



03072  
2<sup>o</sup> eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DISEÑO, CONTROL Y AUTOMATIZACION DE UN SISTEMA DE LODOS  
ACTIVADOS A NIVEL LABORATORIO:  
ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DINAMICO ANTE PERTURBACIONES

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA  
ARTURO AGUILAR-AGUILA ACUÑA

CUERNAVACA, MOR.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN JUNIO 1994



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 está 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.

**El presente trabajo fué realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Contando con apoyo económico de Petróleos Mexicanos (PEMEX) y el Apoyo Técnico de María Elena Zamora Varona. A todos ellos les agradezco su participación, sin su esfuerzo no habría sido posible realizar este trabajo.**

## **JURADO ASIGNADO AL TEMA**

<b>Dr. Rodolfo Quintero Ramírez</b>	<b>Presidente</b>
<b>Dr. Simón González M.</b>	<b>Vocal</b>
<b>Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich</b>	<b>Secretario</b>
<b>Dr. Rafael Vázquez Duhalt</b>	<b>Suplente</b>
<b>Dra. Susana Saval B.</b>	<b>Suplente</b>

## **DEDICATORIAS**

**a Nuria:**

**con quien empiezo una nueva vida.**

**a mis padres y hermanos:**

**por apoyarme durante todo este tiempo**

## INDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>III. JUSTIFICACION</b>	<b>4</b>
<b>IV. NOMENCLATURA</b>	<b>5</b>
<b>V. INTRODUCCION</b>	<b>6</b>
5.1. ANTECEDENTES	6
5.2. SISTEMAS DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO	7
5.2.1. Sistemas Aerobios	7
5.2.2. Sistemas Anaerobios	8
5.3. SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS	9
5.3.1. Descripción del Proceso	9
5.3.2. Microorganismos Involucrados	11
5.3.3. Análisis del Sistema	13
5.3.4. Pruebas de Tratabilidad	17
5.3.5. Operación y Control del Sistema	17
5.4. CONTROL Y AUTOMATIZACION	20
5.4.1. Biorreactores	20
5.4.2. Sistemas de Tratamiento de Aguas	22
<b>VI. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>24</b>
6.1. SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS	24
6.2. CULTIVO EN BIORREACTOR	26
6.3. CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS	26
6.4. SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS	29
6.5. SISTEMA DE ANALISIS DE FLUJO INYECTADO	31
6.5.1. Velocidad de Consumo de Oxígeno	31
6.5.2. Demanda Bioquímica de Oxígeno	34
6.6. TECNICAS DE ANALISIS	36
6.6.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO)	36
6.6.2. Sólidos	40
6.6.3. Densidad Óptica	43
6.6.4. Concentración de Glucosa	43
6.6.5. Conteo de Partículas	43
6.7. ANALISIS NUMERICO DE RESULTADOS	43

<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	46
7.1. ARRANQUE Y ESTABILIZACION DEL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS	46
7.2. SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS	54
7.2.1. Control de biorreactores	54
7.2.2. Análisis de flujo inyectado: demanda química de oxígeno	54
7.2.3. Análisis de flujo inyectado: velocidad de consumo de oxígeno	57
7.3. CULTIVOS POR LOTES	59
7.4. CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS	61
7.4.1. Operación	63
7.4.2. Perturbaciones al sistema	73
7.5. ANALISIS DE RESULTADOS POR SIMULACION	75
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	78
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	81
<b>IX. APENDICES</b>	88
9.1. USOS DEL SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS	88
9.2. RESULTADOS TOTALES DE LOS EXPERIMENTOS	91
9.3. LISTADO DEL PROGRAMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS	96
9.4. LISTADO DEL PROGRAMA DE ANALISIS DE FLUJO INYECTADO	106
9.5. LISTADO DEL PROGRAMA DE SIMULACION	113

## FIGURAS

1.	Diagrama de un sistema convencional de tratamiento de aguas residuales por lodos activados.	10
2.	Esquema de los componentes del sistema de control y adquisición de datos acoplado a un fermentador.	30
3.	Diagrama de flujo general utilizado por el sistema de control y adquisición de datos.	32
4.	Pantalla de interfase con el usuario del sistema de adquisición de datos y control durante una fermentación exponencialmente alimentada.	32
5.	Esquema del sistema de lodos activados acoplado al sistema de flujo inyectado con un biosensor de DBO.	35
6.	Diagrama del algoritmo para el sistema de análisis de flujo inyectado.	35
7.	Curva patrón de SSV a partir de densidad óptica.	44
8.	Curva patrón de DQO a partir de glucosa.	44
9.	Consumo de oxígeno de tres distintos inóculos de lodos activados.	47
10.	Comportamiento del sistema de lodos activados en su primera etapa.	49
11.	Comportamiento del sistema de lodos activados en su segunda etapa.	51
12.	Respuesta del biosensor de DBO ante diferentes concentraciones de materia orgánica.	55
13.	Efecto de un cambio en la carga orgánica en cultivo por lotes.	58
14.	Cinética de crecimiento celular en cultivo por lotes.	60
15.	Distribución de partículas a través del tiempo en cultivo por lotes.	62
16.	Cultivo exponencialmente alimentado a una velocidad de dilución de $0.05\text{ h}^{-1}$ .	64
17.	Cultivo exponencialmente alimentado a una velocidad de dilución de $0.15\text{ h}^{-1}$ .	66
18.	Cultivo exponencialmente alimentado a una velocidad de dilución de $0.01\text{ h}^{-1}$ .	68
19.	Distribución de partículas a través del tiempo en cultivo exponencialmente alimentado.	70
20.	Velocidad específica de crecimiento a diferentes velocidades de dilución en cultivo exponencialmente alimentado.	71
21.	Simulaciones de cultivo exponencialmente alimentado.	76

## TABLAS

1. Principales especies bacterianas presentes en sistemas de lodos activados.	12
2. Composición del agua de desecho sintética utilizada.	25
3. Resultados de las mediciones de DQO utilizando diferentes volúmenes y manejo de muestra.	39
4. Resultados de las mediciones de SST y SSV utilizando diferentes procedimientos.	42
5. Velocidad de consumo de oxígeno de distintas muestras de lodos activados.	48
6. Resultados globales del sistema de lodos activados durante el primer período de operación.	50
7. Resultados globales del sistema de lodos activados durante el segundo período de operación.	52
8. Efecto de la concentración de sal sobre distintos parámetros obtenidos en cultivo exponencialmente alimentado.	74

## I. RESUMEN

Se diseñó y construyó un sistema de tratamiento de aguas mediante lodos activados a escala laboratorio, el cual fué operado en dos períodos que sumaron más de 520 días utilizando un agua residual sintética formulada para simular desechos con baja carga orgánica, encontrándose que el sistema se comporta de la misma forma que un sistema real, tanto en los aspectos cinéticos como en desempeño global.

Se desarrolló un sistema computarizado de control y adquisición de datos para biorreactores amigable, versátil y poderoso. Este sistema ha sido utilizado exitosamente en diversas aplicaciones por varios investigadores y estudiantes del Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología. Adicionalmente, se hicieron adaptaciones al sistema para realizar determinaciones de velocidad de consumo de oxígeno y demanda bioquímica de oxígeno por medio de un biosensor, utilizando el método de análisis de flujo inyectado con toma de muestras y calibración y alarmas automatizadas.

Una vez que se logró estabilizar el sistema de lodos activados mediante el control de la relación alimento microorganismo (F/M), éste se utilizó como reservorio de una población de lodos activados aclimatados a las condiciones de cultivo. Con el fin de no perturbar el sistema estabilizado se tomaron inóculos de lodos para llevar a cabo cultivos por lotes y exponencialmente alimentados.

En experimentos de cultivo por lotes se identificaron las fases lag, crecimiento exponencial, estacionaria y de consumo endógeno, encontrando que esta última se puede dividir en dos sub-etapas. Se encontró que los cultivos exponencialmente alimentados de volumen variable presentan el mismo comportamiento dinámico que un quimiostato, donde la velocidad específica de crecimiento que se obtiene en estos cultivos es igual a la velocidad de dilución con la que se opera. Cuando en el cultivo exponencialmente alimentado se llegó al estado estacionario, se realizaron perturbaciones al sistema, permitiendo tener un control interno para realizar comparaciones antes y después de la perturbación.

Se ensayaron perturbaciones mediante la adición de cloruro de sodio a distintas concentraciones con el fin de someter a la población microbiana a un estrés osmótico que implique un gasto energético adicional. Se encontró que los efectos principales que se obtienen son el cambio transitorio del cultivo hacia un nuevo estado estacionario, aunado a una disminución del rendimiento celular, presumiblemente debido a que las bacterias consumen una mayor cantidad de

substrato para mantener la presión osmótica adecuada.

Se desarrolló un método numérico para la determinación de constantes cinéticas y estequiométricas a partir de datos experimentales de cultivo en estado transitorio, el cual fué probado para cultivos axénicos, encontrándose una buena concordancia con métodos tradicionales análogos al método de Lineweaver-Burke utilizado en reacciones enzimáticas. Para la utilización del método en cultivos mixtos se encontraron complicaciones debido a la complejidad del sistema biológico, sin embargo el método se utilizó en conjunto con métodos tradicionales de balance de masa para la determinación de ciertos parámetros como las velocidades específicas de crecimiento y consumo de substrato y el rendimiento. Los resultados obtenidos mediante este método presentan grandes diferencias al realizar comparaciones entre distintos experimentos, sin embargo al comparar distintas etapas de un solo experimento, las diferencias son mínimas.

