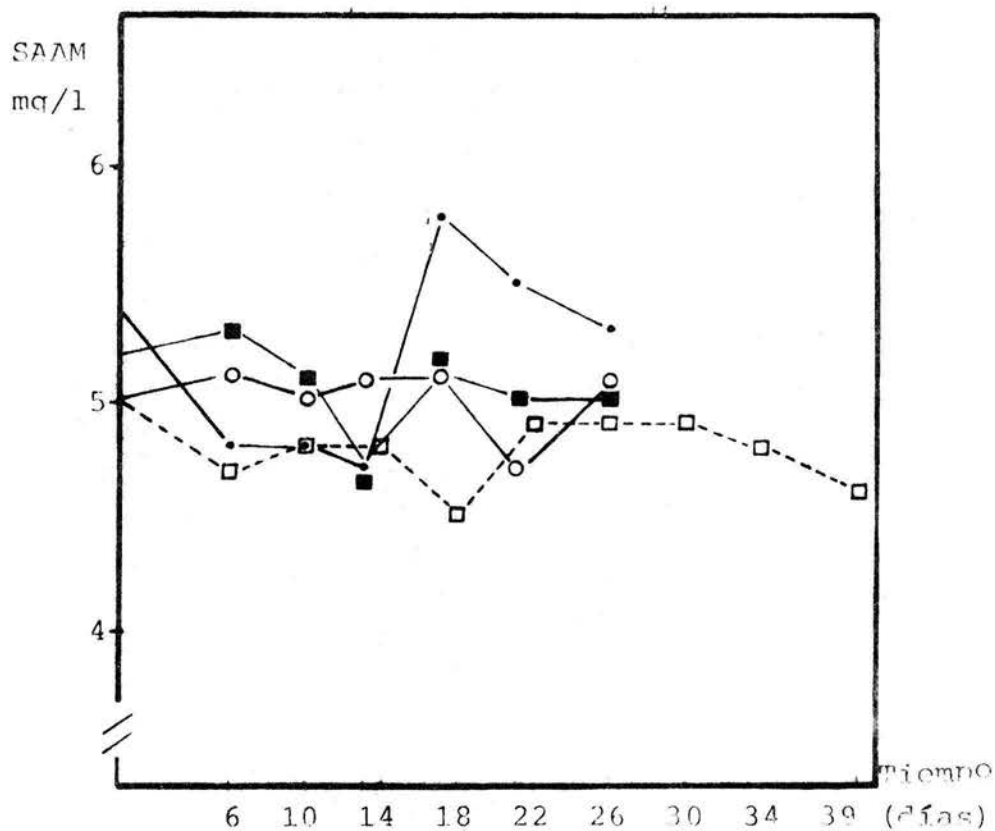
F I G U R A 11.



Efecto de las cepas del género *Acetome-
nax* sobre los detergentes probados.

- cepa 1 (Exp. 1)
- cepa 7 (Exp. 2)
- cepa 8 (Exp. 2)