## **H. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

El presente trabajo tiene por objetivo principal establecer metodologías experimentales y analíticas con el fin de realizar estudios sobre el efecto de perturbaciones mediante la adición de cloruro de sodio en un sistema de tratamiento de aguas residuales por lodos activados a escala laboratorio.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

Diseño, construcción y operación de un sistema modelo de lodos activados a escala laboratorio.

Desarrollo y puesta en marcha de un sistema computarizado de adquisición de datos para biorreactores, que sea versátil, amigable y poderoso.

Análisis teórico del cultivo exponencialmente alimentado como una herramienta experimental para el estudio cinético del crecimiento celular y realización práctica de este método en sistemas biológicos.

Adaptación y automatización de técnicas de análisis de flujo inyectado para las determinaciones de velocidad de consumo de oxígeno y demanda bioquímica de oxígeno.

Adaptación y utilización de métodos numéricos de análisis de datos como herramientas alternativas para estimación de las constantes cinéticas que describen el crecimiento celular.

### **III. JUSTIFICACION**

Históricamente el tratamiento de aguas residuales ha sido considerado dentro del campo de aplicación de la ingeniería sanitaria, sin embargo, el desarrollo adecuado de esta tecnología requiere también de la participación conjunta de otras disciplinas, como la microbiología, ingeniería química, bioquímica y ambiental. La aplicación de técnicas biotecnológicas al tratamiento de aguas de desecho ofrece una nueva gama de posibilidades, lo que en los últimos años se ha considerado dentro de la "biotecnología ambiental".

Si bien el tratamiento biológico de aguas residuales es la aplicación biotecnológica más utilizada en todo el mundo, tanto en volumen como en número de plantas, muchos de los fenómenos que ocurren durante este proceso aún no se comprenden en su totalidad. El diseño y la operación de plantas de tratamiento requiere de un conocimiento tanto de ingeniería como de biotecnología, sin embargo, la falta de estos conocimientos ha llevado a que muchas de estas tareas sean realizadas utilizando técnicas heurísticas o "reglas de dedo", cuya efectividad depende en gran medida de la experiencia del operador.

Entre las nuevas tendencias de la biotecnología ambiental podemos encontrar: formación de bancos de microorganismos con distintas capacidades degradativas; aplicación de ingeniería genética a microorganismos para el tratamiento de aguas; desarrollo de biosensores para el monitoreo de la calidad del agua y el desarrollo de nuevos biorreactores y sistemas de control para el tratamiento de aguas residuales.

Para realizar investigación en biotecnología ambiental, es necesario contar con herramientas experimentales que faciliten esta tarea. Durante el desarrollo del presente trabajo se establecieron algunas de las metodologías requeridas para la adecuada experimentación en este campo.

## IV. NOMENCLATURA

D	Velocidad de dilución (reactor), $h^{-1}$
D'	Velocidad de dilución (sedimentador), $h^{-1}$
D''	Velocidad de dilución (todo el sistema), $h^{-1}$
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno, mg/L
DO	Densidad óptica
DQO	Demanda química de oxígeno, mg/L
F	Flujo volumétrico, L/h
F/M	Carga orgánica másica (Relación alimento - microorganismos), $h^{-1}$
h	Eficiencia de sedimentación
IVL	Índice volumétrico de lodos, mL/mg
$k_{La}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa, $h^{-1}$
$K_s$	Constante de saturación, g/L
$m_s$	Coefficiente de mantenimiento, g/g-h
OD	Oxígeno disuelto, % saturación del aire @ 29°C
p	Relación de purga
$q_{O_2}$	Velocidad específica de consumo de oxígeno, mg $O_2$ /mg SSV-h
$q_s$	Velocidad específica de consumo de sustrato, mg DQO/mg SSV-h
r	Relación de recirculación
rpm	Revoluciones por minuto, $min^{-1}$
S	Concentración de sustrato, g/L
SS	Sólidos sedimentables, mL/L
SST	Sólidos en suspensión totales, mg/L
SSV	Sólidos en suspensión volátiles, mg/L
t	tiempo, h
V	Volumen, L
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno, mg/L-h
vvm	Volumen de aire / volumen de líquido / minuto
x	Concentración de biomasa, g/L
Y	Rendimiento, g/g
Y'	Rendimiento máximo, g/g
$\theta_c$	Tiempo medio de retención celular, d
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento, $h^{-1}$
$\mu_m$	Velocidad específica de crecimiento máxima, $h^{-1}$

## V. INTRODUCCION

### 5.1. ANTECEDENTES

Es bien conocido que en todas las áreas urbanas e industriales del mundo se producen y acumulan grandes cantidades de productos de desecho contaminantes, tanto sólidos y líquidos, como gases, que varían ampliamente en composición y cantidad. El efecto que producen estos compuestos en el ambiente es también muy variable, dependiendo tanto de las características del compuesto, como de las condiciones del ambiente donde se desecha.

Normalmente, una de las formas de disponer de los desechos sólidos y líquidos, que suelen ir acompañados de grandes volúmenes de agua para facilitar su transporte (Farrell, 1984), es incorporarlos a cuerpos naturales de agua, como ríos, lagos y océanos, o depositarlos directamente en el suelo. La forma más adecuada de desechar estos compuestos es realizar previamente un tratamiento que disminuya los posibles efectos en el ambiente de estas aguas, comúnmente denominadas aguas residuales.

Entre los tipos de tratamiento de aguas residuales podemos encontrar: el tratamiento primario, que tiene la finalidad de eliminar sólidos voluminosos y acondicionar el agua residual para un tratamiento posterior, y normalmente incluye procesos físicos; el tratamiento secundario cuyo objetivo es la degradación de los desechos, e involucra principalmente procesos biológicos y fisicoquímicos; y finalmente tenemos el tratamiento terciario, que tiene como objetivo el pulimiento final.

El tratamiento de aguas residuales también puede clasificarse de acuerdo al tipo de operaciones y procesos unitarios que se realizan, permitiendo así separar cada proceso como una unidad e integrar varias unidades dentro de un sistema de tratamiento global. Siguiendo este criterio, tenemos el tratamiento físico, que incluye las operaciones de tamizado, mezclado, floculación, sedimentación, flotación, filtrado, transferencia de calor y secado; el tratamiento químico, que comprende precipitación química, transferencia de gases, adsorción, desinfección y oxidación química (clorinación y ozonificación) y combustión; finalmente tenemos el tratamiento biológico, que puede ser aerobio, anaerobio o mixto.

Uno de los propósitos del tratamiento biológico de aguas residuales, es la degradación de la materia orgánica suspendida y/o disuelta en el agua mediante la biodegradación de los compuestos contaminantes. En todos los casos de tratamiento biológico, al reducir el volumen de los desechos,

estos se tornan más difíciles de degradar, y el verdadero paso limitante se encuentra al llegar el momento de deshacerse de la materia orgánica acumulada durante el tratamiento de aguas residuales.

La elección y diseño de un sistema de tratamiento de aguas residuales debe analizarse particularmente para cada tipo de efluente que se desea tratar (Metcalf and Eddy, 1972). En casos específicos, la factibilidad del tratamiento biológico depende de factores tales como:

- concentración de los contaminantes en el desecho (carga orgánica).
- continuidad en la disposición del desecho.
- presencia de materiales tóxicos en la corriente de desecho.
- requerimiento de un pretratamiento para lograr la biodegradación.
- problemas debido a las características fisicoquímicas del desecho.
- cantidad del desecho a tratar.
- costos de transporte.

## 5.2. SISTEMAS DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO

La tarea de diseño y operación de plantas de tratamiento biológico de aguas residuales ha sido llevada a cabo principalmente por ingenieros civiles, y la participación de microbiólogos, ingenieros químicos y bioquímicos ha sido históricamente mínima (Uhlmann, 1979). Esto se ve reflejado en la aplicación limitada de reacciones bioquímicas e interacciones microbianas al diseño y operación del proceso de degradación.

Los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales más utilizados en la actualidad son la digestión anaerobia y digestión aerobia. Para llevar a cabo una comparación realista entre los diferentes sistemas de tratamiento de agua, es necesario tener en cuenta los aspectos técnicos, económicos y ecológicos de cada uno de ellos, y hacer notar en forma clara las ventajas y desventajas que cada uno de ellos presenta. A continuación se describe cada tipo de sistema y se listan sus principales ventajas y desventajas.

### 5.2.1. Sistemas Aerobios

Los sistemas aerobios son procesos en los que la degradación de materia orgánica es llevada a cabo por microorganismos que requieren la presencia de oxígeno para crecer. Entre estos sistemas podemos citar: lodos activados, filtros percoladores y lagunas de estabilización aerobias.

Ventajas:

1. Alta eficiencia en la remoción de materia orgánica.
2. Bajos tiempos de residencia.
3. Relativamente estables.
4. El agua tratada tiene baja carga orgánica.
5. Producción de desechos inodoros, biológicamente estables, y fáciles de desechar.
6. Producción de lodos con excelentes características para su concentración.
7. Pocos problemas de operación.
8. Costo de inversión relativamente bajo.

Desventajas:

1. Gran consumo de potencia por aireación.
2. No se recupera un subproducto útil.
3. Producción de grandes volúmenes de lodos.
4. Inadecuados para tratar residuos concentrados.

### 5.2.2. Sistemas Anaerobios

El tratamiento anaerobio de aguas residuales comprende la descomposición de materia orgánica y/o inorgánica en ausencia de oxígeno. Entre los procesos más comunes que se aplican para el tratamiento de aguas se encuentran: tanques Imhoff, lagunas anaerobias, digestores, sistemas de contacto anaerobio, filtros anaeróbicos, reactores de película fija y reactores de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB).

Ventajas:

1. Es posible recuperar energía mediante el metano producido.
2. Se puede operar con altas cargas orgánicas.
3. Se producen pequeños volúmenes de lodos.
4. No implica un gasto de energía por aireación.

Desventajas:

1. El proceso requiere de una etapa de aclimatación que puede ser prolongada cuando no se tiene el inóculo adecuado.
2. La baja velocidad de crecimiento de las bacterias requiere mayores tiempos de retención.
3. El proceso no es económicamente factible para desechos diluidos.

La decisión que normalmente se toma para adoptar un sistema aerobio o anaerobio, es meramente económica, tomando en cuenta que para altas cargas orgánicas, por lo general superiores a 1,000 mg/L DBO<sub>5</sub>, tales como algunos efluentes industriales, el sistema anaerobio es el más adecuado, tanto en costos de inversión como de operación, mientras que para bajas cargas orgánicas, como los efluentes municipales, los sistemas aerobios son mejores (Eckenfelder, 1988). Actualmente se han logrado grandes avances en la utilización de sistemas anaerobios, particularmente en los sistemas denominados de segunda y tercera generación (Noyola, 1992), sin embargo recientemente existe una tendencia a utilizar sistemas mixtos, donde parte del tratamiento se efectúa anaerobiamente, con el aprovechamiento correspondiente de energía, y después se efectúa un tratamiento aerobio, reduciendo los desechos a un mínimo. También se han planteado sistemas de composteo como una alternativa para aprovechar el exceso de lodos.

### 5.3. SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS

#### 5.3.1. Descripción del Proceso

Uno de los procesos de tratamiento de aguas que se efectúa en todo el mundo con resultados bastante favorables desde principios de este siglo, es el de lodos activados. El proceso fué desarrollado por Arden y Lockett en 1914 (Metcalf and Eddy, 1972), y su principio está basado en la observación de que si un desecho es aireado durante un período de tiempo, su contenido de materia orgánica disminuye, y al mismo tiempo se forma un "floculo" en forma de floculos. (Ramalho, 1977)

La forma de operación de este proceso se presenta en la figura 1. El tratamiento básicamente consiste en la adición en forma continua del agua residual a tratar en el reactor biológico o digestor, donde se encuentra una población heterogénea de microorganismos, la cual se mantiene en suspensión mediante agitación mecánica o inyección de aire. Una vez que el licor mezclado alcanza cierto tiempo de residencia, una corriente de éste pasa a un tanque donde se lleva a cabo el proceso de sedimentación de la biomasa, obteniendo en la parte superior un efluente clarificado, y en la parte inferior la biomasa en forma de floculos. Parte de la biomasa que precipita, se regresa al digestor, con el objeto de aumentar el tiempo de residencia de los microorganismos. La otra parte de la biomasa se desecha. El sistema se caracteriza por la degradación aerobia de la materia orgánica mediante poblaciones diversas de bacterias, protozoarios y algas, que comúnmente se denominan lodos activados.

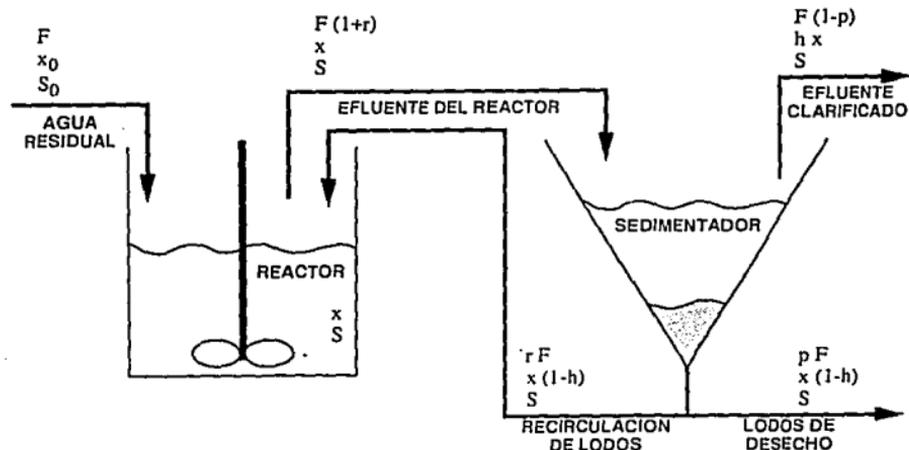


Figura 1. Diagrama de un sistema convencional de tratamiento de aguas residuales por lodos activados.

Bioquímicamente, los lodos activados tienen la siguiente composición (Uhlmann, 1979):

- enzimas y ácidos nucleicos
- otros constituyentes de la biomasa
- materiales de soporte (orgánicos: materia húmica y polisacáridos; inorgánicos: hidróxido de hierro, carbonato de calcio, hidróxido de calcio, apatita, e hidróxido de aluminio)

Los efluentes de este sistema de tratamiento son: el agua tratada que puede ser utilizada posteriormente con fines agrícolas o industriales; y los lodos de desecho (biomasa difícilmente degradable) que son un contaminante. Por ejemplo, tan solo en la Comunidad Económica Europea se producen 6 millones de toneladas de materia seca por año (Karapanagiotis et al, 1989). La composición tan compleja de los lodos activados, en la mayoría de los casos no permite que se utilicen como materia prima para algún proceso industrial, o como fertilizante en forma directa, debido al alto contenido tanto de microorganismos patógenos, así como de compuestos tóxicos no biodegradables y acumulables, tales como metales pesados (Forster, 1985).

Las operaciones para el desecho de lodos activados se basan principalmente en la disminución del contenido de compuestos orgánicos y de agua, para posteriormente incinerarlos o depositarlos en sitios donde sus efectos ambientales nocivos sean menores. El contenido de agua en los lodos es de alrededor del 80 %, por lo que el proceso de eliminación de agua en los lodos

juega un papel importante para obtener un producto de menor volumen y más fácil manejo. Tanto la opción de rellenos sanitarios como el calcinado presentan inconvenientes: en la primera opción los costos de infraestructura y operación (estabilización, concentración, prensado y transporte) son elevados, no producen beneficios económicos (Spinosa et al, 1987) y existe el riesgo de contaminar mantos acuíferos con compuestos tales como metales pesados. El calcinado por su parte presenta el inconveniente de que los productos a los que son transformados también representan una fuente de contaminación. Gases como el monóxido de carbono, dióxido de carbono y gases sulfurosos, son liberados a la atmósfera, junto con grandes cantidades de calor; las cenizas y otros compuestos resultantes de una incineración incompleta son depositados en la tierra o en cuerpos de agua, afectando la ecología del lugar (Reed, 1987).

En el año de 1990, en México se desecharon 184 m<sup>3</sup>/segundo de aguas residuales, de los cuales un 43 % es de origen industrial, y 57 % de origen municipal (SEDUE, 1991). Se estima que con las plantas de tratamiento que existen en la actualidad (360 municipales y 280 industriales), tan solo se remueve el 10.5 % de la carga orgánica producida. A partir de los datos reportados por SEDUE, se calculó que si el total de aguas residuales que se generan fueran tratadas por métodos convencionales, tal como el de lodos activados, se tendría una formación de 9 millones de toneladas de lodos anualmente. Estas cifras nos dan una clara idea de la apremiante necesidad de utilizar sistemas de tratamiento de aguas residuales en México. En la actualidad se tiene un conocimiento detallado de la composición típica de las aguas residuales que se generan por las industrias mas comunes, sin embargo existen grandes variaciones tanto en las cantidades como en las características de estas aguas residuales (Anaya, 1991), lo cual hace más complicada la implementación de procesos de tratamiento adecuados.

### 5.3.2. Microorganismos Involucrados

El proceso de lodos activados requiere de la aclimatación de una comunidad microbiana de tal forma que se puedan metabolizar la mayor parte de los compuestos que contenga el desecho que se desea tratar, y además facilitar la formación de flocúlos que sedimenten rápidamente. Para lograr estos dos objetivos, el sistema debe de ser operado en tal forma, que se mantenga un balance adecuado entre la casuda de alimento que se agrega y la biomasa presente, y que así la población se adapte a las condiciones ambientales del reactor.