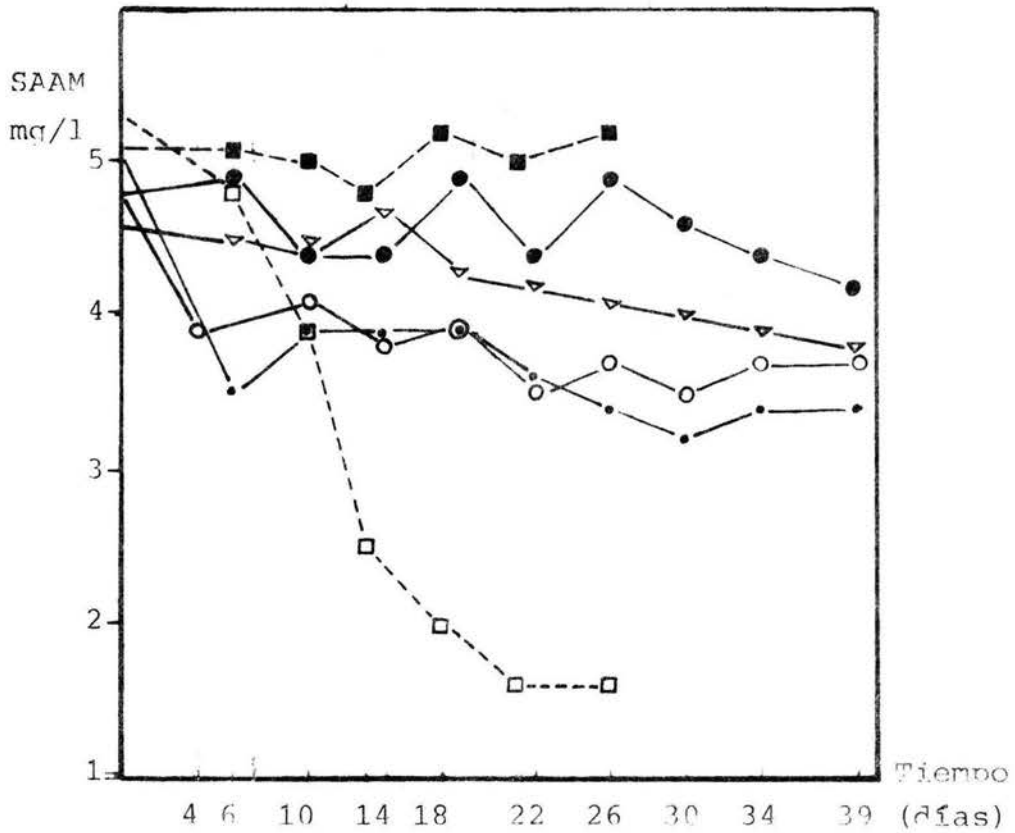
FIGURA 12



Efecto de las cepas del género *Bacillus* sobre los detergentes probados.

- cepa 2 (Exp. 1)
- cepa 3 (Exp. 1)
- cepa 4 (Exp. 1)
- cepa 12 (Exp. 2)

FIGURA 13



Características Degradativas del detergente empleado en presencia de diferentes sistemas microbianos.

- cultivo mixto (ceras 1-7)
- cultivo mixto (ceras 8-12)
- lodos activados (fase I)
- ▽—▽ cultivo mixto (ceras 8-12 + glucosa)
- lodos activados (fase II)
- lodo activado lavado.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

PRIMERA Y SEGUNDA ETAPA.

En los medios de cultivo probados, CGY y Agar Nutritivo, la cantidad y diversidad de microorganismos encontrada (Tabla 4) fué muy similar en ambos caso, lo cual dificultaba la elección. Sin embargo la literatura indica que dentro de los medios que se han utilizado para este tipo de cuentas ninguno puede soportar los requerimientos nutricionales de todos los tipos de bacterias en el sistema (42). Pike y Col (41) encontraron que pueden obtenerse cuentas óptimas de bacterias aerobias, heterótrofas en placas con Agar CGY, razón por la cual se utilizó este medio.

En cuanto al efecto de la dispersión de los flóculos de las muestras empleadas, los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que la cuantificación de microorganismos no tuvo un aumento significativo por efecto de la dispersión, sin embargo, se notó que las muestras dispersas presentaban una distribución más clara y ello facilitaba la observación, por lo que se decidió dispersar todas las muestras durante 2 minutos.

Finalmente los resultados encontrados al variar las temperaturas de incubación entre 20, 25 y 37°C (Tabla 6) demostraron que a 25°C se presentó el máximo crecimiento por lo que se utilizó esta temperatura para incubar todas las muestras.

1. EXPERIMENTOS EN LODOS ACTIVADOS.

a) Sin Detergente

Los resultados de los muestreos efectuados en las unidades experimentales para la primera etapa que se observan en la Figura 4 y la Tabla 7, muestran en general

una gran estabilidad de los parámetros ahí mencionados, lo que indica que se alcanzó un estado estacionario razonable, lo que se refleja en que los datos obtenidos son muy similares a los de las condiciones de operación establecidos y que son:

$$\theta_h = 6.0 \text{ horas}$$

$$S_0 = 500 \text{ mg/l}$$

$$SSV = 1.25 \text{ g/l}$$

En forma adicional dicho estado estacionario se manifiesta por la concentración de los sólidos suspendidos volátiles, lo que da por resultado un tiempo de residencia celular promedio de 4.8 días que corresponde a una velocidad específica de crecimiento observada de 0.20 días^{-1} y un rendimiento celular de 0.23 gSSV/gDQO . Eckenfelder (21) propone que:

$$\frac{1}{\theta_c} = \mu_c - K_d \dots \dots \dots (5)$$

Lo que da:

$$\frac{1}{\theta_c} + K_d = \mu_c \dots \dots \dots (6)$$

De la Tabla 7 $K_d = 0.093 \text{ días}^{-1}$ lo que implica que $\mu_c = \frac{1}{4.8} + 0.093$ que es igual a 0.301 días^{-1} que es el valor de μ_c calculado y que corresponde a aproximadamente el 75% de la velocidad máxima reportada en otro estudio (24). La relación entre K_d y μ_c es igual a 3.23, lo que quiere decir que el crecimiento es 3 veces mayor que la muerte celular, lo cual se refleja tanto en los valores de respiración, $1.63 \text{ mgO}_2/\text{mgSSV}$, como en los del índice volumétrico que es de 166 ml/g . es importante mencionar que la remoción del 80% en base a DQO corresponde a una remoción de casi 100% de DBO.