Entre las familias de bacterias presentes en los sistemas de lodos activados, se han identificado algunos géneros como responsables de funciones específicas para el tratamiento de aguas residuales, destacando principalmente las mostradas en la tabla 1. Además de las bacterias, también se pueden encontrar presentes algas, hongos, como por ejemplo el género *Fusarium*, y

Tabla 1. Principales especies bacterianas presentes en sistemas de lodos activados (Uhlmann, 1979; Gaudy and Gaudy, 1981)

Bacteria	Principales productos que degrada
<b>bacterias fototróficas:</b> <i>Rhodospirillum</i>	ácidos grasos, productos intermediarios del ciclo de Krebs, etanol, aminoácidos y fructosa.
<b>bacterias deslizantes (gliding bacteria):</b> <i>Leucothrix</i> <i>Thiothrix</i> <i>Beggiatoa</i>	varios substratos orgánicos simples. sulfuros. reducción de sulfatos, acetatos.
<b>bacterias envainadas (sheathed bacteria):</b> <i>Sphaeroillum</i> <i>Streptothrix</i>	crecimiento filamentosos, degradación de alcoholes, ácidos grasos, azúcares, aminoácidos, gelatina y peptona. carbohidratos, gelatina y peptona.
<b>espirilos:</b> <i>Spirillum</i>	ácidos orgánicos, aminoácidos, alcoholes y peptona.
<b>bacilos y cocos gram-negativos:</b> <i>Pseudomonas</i> <i>Zooglea</i> <i>Azotobacter</i>	más de 100 substratos, tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y productos del petróleo, llevan a cabo la desnitrificación. formación de la matriz de limos, degradación de carbohidratos, etanol y aminoácidos. carbohidratos, alcohol, ácidos orgánicos, fijación de nitrógeno ambiental.
<b>bacilos anaerobios facultativos gram-negativos:</b> <i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Flavobacterium</i>	carbohidratos, acetatos. carbohidratos, citrato, gluconato, cianuros, llevan a cabo la desnitrificación. carbohidratos, gelatina, ácidos orgánicos. carbohidratos, ácidos orgánicos, celulosa, almidón.
<b>bacterias anaerobias gram-negativas:</b> <i>Desulfovibrio</i>	lactato, piruvato, malato, reducción de sulfatos y otros compuestos azufrados.
<b>cocos gram-negativos:</b> <i>Acinetobacter</i>	carbohidratos, cianuro, acetato, almacenamiento de polifosfatos.
<b>bacterias quimiohidrófagas gram-negativas:</b> <i>Nitrobacter</i> <i>Nitrosomonas</i> <i>Thiobacillus</i>	oxidación de nitritos a nitratos, con incorporación de CO <sub>2</sub> . oxidación de amonio a nitritos, con incorporación de CO <sub>2</sub> . oxidación de sulfatos, sulfuros, tiosulfatos, reduce sulfuros a sulfatos con incorporación de CO <sub>2</sub> .
<b>bacterias productoras de metano:</b> <i>Methanobacterium</i>	acetato, formato, metanol, reducción de CO <sub>2</sub> a metano.
<b>cocos gram-positivos:</b> <i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Sireptococcus</i> <i>Sarcina</i>	piruvato, acetato, lactato, carbohidratos. carbohidratos diversos, formación de enzimas y toxinas extracelulares. carbohidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos grasos. carbohidratos, aminoácidos.
<b>bacilos y cocos formadores de endosporas:</b> <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>	carbohidratos, polisacáridos, pectina, gelatina, polipéptidos, llevan a cabo la desnitrificación. carbohidratos, polialcoholes, ácidos orgánicos, proteínas y aminoácidos.
<b>actinomicetos y organismos relacionados:</b> <i>Arthrobacter</i> <i>Nocardia</i> <i>Cytophaga</i>	carbohidratos, peptona, ácidos grasos, compuestos aromáticos (incluyendo heterocíclicos), aminoácidos, llevan a cabo la desnitrificación. carbohidratos, fenoles, parafinas, urea, aminoácidos, celulosa, alcoholes, benzidina, llevan a cabo la desnitrificación y fijación de nitrógeno atmosférico. rompimiento de substratos poliméricos.

protozoarios que se alimentan de bacterias, especialmente ciliados como *Vorticella*, *Opercularia*, *Paramecium*, *Chilodonella*, *Amphileptus*, *Aspidisca*, *Trachelophyllum* y *Philodina* e inclusive animales multicelulares como rotíferos y crustáceos pequeños, los cuales dan una última "pulida" al agua de desecho al ingerir bacterias y microorganismos en suspensión. Uno de los

microorganismos mas comunes en las poblaciones mixtas que componen los lodos activados, es la bacteria *Zooglea ramigera*, que presenta la característica de excretar un polisacárido que ayuda a aglomerar a las bacterias en forma de floculos, razón por la que reciben el nombre de lodos (Bailey and Ollis, 1986). Esta propiedad de aglomerarse y formar precipitados se aprovecha para la sedimentación de los lodos. Además, los floculos tienen una gran afinidad por la materia en suspensión, lo cual mejora el atrapamiento de sólidos y permite obtener un efluente de buena calidad, simplemente por el fenómeno físico de adsorción.

La estructura de las partículas de lodos consiste básicamente en una capa exterior compuesta de bacterias metabólicamente activas, y un centro que contiene bacterias con menor actividad, que en su mayor parte están muertas, debido a la poca transferencia de sustrato y oxígeno. La capa exterior de los floculos posee una baja densidad específica, mientras que el centro tiene alta densidad específica, haciendo que los floculos sedimenten fácilmente (Uhlmann, 1979).

### 5.3.3. Análisis del Sistema

Todos los modelos que describen un sistema de tratamiento biológico de aguas residuales constan de cuatro partes fundamentales: consideraciones y simplificación, ecuaciones cinéticas, ecuaciones estequiométricas y balances de masa (Andrews, 1991). A continuación se describen con mayor detalle cada una de estas partes.

#### Consideraciones y simplificación:

Los fenómenos que ocurren en un sistema de tratamiento de aguas residuales son demasiado complejos para ser representados por un juego de relaciones matemáticas, por lo tanto se deben de asumir varias consideraciones para simplificar el modelo. Las aguas residuales contienen un gran número de componentes, los cuales sirven de sustrato a diversos tipos de microorganismos, ya sea en forma simultánea o secuencial, además los microorganismos pueden ser predadores que se alimentan de otros microorganismos. La mayor simplificación que se puede hacer al agua residual es considerar que la concentración de materia orgánica puede describirse mediante un solo parámetro (DQO, DBO), mientras que los modelos más sofisticados dividen la materia orgánica en: soluble biodegradable, soluble no biodegradable, coloidal biodegradable y coloidal no biodegradable. Los modelos mas sencillos, también denominados no estructurados se basan en la suposición de que la concentración de biomasa puede ser descrita adecuadamente por un solo parámetro (SSV, densidad óptica). En modelos mas avanzados la biomasa se considera como un complejo, ya sea una estructura biológica con diversos tipos de microorganismos

(heterótrofos aeróbicos, bacterias filamentosas, autótrofos nitrificantes, desnitrificantes, protozoarios, etc.), o bien una estructura química con varios componentes (RNA, sustrato almacenado, biopolímeros, material inerte, y protoplasma).

Para el presente trabajo se considera un modelo no estructurado, y la concentración de biomasa se representa por SSV, y la concentración de sustrato por DQO.

Ecuaciones cinéticas:

Una vez que los componentes del sistema de tratamiento de aguas están especificados, el siguiente paso es definir los procesos que se llevan a cabo en la transformación biológica del agua residual en microorganismos. Uno de los modelos no estructurados más utilizados para describir el crecimiento celular es el descrito por la ecuación de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \quad (1)$$

Otra forma de representar el proceso de transformación del agua residual es mediante la velocidad específica de consumo de sustrato:

$$q = \frac{\bar{q} S}{K + S} \quad (2)$$

Si bien en muchas ocasiones se reporta la velocidad específica de consumo de sustrato como  $(-dS/dt) (1/x)$ , esto se puede prestar a confusiones con las ecuaciones resultantes de balance de masa. Recientemente una comisión de nomenclatura (Grau, 1987) ha recomendado que se utilice  $r_j$  para indicar la velocidad volumétrica neta de consumo del constituyente  $j$ . El estado del arte en lo que respecta a ecuaciones cinéticas está representado por el modelo propuesto por el grupo de trabajo de IAWPRC (International Association for Water Pollution Research and Control), en el cual el agua residual tiene trece componentes (alimento inerte particulado, productos inertes particulados, biomasa heterótrofa, biomasa autótrofa, sustrato lentamente biodegradable, nitrógeno orgánico lentamente biodegradable, materia orgánica soluble inerte, sustrato soluble, amonio, nitritos y nitratos, nitrógeno orgánico soluble, oxígeno disuelto, y alcalinidad por bicarbonatos), los cuales son consumidos y producidos por nueve diferentes procesos (crecimiento aeróbico heterótrofo, crecimiento anóxico y desnitrificación heterótrofos, lisis heterótrofa, crecimiento aeróbico autótrofo, lisis autótrofa, hidrólisis anaeróbica de materia orgánica, hidrólisis aeróbica de materia orgánica, hidrólisis de nitrógeno orgánico y amonificación) (Henze et al, 1987).

## Ecuaciones estequiométricas:

La relación entre la biomasa que se produce y el sustrato que se consume para formarlos se conoce como rendimiento, por lo que las ecuaciones estequiométricas también son conocidas como ecuaciones de rendimiento. Tomando en consideración que la biomasa se forma utilizando una cantidad fija de ATP, el cual se produce principalmente mediante la fosforilación a nivel de sustrato, se ha calculado que el rendimiento teórico para el crecimiento aeróbico es alrededor de 0.5 g células/g DQO (Andrews, 1989).

Generalmente se considera que el rendimiento relaciona la velocidad específica de crecimiento con el consumo específico de sustrato mediante:

$$\mu = Y (q - m_s) \quad (3)$$

Es importante notar que para este caso el parámetro  $m_s$  incorpora la cuantificación de diferentes fenómenos, tales como mantenimiento, metabolismo endógeno, predación y lisis celular.