Las familias de bacterias encontradas así como su frecuencia de aparición se muestran en la Tabla 10. La presencia de familias tales como: Enterobacteraceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae y Bacillaceae en un sistema de lodos activados puede considerarse esperada dado que se trata de microorganismos que tienen la capacidad de desarrollarse en habitats muy diversos puesto que pueden utilizar una variedad considerable de compuestos, ésto debido a que presentan un metabolismo muy versátil, característica que les confiere ventajas sobre otro tipo de microorganismos, de ahí que estas familias se consideren casi cosmopolitas. En cuanto a la aparición de Halobacteraceae, Corynebacteriaceae y Nocardiaceae, aunque estas familias no presentan una gama de requerimientos nutricionales exactos, son menos versátiles que las familias antes mencionadas, sin embargo todas ellas son capaces de desarrollarse en medios sintéticos con extracto de carne y peptona que son dos de los componentes del agua residual sintética utilizada en este estudio. Así se tiene que la predominancia de la familia Halobacteraceae se debe a que los microorganismos pertenecientes a este grupo se desarrollan mejor en presencia de peptona (53).

Finalmente puede decirse que tanto los parámetros físico-químicos del sistema así como las familias encontradas correspondientes a esta fase experimental concuerdan ampliamente con la literatura reportada (33, 36, 42 y 43).

b) Con Detergente.

Al observar los resultados mostrados en la Figura 5 y la Tabla 8 para 10 mg/l de detergente se aprecia que la eficiencia de remoción de materia orgánica es practica-

mente igual a la obtenida sin detergente, sin embargo hubo cambios en algunos de los parámetros cinéticos del sistema; la velocidad de crecimiento disminuyó en un 12% y la velocidad de respiración aumentó en un 50%, la cuenta viable disminuyó en cuatro órdenes de magnitud y el rendimiento descendió en 50%.

Si se toma en cuenta que la eficiencia del sistema no disminuyó, se puede considerar que la velocidad específica de utilización del sustrato (γ) tampoco presentó un descenso (ya que los sólidos se mantuvieron constantes), razón por la cual y de acuerdo con la ecuación 7 (52):

$$\gamma = m - \frac{\mu}{Y_g} \dots\dots\dots (7)$$

De dicha ecuación se observa que si disminuyeron μ e Y_g , el coeficiente m tuvo que haber aumentado. Por otra parte si se observa la ecuación 8:

$$Q_{O_2} = m_0 + \frac{\mu}{Y_g} \dots\dots\dots (8)$$

Se puede ver fácilmente que el aumento en la velocidad de respiración de 1.63 (experimento testigo) a 2.5 mgO₂/g SSV min. es debido al aumento en la energía de mantenimiento y al descenso en el rendimiento. Físicamente ello indica que el sistema ha entrado en un estado de "stress" debido a la presencia del detergente que provoca cierta intoxicación y a su vez hace que aumente el coeficiente de respiración (Tabla 8), dicho aumento se justifica si se toma en cuenta que la resistencia al detergente por las diversas especies es diferente en cada una y esto origina una sucesión que da lugar al establecimiento de una nueva población que provoca cambios en los parámetros cinéticos del sistema. Lo anterior es más notorio si se observa el desplazamiento poblacional mostrado en la Tabla 11. Como se observa de las siete familias ini-

ciales en el experimento sin detergente sólo 3 resistieron el efecto tóxico de este compuesto (Tablas 10 y 11).

En el experimento efectuado con 50 mg/l de detergente (Figura 6 y Tablas 9 y 11) se observa un marcado descenso en la eficiencia de remoción de materia orgánica y un descenso de casi el 50% de la velocidad de crecimiento con respecto al experimento testigo y la presencia de las mismas familias que en el experimento con 10 mg., aunque con más predominancia de la familia Bacillaceae. Lo anterior se puede intentar explicar en función de las elevadas cuentas viable y total que se encontraron en este experimento y que indica que aparentemente a esta relación de microorganismos hay mayor resistencia a la concentración tan alta que se empleó en el experimento, pero que tiene asociado a ella un descenso en la velocidad de degradación tanto de materia orgánica como de detergente así como el aumento en el índice volumétrico de lodos, lo que se confirma al observar la Tabla 9. El hecho de tener cuentas viable y total altas indica que la población se adaptó al sistema, aunque con una baja eficiencia porque el aumento en el índice volumétrico de lodos hace pensar que la dispersión del sistema aumentó debido al descenso en la tensión superficial y que ello da lugar a que los flóculos se dispersen de manera más eficiente y den como resultado mayores cuentas de microorganismos (42).

TERCERA ETAPA.