## Ecuaciones de balance de masa:

Las consideraciones generales, aunadas a las ecuaciones cinéticas y estequiométricas describen el comportamiento de cualquier tipo de proceso, sin embargo, para un proceso en particular, ya sea cultivo por lotes, continuo, alimentado o con recirculación, es necesario realizar un balance de masa de los componentes del sistema para describir completamente el proceso. A partir del diagrama presentado en la figura 1, se realizaron balances de biomasa y sustrato de un sistema de lodos activados típico, haciendo deducciones similares a las desarrolladas por Ramalho (1977) y Metcalf y Eddy (1972) las concentraciones de cada corriente se indican en la misma figura, y el significado de las variables se describe en la sección IV (nomenclatura).

## Balance de células:

a) alrededor del reactor:

$$F x_0 + r F (1 - h) x - F (1 + r) x + \mu x V_r = V_r \frac{dx}{dt} \quad (4)$$

$$\frac{dx}{dt} = D (x_0 - x + 2 r x - r h x) + \mu x \quad (5)$$

b) alrededor del sedimentador:

$$F(1+r)x - F(1-p)hx - pF(1-h)x - rF(1-h)x = V_s \frac{dx}{dt} \quad (6)$$

$$\frac{dx}{dt} = D'(x - hx - px - 2phx + rx) \quad (7)$$

c) en todo el sistema:

$$F x_0 - F(1-p)hx - pF(1-h)x + \mu x V_r = V_1 \frac{dx}{dt} \quad (8)$$

definimos la variable:  $A = (h + p - 2ph)$  para finalmente obtener:

$$\frac{dx}{dt} = D'' x_0 + D'' x \left( \frac{\mu}{D} - A \right) \quad (9)$$

Balance de sustrato:

a) alrededor del reactor:

$$F s_0 + r F s - F(1+r)S - V_r \frac{\mu x}{Y} = V_r \frac{dS}{dt} \quad (10)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu x}{Y} \quad (11)$$

b) alrededor del sedimentador:

$$(1+r)FS - (1-p)FS - pFS - rFS = V_s \frac{dS}{dt} \quad (12)$$

$$\frac{dS}{dt} = D'(S + rS - S + pS - pS - rS) = 0 \quad (13)$$

c) en todo el sistema:

$$F S_0 - F(1-p)S - pFS - V_r \frac{\mu x}{Y} = V_1 \frac{dS}{dt} \quad (14)$$

$$\frac{dS}{dt} = D''(S_0 - S) - \frac{D''}{D} \frac{\mu x}{Y} \quad (15)$$

#### 5.3.4. Pruebas de Tratabilidad

Uno de los pasos más importantes en el diseño de una planta de tratamiento de aguas mediante lodos activados es el diseño del tanque de aireación. Esta tarea generalmente se inicia con la caracterización del agua residual a tratar, seguida de la realización de pruebas de tratabilidad, las cuales consisten en la operación de un reactor de escala laboratorio o piloto, con retención de sólidos hasta que se alcanza el estado estacionario. Los datos del experimento en estado estacionario son utilizados para determinar las constantes cinéticas y estequiométricas utilizando métodos tradicionales de regresión lineal (Metcalf and Eddy, 1972), a partir de estas constantes se dimensiona el reactor y se calculan los requerimientos de oxígeno y producción de lodos. Para alcanzar el estado estacionario es necesario operar el reactor durante un período hasta de 12 semanas (Comisión Nacional del Agua, 1991), por lo que es recomendable la operación simultánea de cuatro o cinco reactores para la caracterización completa de un sistema de tratamiento (Ramahlo, 1977).

Aunque estos sistemas son ampliamente utilizados con fines de caracterización, requieren de una cantidad considerable de análisis y equipo, además presentan otros problemas, como por ejemplo, las poblaciones microbianas de aclimatación lenta pueden requerir de largos períodos de operación para alcanzar el estado estacionario (Bermúdez et al., 1988; Stephenson and Stephenson, 1992). Este fenómeno es especialmente crítico cuando ocurren perturbaciones en el sistema, ya sean naturales (variaciones diurnas, fallas en el equipo) o inducidas (cambios provocados en el ambiente con propósitos experimentales o fines operacionales). Otras limitaciones de consideración se presentan al operar el sistema a altas o bajas velocidades de dilución. En el primer caso una sedimentación deficiente o turbulencia excesiva en la cámara de sedimentación pueden provocar el lavado del sistema (Karapanagiotis et al., 1989; Sheintuch et al., 1986). En el segundo caso también pueden ocurrir problemas operacionales, por ejemplo, es muy difícil mantener una relación F/M adecuada debido a los flujos tan bajos necesarios para mantener el tiempo de residencia hidráulico y de lodos en reactores de poco volumen (Adams et al., 1975).

#### 5.3.5. Operación y Control del Sistema

La operación de un sistema de lodos activados debe de llevarse a cabo en forma tal, que todos los parámetros se mantengan dentro de los niveles recomendados para los cuales fue diseñada la planta y que cumplan con las reglamentaciones oficiales. Se considera que una planta de tratamiento de aguas residuales funciona adecuadamente cuando:

- La cantidad de microorganismos es suficientemente grande como para degradar la materia

orgánica contenida en el agua residual que entra al sistema.

- La población microbiana presenta formación de flocúlos que sedimentan rápidamente.
- La transferencia de oxígeno en el reactor sea suficiente para que no se presenten zonas de anaerobiosis o limitación por oxígeno.
- El sedimentador no presente acumulación de lodos, que lleva a condiciones sépticas (descomposición anaeróbica de la biomasa), pero que sedimente lo suficientemente rápido el material suspendido para producir un efluente clarificado.
- La carga hidráulica del proceso no exceda la de diseño.

Existen varios métodos para controlar el funcionamiento de una planta de lodos activados (Verstraete and van Vaerenbergh, 1985; Forster, 1985; Comisión Nacional del Agua, 1991), entre los cuales destacan:

Cantidad de sólidos suspendidos en el sistema:

Cuando una planta de tratamiento ha alcanzado el estado estacionario para el cual se diseñó, la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el reactor debe de mantenerse constante. Una forma empírica de controlar el sistema, es mantener constante la cantidad de sólidos. Para lograr esto, se desecha la cantidad de lodos necesaria. La concentración de biomasa en el reactor (SSV) al estado estacionario depende de muchos factores, entre los principales podemos citar: carga orgánica del agua residual, velocidad de dilución, temperatura del proceso, características del agua residual y características de la población microbiana activa. La biomasa al estado estacionario para sistemas convencionales tratando agua residual de origen municipal generalmente fluctúa entre 1,000 y 4,500 mg SSV/L, sin embargo el valor óptimo varía de acuerdo a la carga orgánica del agua residual, y éste se identifica mediante prueba y error.

Carga orgánica másica (relación F/M):

Para una operación adecuada del sistema, es necesario que los microorganismos estén provistos de la cantidad de alimento que requieren. Para lograr esto, se utiliza el parámetro de control denominado carga orgánica másica o también conocido como relación F/M (F=Food y M=Microorganism). Esta relación se calcula multiplicando la concentración de substrato en la entrada (DBO ó DQO) por el flujo de entrada de agua residual, y dividiendo este producto entre la cantidad total de sólidos suspendidos volátiles en el tanque de aireación (SSV). La fórmula para calcular este valor es la siguiente:

$$F/M \text{ (día}^{-1}\text{)} = \frac{[\text{DBO ó DQO entrada (mg/L)}][\text{F (L/día)}]}{[\text{SSV reactor (mg/L)}][\text{V reactor (L)}]} \quad (17)$$

La relación F/M tendrá entonces como unidades (mg DBO / mg SSV - día) o bien (mg DQO / mg SSV - día), es decir, es equivalente a una velocidad específica de degradación de materia orgánica contaminante. Los valores típicos de F/M para el diseño de una planta convencional de lodos activados fluctúan en un intervalo de 0.2 a 0.4, sin embargo, el valor de operación puede ser ligeramente diferente al de diseño, siendo éste normalmente establecido por la experiencia y experimentación del operador de la planta. La forma de mantener este valor constante, es aumentando o disminuyendo la cantidad de lodos de recirculación al reactor.

Tiempo medio de retención celular:

El tiempo medio de retención celular, conocido también como edad de lodos ( $\theta_c$ ), es una estimación del tiempo promedio que permanecen los microorganismos en el sistema de tratamiento. La forma de hacer este cálculo es dividiendo la cantidad total de sólidos en el reactor entre la cantidad de sólidos que salen del sistema por unidad de tiempo, siguiendo la fórmula:

$$\theta_c \text{ (días)} = \frac{[\text{SSV reactor (mg/L)}][V \text{ reactor (L)}]}{[\text{SSV purga (mg/L)}][p F \text{ (L/día)}] + [\text{SSV efluente (mg/L)}][(1-p) F \text{ (L/día)}]} \quad (18)$$

Una planta convencional de lodos activados se opera en general con un tiempo medio de retención celular de 5 a 15 días.

Índice volumétrico de lodos:

El índice volumétrico de lodos (IVL) es una prueba que sirve para cuantificar la sedimentabilidad de los lodos activados, y es utilizado para indicar la calidad del lodo. Esta prueba se realiza dejando sedimentar un litro de lodos durante 30 minutos, el volumen sedimentado serán los sólidos sedimentables (SS), los cuales a su vez se dividen entre la concentración de sólidos suspendidos totales y nos dan el índice volumétrico de lodos.

$$\text{IVL (mL/mg)} = \frac{\text{SS reactor (mL/L)}}{\text{SST reactor (mg/L)}} \quad (19)$$

Usualmente el intervalo de IVL es de 80 - 150 mL/mg, aunque esta prueba es mas bien utilizada para detectar cambios en el proceso, y no como un parámetro de diseño que debe de mantenerse constante.