1. CARACTERIZACION MICROBIANA.

Los resultados obtenidos para caracterizar a la población, constituida por 89 cepas muestran que estas pertenecen a 7 familias que son: Nocardiaceae, Corynebacteriaceae, Vibrionae

T A B L A 10

FRECUENCIA DE APARICION DE LAS FAMILIAS
ENCONTRADAS EN EL MUESTREO SIN DETERGENTE

Familia	Nº Cepas	% Relativo
Halobacteraceae	21	23.6
Enterobacteraceae	13	14.6
Pseudomonadaceae	8	9.0
Vibrionaceae	4	4.5
Bacillaceae	16	20.0
Corynebacteraceae	12	13.5
Nocardiaceae	2	2.2
Total	76	100.0

I A B L A 11

FRECUENCIA DE APARICION DE LAS FAMILIAS
ENCONTRADAS EN EL MUESTREO CON DETERGENTE

Familia	10 mg/l	% Relativo	50 mg/l	% Relativo
Vibrionaceae	1 cepa	20	2 cepas	40
Bacillaceae	1 cepa	20	3 cepas	60
Pseudomonadaceae	3 cepas	60	2 cepas	40

ceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Halobacteraceae y Bacillaceae en la Figura 8 se muestran los porcentajes de cada familia en función del número total de cepas aisladas.

En la Figura 7 pueden observarse las características de las cepas aisladas en la primera etapa, en donde puede apreciarse que existe una predominancia en morfología celular del tipo de los bacilos con respecto a los cocos siendo esta diferencia en valores de porcentaje de 93.3 y 6.7 respectivamente, encontrándose también en la respuesta a la tinción de Gram una fuerte predominancia de los Gram negativos tanto en cocos como en bacilos, 65% G^- y 35% para G^+ respectivamente. En la misma Figura se observa también características de movilidad con 54.3% y la presencia de esporas con 16.8%, ésto coincide perfectamente con la literatura ya que diversos autores citan que la población característica de lodos activados está constituida principalmente por bacilos Gram negativos, además de que se ha demostrado que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los detergentes aniónicos que las Gram negativas (9, 42, 52 entre otros).

Esta población pertenece a la primera etapa de trabajo cuando se experimentó sin detergente y en donde se realizaron cambios de sucesión poblacional, sin embargo se puede decir que el número total de cepas aisladas en este experimento son representativas de la población, en las condiciones de trabajo en las que se realizó este experimento y el hecho que apoya ésto es que la bibliografía para este tipo de sistema concuerda ampliamente.

Por otro lado en la Figura 9 se muestran los géneros encontrados en la segunda etapa, en donde se observa que son 3 los géneros aislados: *Aeromonas*^{*}, *Pseudomonas* y *Bacillus*. En el caso de *Aeromonas*^{*} se reporta de esta manera (*), puesto que los resultados de las pruebas secundarias no concuer-

dan con un género específico, sin embargo se ubican dentro de este grupo, por ser éste el género al que más se asemeja. Se encontró que dentro de estos géneros predominantes y resistentes a las concentraciones de detergente utilizadas, *Pseudomonas* fué el que presentó mayor secuencia de aparición.

2. ACTIVIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS SOBRE EL DETERGENTE.

En los dos experimentos realizados en esta etapa del trabajo el primero de ellos, como puede observarse en las Figuras 10- a la 13 tiene un tiempo de experimentación de 26 días, debido a que el testigo de lodos activados presentó una alta remoción de detergente para este tiempo de muestreo.

En la Figura 10 se muestra el comportamiento de *Pseudomonas*, - puede observarse que en el caso del experimento 1 el comportamiento es muy irregular mientras que en el segundo se nota claramente una tendencia bien definida, así se tiene que para el último muestreo a los 39 días se ha removido el 22% de detergente.

En las Figuras 11 y 12 se muestra que los géneros *Aeromonas** y *Bacillus* tienen comportamientos similares al descrito anteriormente con remociones de 20 y 18% respectivamente.

En la Figura 13 se muestra el comportamiento que los diferentes testigos empleados en los dos experimentos, para el primer experimento se utilizaron dos testigos: lodos activados y un cultivo mixto, como ya se mencionó en el caso de los lodos se observa un comportamiento bien definido mientras que en el caso del cultivo mixto éste se mantuvo sin actividad a lo largo del experimento. En función de estos resultados el segundo experimento tiene, además de estos testigos, otros para comprobar algunas inferencias hechas a partir del primer experimento, así se tiene que el lodo activado denominado "lavado"

tuvó una degradación del 30%, en este caso es importante hacer notar que lo que se entiende por lavar el lodo es tratar de eliminar, dentro de lo posible, la materia orgánica existente en la muestra que se prepara para tomar el inóculo, sin embargo lo que se hizo fué eliminar una parte de dicha materia y concentrar el número de microorganismos, si tomamos en cuenta ésto se puede explicar la diferencia entre los dos testigos de lodos activados y que uno de ellos presente una mayor degradación del detergente debida a un aumento poblacional.

Los testigos de lodos activados, en ambos casos, presentan diferencias muy marcadas, así se tiene remociones de 72 y 22% - ésto podría explicarse por el origen del inóculo, ya que no es el mismo en los dos casos, en el primer caso se utilizó un inóculo de las unidades experimentales con un tiempo de adaptación del orden de meses, mientras que el segundo pertenece a un inóculo recién traído de la planta de tratamiento y aunque estuvo en la unidad experimental por algunos días no puede hablarse de una población adaptada a las condiciones de operación, de ahí que el primer testigo presente una remoción de detergente mucho mayor en menos tiempo que el segundo testigo.

En los cultivos mixtos de los dos experimentos el comportamiento fué muy similar, la única diferencia radica en que en el experimento 2 tuvó un ligero incremento la actividad microbiana debido a un período mayor de experimentación.

En el caso del cultivo mixto más glucosa, aunque si bién el objetivo de este testigo estuvo en función de los resultados del primer experimento, en donde al no haber actividad se pensó que quizás las cepas necesitaran de alguna fuente de energía para iniciar la degradación, que aunque si aumentó un poco, no fué muy significativo este cambio y se degradó el 24%

Finalmente como conclusión general de esta última etapa del trabajo puede decirse que si bien las cepas empleadas en este experimento degradaron al detergente, por lo menos parcialmente, no puede decirse que sean bacterias capaces de degradarlo completamente, por lo que se confirma que el detergente utilizado al no cumplir con los criterios ya establecidos (39) no es biodegradable en las condiciones en las que se realizó este trabajo. Sin embargo ello hace pensar en la necesidad de probar la acción combinada de las cepas mediante estudios de co-metabolismo y/o protocooperación, así como las condiciones ambientales del sistema de lodos activados para que la remoción se lleve a cabo.

Los resultados de este trabajo confirman la importancia y necesidad de un cambio inmediato del principio activo de los detergentes utilizados en el país, es decir reemplazar a los ABS por LAS, esto por un lado y por otro si en nuestro país como consecuencia de no tener una política bien definida sobre la conservación del ambiente y sí además la empresa que fabrica la materia empleada en las formulaciones de los detergentes de PEMEX, se producen y usan los detergentes con cadenas olefínicas ramificadas con los consecuentes problemas que originan y sí además la producción de detergente y productos de limpieza se incrementó en un 100% entre 1973 y 1979 y finalmente que la posibilidad de un cambio a corto plazo no se ve como una alternativa inmediata, todo esto hace necesario seguir investigando sobre el tema, para encontrar las condiciones de degradación más óptimas posibles para evitar todos los efectos que este compuesto está causando en el ambiente.

A P E N D I C E

COMPOSICION Y FORMA DE PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1.- AGUA RESIDUAL SINTETICA

Peptona de Gelatina.....	160 mg
Extracto de Carne.....	110 mg
Urea.....	30 mg
NaCl.....	7.5 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	4.0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	2.0 mg
Agua Destilada.....	1000 ml

Se disuelven los ingredientes en agua y se esterilizan a 12°C durante 15 minutos.

2.- MEDIO CASITONA-GLICEROL-EXTRACTO DE LEVADURA

Casitona.....	5 g
Glicerol.....	5 g
Extracto de Levadura.....	1 g
Agar.....	15 g
Agua Destilada.....	1000 ml
pH.....	7.2

Disolver todos los ingredientes en el agua. Calentar a ebullición, ajustar el pH y envasar para esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.- MEDIO AGAR NUTRITIVO

Peptona de Gelatina.....	5 g
Extracto de Carne de Res.....	3 g

Agar.....15 g
Agua Destilada.....1000 ml
pH.....6.8

Se disuelven los ingredientes en agua, se calientan a ebullición durante uno o dos minutos, se ajusta el pH y se esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

MEDIOS PARA MOVILIDAD

4.- MEDIO SOLIDO PARA MOVILIDAD

Gelatina.....80 g
Peptona.....10 g
Extracto de Carne.....3 g
Cloruro de Sodio.....5 g
Agar.....4 g
Agua Destilada.....1000 ml

Agregar la gelatina a el agua, calentando hasta disolver posteriormente agregar los demás ingredientes, uno por uno y poco a poco. Calentar a ebullición hasta incorporar todos los ingredientes. Envasar en tubos de 13 x 100 con 3-5 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos.