Velocidad específica de consumo de oxígeno:

La velocidad específica de consumo de oxígeno es una medida de la actividad metabólica de una población de microorganismos, esta prueba se realiza midiendo el consumo de oxígeno de una muestra y dividiendo esta cantidad entre la concentración de biomasa (SSV), de acuerdo a la fórmula:

$$q_{O_2} \text{ (mg } O_2/\text{mg SSV}\cdot\text{h)} = \frac{VCO \text{ (mg } O_2/\text{L}\cdot\text{h)}}{SSV \text{ (mg/L)}} \quad (20)$$

El intervalo para una buena  $q_{O_2}$  es de 0.008 - 0.02 mg  $O_2$  / mg SSV - h. Cuando el sistema se encuentra en estado estacionario, la velocidad de consumo de oxígeno, al igual que otros parámetros, como la concentración de sólidos y DQO, deben de permanecer constantes, de lo contrario es indicativo de que el sistema está saliendo del estado estacionario, y se puede perder el control del reactor.

#### Microbiología:

En un sistema de lodos activados se pueden encontrar diversos tipos de microorganismos, como bacterias, protozoarios, rotíferos y organismos filamentosos (bacterias y hongos). Cada uno de estos microorganismos presenta un mejor desarrollo bajo ciertas condiciones ambientales, por lo tanto, la eficiencia de operación de un sistema de lodos activados estará relacionada con el tipo de microorganismos que se encuentren presentes. Si se analiza una muestra de lodos diariamente, es posible observar los cambios que ocurren en el número relativo o la proporción de microorganismos, teniendo así un indicativo de la estabilidad del proceso. Este método presenta el inconveniente de ser muy subjetivo, y su aplicación depende en gran medida de la experiencia del operador de la planta.

## 5.4. CONTROL Y AUTOMATIZACION

### 5.4.1. Biorreactores

En la década pasada, la aplicación de monitoreo y control en los procesos biotecnológicos se ha generalizado, no solo a nivel laboratorio y planta piloto, sino que también en instalaciones de producción comercial. El uso de computadoras para el control de procesos biotecnológicos ha aumentado significativamente en la última década, debido principalmente a la disminución en el costo del equipo, un aumento importante en la velocidad de procesamiento de datos, el aumento en la confiabilidad de los nuevos equipos y la presión económica para mejorar la productividad, rendimiento y control de calidad de los productos biotecnológicos (Pons, 1992). La introducción de microprocesadores ha tenido un gran impacto sobre todo en aplicaciones de computación en

tiempo real sobre procesos de fermentación. Las microcomputadoras representan una forma económica y confiable de integrar el control computarizado a los bioprocesos, además llevan a cabo tareas tales como identificación en línea, control adaptativo y procesos de optimización.

Todas las plantas nuevas en la industria biotecnológica están equipadas, en mayor o menor grado con sistemas de control de procesos. A medida que avance el desarrollo de sistemas de automatización y control, un número mayor de plantas estarán controladas por computadora en los próximos años. Debido a que los controladores modernos son específicos a el proceso para el cual están diseñados, estos deben de ser adaptados a cada caso particular, tomando en cuenta la estrategia e implementación del control, ya que en algunos casos el sistema de control se vuelve igualmente importante que el reactor. De esta forma, el sistema de control representa el 15 % o más de los costos de inversión de una planta (Lübbert, 1991). Por lo tanto el sistema de control y el reactor son interdependientes y su desarrollo debe de ser simultáneo.

El uso de computadoras en biotecnología para la adquisición de datos y control de variables en el transcurso de una fermentación es una herramienta importante para lograr una mejor comprensión de los fenómenos que ocurren dentro del biorreactor. Además, el control computarizado facilita adecuar el proceso a los requerimientos específicos de un cultivo y permite la manipulación de los datos adquiridos, proporcionando las bases necesarias para la optimización de un bioproceso. Sin embargo, los sistemas de control automático no han sido implementados extensivamente en fermentaciones e industrias ya establecidas, debido principalmente a la complejidad de los procesos y a la falta de instrumentos para monitorear su comportamiento dinámico en forma adecuada (Williams, 1988). En la actualidad existen varios sistemas comerciales de adquisición de datos y control para bioprocesos que llevan a cabo tareas que van desde el simple monitoreo de parámetros y almacenamiento de datos, hasta sistemas multitareas que controlan cada una de las operaciones de un proceso industrial, e integran y optimizan los tiempos de operación de todo el proceso. No obstante, la mayoría presentan desventajas, entre las que destacan: su alto precio, que puede llegar hasta \$ 120,000 dólares (Schneider, 1992); la poca flexibilidad, ya que sólo algunos son programables por el usuario y las tareas que se pueden programar son limitadas; y dificultad de operación y aprendizaje, puesto que en muchos casos se requiere cursar una capacitación previa a la operación del sistema (Oosterhuis et al, 1984). A pesar de que recientemente han surgido programas más amigables que resuelven algunas de las desventajas mencionadas, aún existen muchos problemas que han impedido la generalización del uso de computadoras para el monitoreo y control de bioprocesos.

Las tendencias más recientes en control incorporan el uso de inteligencia artificial en

diversas áreas de la biotecnología moderna (Stephanopoulos and Stephanopoulos, 1986) entre estos esquemas de control se encuentran los llamados "sistemas expertos", los cuales llevan los diferentes controles del proceso a un nivel superior, encargado de supervisar y tomar decisiones sobre el tipo de control más adecuado para cada subnivel (Orr, 1992). Otra de las herramientas que han tomado un gran impulso son las "redes neuronales", las cuales utilizan asociaciones de datos en forma similar al sistema nervioso, para resolver problemas donde no se cuenta con información completa (Karim and Rivera, 1992). En estas situaciones es necesario contar con sistemas de control lo suficientemente versátiles y poderosos para poder incorporar tales conceptos novedosos sin la necesidad de adquirir infraestructura adicional. Asimismo, en ciertos campos, como por ejemplo en investigación, que se caracterizan por un alto dinamismo, se requieren de sistemas versátiles que se adapten a las necesidades cambiantes.

#### 5.4.2. Sistemas de Lodos Activados

El tratamiento biológico de aguas residuales por medio de lodos activados es un proceso ampliamente utilizado en todo el mundo durante muchos años, por lo cual la operación de este tipo de plantas debería ser predecible y satisfactoria. Sin embargo, si se observan los registros de operación de una planta, es notorio que las consideraciones de diseño en pocas ocasiones se cumplen (Marsili-Libelli, 1983), resultando en fallas de manejo con grandes repercusiones económicas y ambientales. El diseño de plantas de tratamiento de aguas residuales requiere de la utilización de modelos matemáticos que describen el crecimiento y consumo de oxígeno de los lodos activados. Estos modelos son descritos generalmente mediante algunas variables que requieren ser calculadas experimentalmente. En las últimas décadas se han propuesto muchos modelos para el proceso de lodos activados. Los modelos más empleados son relativamente sencillos, y describen sólo el estado estacionario de cultivos completamente mezclados (Gujer and Henze, 1991). En estos casos, los cultivos continuos son los que más comúnmente se emplean para determinar las diversas constantes cinéticas utilizadas en los modelos matemáticos.

La mayoría de los sistemas de tratamiento de aguas que actualmente funcionan han sido diseñados utilizando los criterios tradicionales de estado estacionario, generalmente como resultado de un estudio de tratabilidad, y por lo tanto la operación se lleva a cabo mediante reglas no variables y criterios de descarga (Novonty et al, 1992). Sin embargo, la situación real es que las condiciones de entrada al sistema son altamente variables, en ocasiones hasta en un orden de magnitud, por lo que es difícil operar este sistema dinámico utilizando criterios de control tradicionales basados en el estado estacionario.

Otro factor que ha disminuido drásticamente el avance en el desarrollo de sistemas

automatizados de tratamiento de aguas es la falta de sensores precisos y confiables para el monitoreo de las principales variables que determinan el estado del proceso. En las últimas dos décadas se ha presentado un considerable avance en el desarrollo de instrumentación para monitoreo y control de procesos biotecnológicos. Esto ha sido posible gracias a la combinación de técnicas de microelectrónica y biotecnología. Un producto de este avance, han sido los biosensores, constituidos por un material biológicamente activo (por ejemplo enzimas, anticuerpos, fragmentos celulares, células completas), en contacto con un transductor que convierte la señal biológica en una señal eléctrica (Galindo, 1986, Aston, 1992). El substrato a medir difunde hacia la capa biocatalítica en donde ocurre una reacción, ya sea consumiendo o generando especies electroactivas que pueden ser monitoreadas amperométricamente o potenciométricamente.

En la determinación de la DBO se emplean técnicas titulométricas, sin embargo no pueden ser usadas para mediciones en línea. La determinación de la DBO mediante el uso de biosensores tiene algunas ventajas, por ejemplo, las muestras pueden ser medidas en un amplio rango de concentraciones sin tratamientos previos y no son afectadas por la turbidez. Se han desarrollado algunos biosensores para este propósito (García et al., 1993). Estos dispositivos están compuestos por microorganismos inmovilizados (biocatalizador) en combinación con un sensor electroquímico de oxígeno. Utilizando este tipo de sensores de repuesta rápida, es posible mejorar en gran medida el control de sistemas de tratamiento de aguas residuales, ya que la estimación de parámetros tales como carga orgánica másica se obtiene en tiempos muy cortos, haciendo posible realizar las acciones de control pertinentes para cambios bruscos en el sistema.