5.- MEDIO DE CRAIGIL

Extracto de levadura.....3 g
Glucosa.....20 g
Agar.....5 g
Agua Destilada.....1000 ml

Disolver todos los ingredientes calentandolos a ebullición, distribuirlos en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.- MEDIO DE SIM

Peptona de Caseína.....20 g
Peptona de Carne.....6.1 g
Sulfato de Hierro y Amonio...0.2 g
Tiosulfato de sodio.....0.2 g
Agar.....3.5 g
Agua Destilada.....1000 ml

Disolver los ingredientes, calentandolos a ebullición, distribuirlos en tubos de 13 x 100 y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

7.- MEDIO B-105

Triptosa.....10 g
Cloruro de Sodio.....5 g
Agar.....5 g
Agua Destilada.....1000 ml

Disolver los ingredientes, calentandolos a ebullición, distribuirlos en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

MEDIOS PARA LA PRUEBA O/F

8.- MEDIO DE HUGH-LEIFSON

Peptona.....2 g
Cloruro de Sodio.....5 g
Fosfato de Potasio Dibasico...0.3 g
Agua Destilada.....1000 ml
Azul de Bromotimol al 0.2%...15 ml
Glucosa.....10 g

Se disuelven los ingredientes calentandolos en el agua a excepción de la glucosa y el azul de bromotimol (Solución alcohólica). Posteriormente se ajusta a pH 7.2 y se agrega el indicador y el azúcar. Envasar en tubos de 15 x 150 hasta 2/3 de su volumen y esterilizar a 11°C por 10 minutos.

9.- MEDIO BASE ROJO DE FENOL CON AZUCAR

Mezcla de Peptonas.....10 g
Cloruro de Sodio.....5 g
Rojo de Fenol.....0.025 g
Azúcar.....2 g
Agua Destilada.....1000 ml

Se suspenden todos los ingredientes calentandolos a ebullición, se ajusta a pH 7.2 y se esteriliza a 115°C por 10 minutos

10.- MEDIO BASE AZUL DE BROMOTIMOL

Fosfato Dihidrogenado de Amonio1 g
Fosfato Dipotasico.....1 g
Sulfato de Magnesio.....0.20 g
Azul de Bromotimol.....0.08 g
Agua Destilada.....1000 ml

Suspender todos los ingredientes, calentandolos a ebullición, se distribuye en tubos de hemólisis y se esteriliza a 115°C durante 10 minutos.

MEDIOS PARA CATALASA Y OXIDASA

11.- AGAR PARA INFUSION DE CEREBRO CORAZON (BHI)

Infusión de Cerebro de Ternera200 g
Infusión de Corazón de Res250 g

Mezcla de Peptonas.....10 g
Cloruro de Sodio.....5 g
Fosfato Dipotásico.....2.5 g
Dextrosa.....2 g
Agar.....15 g

Suspender todos los ingredientes en el agua, calentando los a ebullición durante un minuto y esterilizar a 115°C durante 15 minutos.

MEDIOS PARA REQUERIMIENTOS DE OXIGENO

12.- MEDIO DE TRIPTONA Y EXTRACTO DE LEVADURA

Triptona.....10 g
Extracto de Levadura.....5 g
Glucosa.....1 g
Fosfato de Potasio Dibasico..5 g
Agar.....15 g
Agua Destilada.....1000 ml

Suspender todos los ingredientes calentandolos a ebullición y distribuyendolos en tubos de hemólisis esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

13.- CALDO NUTRITIVO

Peptona de Gelatina.....5 g
Extracto de Carne de Res.....3 g
Agua Destilada.....1000 ml

Disolver los ingredientes en el agua, distribuir en tubos de hemólisis y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

MEDIO PARA REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

14.- MEDIO LASCELLES

Solución A

Glutamato Sodico Monohidratado.	3.8 g
Acido D-L Málico.....	2.7 g
Fosfato de Sodio Dibasico.....	0.5 g
Fosfato de Sodio Monobasico....	0.5 g
Acido Nicotinico.....	1 mg
Clorhidrato de Tiamina.....	1 mg
Biotina (1 mg/10 ml de Agua Dest.)	0.1 ml
Fosfato Dihidrogenado de Amonio	0.8 g
Agua Destilada.....	900 ml
pH.....	6.8

Solución B

Sulfato de Magnesio.....	0.2 g
Cloruro de Calcio.....	40 mg
Agua Destilada.....	100 ml
pH.....	6.8

Disolver por separado los ingredientes de las 2 soluciones, ajustar el pH con Hidroxido de Sodio 1 N, Mezclarlas y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

MEDIOS PARA PRUEBAS SECUNDARIAS

15.- HIDROLISIS DE ALMIDON

a) Almidón.....	2 g
Agua Destilada.....	100 ml

Disolver el almidón en el agua, distribuir en tubos de hemólisis y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

- b) Almidón.....0.3 g ó 3 g
- Agar Nutritivo.....23 g
- Agua Destilada.....1000 ml

Disolver los ingredientes en el agua calentando a ebullición, esterilizar a 121°C por 15 minutos.

16.-HIDROLISIS DE CASEINA

- Leche Descremada.....100 g
- Agua Destilada.....1000 ml

Mezclar los ingredientes calentandolos a ebullición, esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

17.- HIDROLISIS DE GELATINA

- Gelatina.....2 g
- Agua Destilada.....1000 ml

Mezclar los ingredientes calentandolos a ebullición, - distribuir en tubos de hemólisis y esterilizar a 121°C por 15 min.

18.- REDUCCION DE NITRATOS A NITRITOS

- Nitrato de Potasio.....1 g
- Extracto de Carne.....10 g
- Peptona.....10 g
- Cloruro de Sodio.....5 g
- Agua Destilada.....1000 ml

Mezclar los ingredientes con el agua, calentandolos a

ebullición, distribuir en tubos de hemólisis. Cuando se ha obtenido el crecimiento añadir 1 ml de una solución de 8 g de ácido sulfanílico en un litro de ácido acético 5 N y se mezcla, se añade gota a gota una solución de 5 g de dimetil-alfanaftilamina en un litro de ácido acético 5 N. Una coloración rosa, roja o castaña indica la presencia de nitritos, si la prueba es negativa se añaden 2-4 mg de limadura de zinc para determinar si los nitratos no han sido reducidos. El hidrógeno nascente que se forma reduce los nitratos a nitritos, lo que produce una coloración rosa.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Adamse, A. 1968 "Formation and final composition of the bacterial flora of a diary waste activated sludge" . Water Research 12: 665
- 2.- Allen, J.M. 1981. "Microbiology of ground water" Journal of water Pollution Control Federation" 53: 1109-1111
- 3.- APHA WPCF AWWA. Standart methods for the examination of water and wastewater 1975 14th edition
- 4.- Benedict, R.G. & Carlson D.A. 1971 " Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge" Water Research 5: 1023
- 5.- Bergey's. 1974 Manual of determinative bacteriology Eighth edition Ed. Board the williams & Wilkins company Baltimore
- 6.- Bernarde, A.M., & B.W. Koft and Horvarth and Sheulis. 1965 "Microbial degradation of the sulfonate of dodecyl bencene sulfonate" Applied Microbiology. 13 (1): 103-105.
- 7.- Blancarte, Z.A. 1981 "Cinetica de remoción de detergentes de uso industrial en un sistema de lodos activados" Tesis profesional E.N.C.B. IPN
- 8.- Butterfield, C.F. 1935 "Studies of Sewage purification II a Zoog~~lea~~ea-forming bacterium isolated from activated sludge" Public Health Report 50 671-684.
- 9.- Cain, R.B. 1977 "Surfactant Biodegradation in waste water" en: Treatment Industrial Effluents. Ed. by Callely, G.A., Forster, F.C. & Stafford.
- 10.- Calaway, W.T. 1968 "The metazoa of waste treatment process Rotifers". Journal of Water Pollution Control Federation 40: 412-422.
- 11.- CIECCA_SARH. 1980 Manuales para el analisis de aguas y aguas de desecho.

- 12.- Cibulka, J.J. & G.W. Malaney. 1967 "Experimental conditions in the study of the physiological of activated sludge". Purdue conference. 22: 78-91.
- 13.- Collins, C.H. 1969 Métodos Microbiológicos Ed. Acribia Zaragoza España.
- 14.- Cowan, S.T. 1974 Manual for identification of medical bacteria 2^a Ed. Cambridge University Press London 45-122.
- 15.- ✓ Coler. 1969 "Microbial populations as determinants in protozoan succession" Water Research 3: 149-156.
- 16.- Curds, R.C. 1971. "Continuos monoxenic culture of *Tetrahymena pyriformis*" Journal of General Microbiology. 66: 95-108
- 17.- Curds, R.C. 1968 "An experimental study of the role of the Ciliated protozoa in activated sludge process". Journal of Water pollution Control. 67: 312-329.
- 18.- De Vries, W. y col 1970 " Molar growth yield and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L 3 in batch cultures and in continuos cultures. Journal of General Microbiology 63: 333-345.
- 19.- Dias, F.F. & Bath, J.V. 1964 "Microbial Ecology of activated sludge I Dominant Bacteria " Applied Microbiology 12: 412
- 20.- Dychdala, G.R. 1968 "Acid anionic surfactant sanitezers" In Desinfection, sterilization and preservation. Lea & Febiger, Philadelphia Press 253-256
- 21.- Eckenfelder, W.W. & Ford, D.L. 1968 Laboratoty and design procedures for wastewater treatment process Austin Texas.
- 22.- Espinosa, V.R. y col 1982 "Patrones de degradación de detergentes de uso común en México". Memoria del 2^{do} congreso sobre problemas ambientales de México.
- 23.- Fischer, W.K. 1958 "Action of high concentrations of anionic surfactants on bacteria" Archives in Microbiology. 31: 33-49