Otras técnicas que se han reportado como parámetro de control, son las mediciones respirométricas (Sushka and Ferreira, 1986; Shamas and Englande, 1992), las cuales proporcionan una estimación del estado metabólico de las bacterias; además se han desarrollado sensores para el monitoreo de ATP en la biomasa (Van Esbroeck et al., 1984) e inclusive se han utilizado parámetros de dinámica poblacional para identificar problemas en el sistema (Cingolani et al, 1992). Un sistema ideal de tratamiento de aguas debe de incorporar tanto la capacidad de estimación en línea de los parámetros más relevantes para el proceso, como de un modelo que represente en forma adecuada el comportamiento dinámico del sistema y contar con la posibilidad de aplicar esquemas de control eficientes. Los avances recientes en este tipo de sistemas incluyen desde equipo de monitoreo (Sweeney, 1992); nuevos modelos tanto determinísticos como estocásticos (Aitken et al., 1992; Gujer and Henze, 1991); sistemas de control computarizado convencional (Nam et al, 1993) y empleando técnicas de inteligencia artificial (Tyagi et al., 1993; Pullammanappallil et al, 1993).

## VI. MATERIALES Y METODOS

## 6.1. SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS

Durante el desarrollo del proyecto, se diseñó y construyó un sistema de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados a escala laboratorio. La geometría de este sistema de lodos activados (SLA), así como sus parámetros operacionales se diseñaron con el criterio de simular lo mejor posible plantas existentes. El SLA consta de (ver Figura 1):

- a) Un reactor cilíndrico de 30 cm de diámetro y de 50 cm de altura, construido en acrílico de 0.5 cm de espesor. El reactor se opera a un volumen de 25 litros y cuenta con cuatro deflectores del 10 % de diámetro del tanque colocados a 90°. La agitación se efectúa a través de un motor de 1/75 HP provisto de 2 turbinas tipo Rushton y operando a 750 rpm, en forma intermitente en períodos de 30 min con agitación y 30 min sin agitación. La agitación intermitente se llevó a cabo con el fin de evitar problemas de sobre calentamiento del motor, esta deficiencia en la agitación es compensada por la turbulencia provocada por aireación. La aireación se lleva a cabo por medio de un difusor (piedra aireadora) al que se suministra aire a 0.24 vvm, medido en un rotámetro Brooks modelo 1350EMB. El reactor cuenta con una tapa de acrílico no hermética, por lo que el sistema es abierto (no estéril).
- b) Un sedimentador piramidal con un ángulo de 35° construido en acrílico de 0.5 cm de espesor y con capacidad de 15 litros. Al igual que el reactor, el sedimentador es abierto con una tapa de acrílico.
- c) Bombas peristálticas para entrada de medio al reactor (agua residual sintética), y recirculación del sedimentador al reactor.
- d) Tanques de retención para entrada de medio y salida de efluente clarificado.

El reactor se operó a un flujo de alimentación de medio de 1.2 mL / min, teniendo un tiempo de retención hidráulica de 14 días, que es el recomendado para el tratamiento de aguas de desecho industriales mediante lodos activados (Celanese, 1992). Inicialmente se mantuvo una recirculación continua de lodos activados del sedimentador al reactor, sin embargo, debido a la escala tan pequeña del sistema, los flujos manejados son muy bajos, ocasionando obstrucciones en las mangueras. Por lo tanto se decidió operar en forma semicontinua (intermitente), bombeando diariamente los sólidos contenidos en el fondo del sedimentador al reactor durante 5 minutos con

un flujo de 33 mL / min. Para evitar el taponamiento de las mangueras debido al crecimiento celular, se lavaban las tuberías cada 4 días con benzal al 50% y se enjuagaban con una solución de etanol al 70% para decolorar y eliminar residuos de obstrucción en las mismas, posteriormente se enjuagaban con agua.

Con la finalidad de obtener un sistema modelo en el cual se pudiera controlar en forma reproducible la calidad del agua de desecho alimentada al SLA y biorreactor, se decidió trabajar con una agua de desecho sintética de composición conocida. La formulación de aguas sintéticas en sistemas modelos es una metodología generalizada y ejemplo de esto se puede observar en los trabajos de Bouillot et al. (1990) y de Sheintuch et al (1986). Ya que se han reportado un gran número de composiciones de aguas de desecho sintéticas, se decidió utilizar aquella que resultara en valores cercanos a una DQO de 1000 mg / L. La composición se formuló para obtener una relación DQO:N:P de aproximadamente 100 : 5 : 1 (composición recomendada para el tratamiento de aguas de desecho industriales mediante lodos activados, Celanese, 1992). Con estas condiciones la DQO de entrada al SLA asemeja la situación encontrada en un gran número de sistemas de tratamiento de aguas de desecho industriales.

Tabla 2. Composición del agua de desecho sintética utilizada.

Extracto de levadura	150	mg / L
Glucosa	500	mg / L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200	mg / L
MgSO <sub>4</sub>	30	mg / L
CaCl <sub>2</sub>	5	mg / L
Agua no destilada (de la llave)	100	mL / L

El inóculo utilizado para el SLA fué seleccionado a partir de muestras tomadas de las plantas de tratamiento de aguas de ECCACIV, en Cuernavaca, Morelos; Celanese en Minatitlán, Veracruz, y la refinera de Pemex en Tula, Hidalgo. El SLA fué caracterizado durante su operación mediante el monitoreo de los siguientes parámetros:

- Demanda Química de Oxígeno (DQO); determinada con el fin de evaluar la materia orgánica utilizada como sustrato por los lodos activados.
- Sólidos suspendidos totales y volátiles; determinados con el fin de estimar la biomasa.
- Densidad óptica; utilizada como auxiliar en la estimación de biomasa.
- Sólidos sedimentables; determinados como parámetro adicional para estimar la biomasa.
- Velocidad de Consumo de Oxígeno (VCO); determinada como una medida indirecta del crecimiento o actividad de biomasa.

Inicialmente los parámetros a, b y c se determinaron diariamente, una vez que se alcanzó el estado estacionario, éstos se determinaron una vez a la semana. Los parámetros d y e fueron determinados semanalmente durante toda la operación del sistema. En el caso de la medición de DQO, las técnicas tradicionales están diseñadas para sistemas de tratamiento reales en donde se dispone básicamente de una cantidad de muestra ilimitada. En nuestro caso, sin embargo, debido a la escala tan pequeña del sistema modelo, las técnicas se tuvieron que modificar para muestras pequeñas.

## 6.2. CULTIVO EN BIORREACTOR

Los cultivos por lotes y exponencialmente alimentados fueron llevados a cabo en un fermentador de 2 litros Omni-Culture (Virtis Co, Gardiner NY), equipado con dos turbinas tipo Rushton de 6 paletas agitando a 600 rpm y operando como un sistema abierto a una temperatura controlada a 29° C. La medición de parámetros del reactor en línea se llevó a cabo utilizando sensores convencionales, tales como un termistor, un electrodo de pH Ingold modelo 465 (Ingold Electrodes Inc. Wilmington MA), acoplado a un transmisor de pH Ingold modelo 2300; un electrodo de potencial REDOX Ingold, acoplado a un medidor/controlador de pH Chemcadet (Cole Parmer, Chicago IL); y un sensor de oxígeno disuelto de tipo polarográfico Ingold modelo 20248 con amplificador de oxígeno Ingold modelo 170. Para la entrada de gases se utilizó una mezcla de oxígeno y nitrógeno, que se controló mediante medidores/controladores de flujo másico Brooks 5850E, controlados por una fuente de poder/controlador Brooks 5878, acoplada a la interfase analoga-digital. La alimentación de medio de cultivo se realizó mediante una bomba peristáltica dual controlada por microprocesador, Biochem Technology modelo 410-C y acoplada a la computadora mediante la interfase RS 232-C. Se llevaron a cabo un total de 6 experimentos de cultivo por lotes y 14 de cultivo exponencialmente alimentado.

## 6.3. CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS

Los cultivos exponencialmente alimentados se inocularon usando 400 mL de la fracción sedimentada de una muestra de un litro tomada del sistema de lodos activados. Ya que esta muestra representa un 4 % del volumen total del reactor, este protocolo experimental permitió realizar experimentos múltiples en períodos de tiempo cortos (menos de una semana), sin perturbar el sistema de lodos activados. Debido al extremadamente lento comportamiento dinámico de un sistema de lodos activados dicho protocolo adquiere una gran relevancia ya que se requeriría del orden de meses para estabilizar un sistema de lodos activados después de alguna perturbación. El planteamiento teórico de este tipo de cultivos se describe a continuación.