- 24.- Flores, M.T. y col 1982. "Estudio de la degradación de detergentes en un sistema de lodos activados" Memorias del 2^{do} congreso sobre problemas ambientales del México.
- 25.- Glossman, H.N. 1948 "Surface Active agents and their application in bacteriology" Bacteriological review. 12: 105-148.
- 26.- Goodfellow, M & Gray, T.R. 1966 " Identification methods for microbiologist" parte "A" (Ed. B M. Gibbs and F.A. Skinner) pp117-123 Academic Press, London.
- 27.- Harris R.F. & L.E. Sommers 1968 "plate dilution frequency technique for assay of microbial ecology" Applied Microbiology 16 (2): 330-334.
- 28.- Hawes 1963. A.A. "The ecology of waste water treatment" Mac Millan, New York.
- 29.- Higgins, F.J. and R.G. Burns 1975 "The chemistry and microbiology of pollution" Academic Press.
- 30.- Horvarth, R.S. & B.W. Koft. 1972 "Degradation of the alkyl bencene sulfonate by *Pseudomonas* species" applied microbiology. 23 (2): 407-414.
- 31.- Jonjitud, F.V., E. Acosta y C. Hernandez. 1975. "Evaluación de los estudios sobre el ABS y el LAS y efectos en la agricultura y la fauna" 5a. etapa S.R.H. Subsecretaría de planeación .
- 32.- Laskin. I.A. and Lechevalier A.H. CRC Handbook of Microbiology 2nd edition Vol I Bacteria CRC Press Inc Ohio. 1977.
- 33.- Lighthart, B, & Oglesby T.R. 1969 "Bacteriology of an activated sludge wastewater treatment plant. A guide to methodology" Journal of Water pollution control federation 44: 267-281.
- 34.- Margaritis, A.. Creese, E. 1979 "Toxicity of surfactants in the aquatic enviroment: a review" Waste treatment and utili

zation Ed. by Murray Moo-Young and J.G. Forguhat Pergamon press.

- 35.- McKinney, R.E. & M.P. Horwood. 1952. "Fundamental approach to the activated sludge. I. Floc-producing bacteria" Sewage and Industrial Wastes. 24: 117-123.
- 36.- McKinney R.E. & R.G. Wetzelin 1953. "Isolation of floc-producing bacteria from activated sludge" Applied microbiology 1: 259-261.
- 37.- McKinney, R.E., H.D. Tomhnson, & R.L. Wilcox. 1956 "Metabolism of aromatic compounds by activated sludge" Sewage and Industrial Wastes 29: 547-557.
- 38.- Metcalf & Eddy 1972. Wastewater engineering: Collection, treatment and disposal. Mc Graw Hill Book Co.
- 39.- O.E.C.D. 1976. "Proposed methods for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents" Organization for Economic Cooperation and Development Paris.
- 40.- Pianka, R.E. 1982 Evolutionary Ecology Ed. Harper & Row, Publishers. N. York.
- 41.- Pike E.B. & C. 1972 "Recent developments in the study of - bacteria in activated sludge process" Inst. Water Pollution Control Federation 24.
- 42.- Pike E.B. 1975 "Ecological aspects of used water treatment" Ed. C.R. Curd & H.A. Hawkes. Academic Press, New York.
- 43.- Pipes, W.O. 1966 "The ecological approach to the study of activated sludge". Advances in Applied Microbiology 8: 77-103
- 44.- Prakasam, T.B.S. y N.C. Dondero 1967 a) "Aerobic hetrotrophic bacterial populations in sewage and activated sludge" III Method of chacterization of activated sludge bacteria. Applied Microbiology 15: 1122-1127.

- 45.- Prakasam. T.B.S. & N.C. Dondero 1967 b) "Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge III Adaptation in a synthetic waste" *Applied Microbiology* 15: 1128-1137.
- 46.- Putnam, F.W. 1948. "The interactions of proteins and synthetic detergents". *Advances in Protein Chemistry*. 4: 79-122.
- 47.- Sokal, R.R. & Sneath P.H.A. 1963 " Principles of Numerical Taxonomy" Freeman, San Francisco.
- 48.- Solís M.C. 1982." Experiencias acerca de lagunas de estabilización facultativas en serie en clima tropical" *Memorias del 3er. Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y ambiental* 2:35.
- 49.- Stainer, R.Y., Doudoroff, M and Adelberg, A.E. *The microbiological world*. Third edition Prentice-Hall Inc. New Jersey.
- 50.- Swisher, R.D. 1970 "Surfactant Degradation" Marcel Dekker Inc. New York.
- 51.- Trolldenier, G. 1976 " The use of fluorescence microscopy for counting soil-microorganism" In Rosswall, T. *Modern methods in the study of microbiological ecology*. Proceedings of a symposium held at the agricultural college, Uppsala Sweden June 19-23.
- 52.- Unz, R.F. & Dondero 1967 " The predominant bacterial Zooglaeal colonias. I Isolation and identification" *Canadian Journal of Microbiology* 13: 665.
- 53.- Wuhrmann K. 1954. " Microbial aspects of Control " *Advances in Applied Microbiology*