El trabajo desarrollado por Yamane y Shimizu (1984) demostró que los cultivos exponencialmente alimentados operados en la modalidad de volumen variable, pueden aproximar en forma muy similar a un cultivo continuo. Ya que un sistema de lodos activados, con o sin retención de sólidos, es esencialmente un quimiostato, es posible utilizar el cultivo exponencialmente alimentado como una alternativa para la caracterización de procesos de tratamiento de aguas residuales. Keller y Dunn (1978) y Esener et al. (1981) han demostrado que los cultivos alimentados constituyen una herramienta experimental muy útil para propósitos de modelamiento y para estudios de caracterización de cinética y energética microbiana. Sin embargo, la operación de cultivos alimentados ha sido explotada casi exclusivamente en su modalidad de volumen constante como un método para incrementar la concentración celular y productividad en cultivos de una sola especie (axénicos) (Yamane and Shimizu, 1984; Yee and Blanch 1992). Solo recientemente Ramírez et al (1994) e Higareda et al (1994) han demostrado la utilidad de los reactores exponencialmente alimentados de volumen variable en cultivos axénicos de *E. coli* recombinante e híbridomas, respectivamente.

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada durante el presente trabajo de investigación, el cultivo exponencialmente alimentado nunca ha sido utilizado para investigar el comportamiento de poblaciones microbianas mixtas en sistemas de tratamiento de aguas residuales. En comparación con los quimiostatatos, los cultivos exponencialmente alimentados de volumen variable son más fáciles de operar a velocidades de dilución bajas y no ocurren lavados reales aún a velocidades de dilución mayores a la velocidad específica de crecimiento máxima (Ramírez et al. 1994). Además, en los cultivos exponencialmente alimentados el estado estacionario se alcanza rápidamente, y su comportamiento transitorio es parecido al de un quimiostato.

El desarrollo del cultivo exponencialmente alimentado está basado en el siguiente análisis. A partir de un balance de células, teniendo una entrada de medio estéril y ningún flujo de salida:

$$\frac{dxV}{dt} = xV\mu \quad \Rightarrow \quad x \frac{dV}{dt} + V \frac{dx}{dt} = xV\mu \quad (21)$$

Donde,  $x$ ,  $V$ ,  $\mu$  y  $t$  son concentración celular, volumen, velocidad específica de crecimiento, y tiempo, respectivamente. Rearreglando (21), obtenemos:

$$\frac{dV}{V} + \frac{dx}{x} = \mu dt \quad (22)$$

integrando:

$$\int_{V_0}^V \frac{dV}{V} + \int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \int_0^t \mu dt \quad (23.)$$

$$\ln \frac{V}{V_0} + \ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (24)$$

Donde el subíndice 0 indica la condición inicial. Para mantener una concentración celular constante, se debe cumplir la condición  $x = x_0$ , por lo tanto:

$$\ln \frac{V}{V_0} = \mu t \quad (25)$$

por lo tanto el volumen del biorreactor irá cambiando con respecto al tiempo de acuerdo a:

$$V_t = V_0 \exp(\mu t) \quad (26)$$

El cambio en el volumen se logra alimentando de acuerdo a la función de flujo:

$$\frac{dV_t}{dt} = F_t = V_0 \mu \exp(\mu t) \quad (27)$$

La velocidad de dilución, D estará entonces dada por:

$$D = \frac{F}{V} = \frac{V_0 \mu \exp(\mu t)}{V_0 \exp(\mu t)} = \text{constante} \quad (28)$$

substituyendo la ecuación (26) en el balance de células (21) obtenemos:

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu - D) \quad (29)$$

De igual forma, a partir del balance de sustrato, se obtiene:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_e - S) - \frac{\mu x}{Y} \quad (30)$$

Es importante notar que las ecuaciones (29) y (30) son básicamente las mismas que describen el comportamiento transitorio de un quimiostato, así como las de un sistema de lodos activados sin recirculación de biomasa (ver ecuaciones (9) y (15) en la sección de introducción). Esto es posible debido a que al especificar un flujo que se incrementa exponencialmente, se obtiene una velocidad de dilución constante (ecuación (28)). Por lo tanto el cultivo exponencialmente representa una herramienta útil para simular un quimiostato y/o un sistema de lodos activados, sin presentar las desventajas operacionales que tienen estos tipos de sistemas.

#### 6.4. SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS

Se desarrolló un programa de computo, diseñado específicamente para poder controlar las variables más relevantes de un SLA y/o biorreactor, como lo son el oxígeno disuelto, pH, y flujos volumétricos y máscos de líquidos y gases (Aguilar-Aguila et al, 1993). El software permite además, la adquisición en línea de dichos parámetros, el cálculo de variables secundarias tales como velocidades de consumo de oxígeno y el despliegue en pantalla de gráficas y tablas, todo esto en línea y en tiempo real. Las características principales del software diseñado son su versatilidad para incorporar distintos esquemas de control, adquisición, procesamiento y presentación de datos, así como la facilidad (amigable) de ser usado y modificado en un mínimo de tiempo por personas sin experiencia en computación. Asimismo, se seleccionó e instaló el hardware o equipo necesario como tarjetas de interfase, relevadores y amplificadores, y se integró al software resultando en un sistema completo de control y adquisición de datos. La figura 2 muestra un diagrama del sistema de control y adquisición de datos montado en un biorreactor a escala laboratorio.

La parte central del sistema de adquisición de datos y control es la tarjeta de conversión análoga-digital de 12 bits "MacADIOS II", (GW Instruments, Cambridge MA) instalada en una computadora personal Macintosh IIsi (microprocesador Motorola 68030, a 20 MHz, y coprocesador Motorola 68882). El sistema se configuró para operar con 8 canales de entrada análoga diferencial (2 polos), y 2 canales de salida análoga, ambos con un rango de operación de 0 a 10 VCC, en incrementos de 2.44 mV; las señales análogas se amplifican mediante un subsistema acondicionador de señal Analog Devices serie 5B. Además se cuenta con 8 canales de entrada digital y 8 canales de salida digital (+ 5 VCC) y relevadores Opto-22 para convertir las entradas y salidas digitales a 120 VCA y poder encender y apagar equipo desde la computadora.

El programa de adquisición de datos y control se escribió en el lenguaje de programación Microsoft QuickBASIC® para Macintosh, utilizando una librería MacADIOS, siguiendo el algoritmo que se describe a continuación:

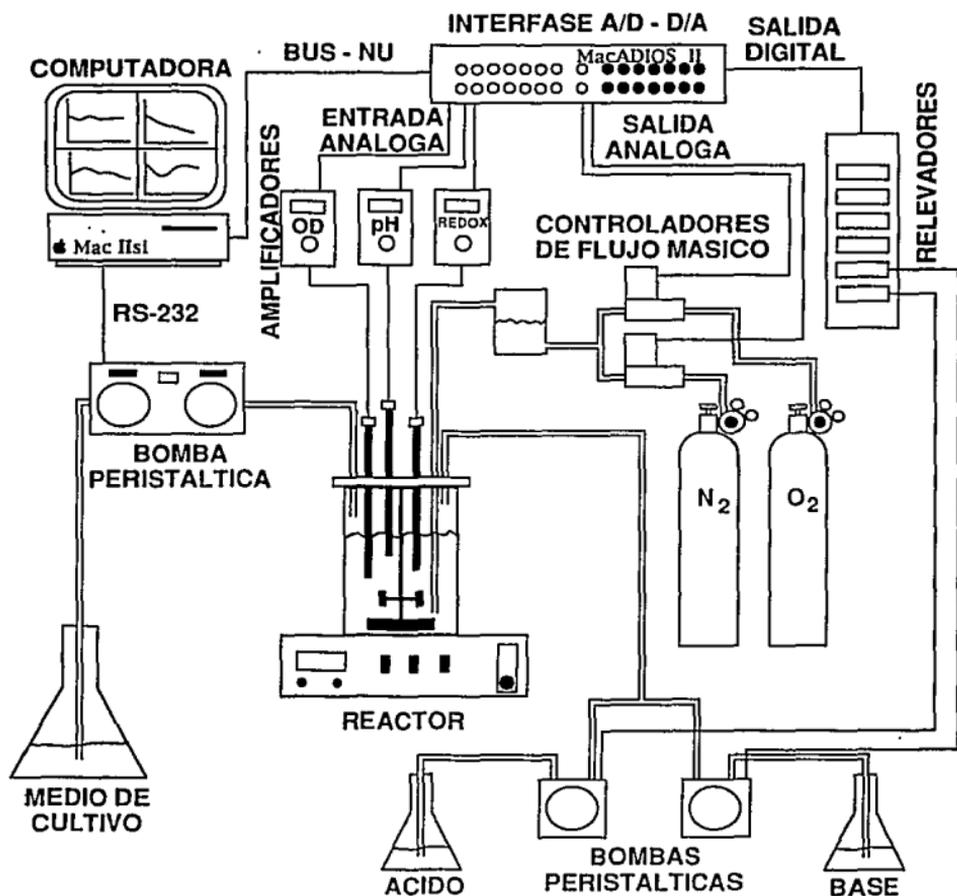


Figura 2. Esquema de los componentes del sistema de control y adquisición de datos acoplado a un fermentador.

1. Introducción de las condiciones en las que se desea operar el biorreactor.
2. Adquisición de datos y tiempo en el que se adquieren.
3. Cálculo del flujo de alimentación de medio y demás variables secundarias, y accionamiento o ajuste de la bomba de alimentación y actuadores de control.
4. Despliegue y graficación de los datos en pantalla.
5. Promedio y archivo de datos en el intervalo de tiempo determinado.
6. Comparación de variables actuales con los valores deseados, y control.
7. Repetición de los pasos 2 al 5.
8. Al terminar el tiempo de fermentación seleccionado, terminar el programa.

El programa cuenta con subrutinas de control Proporcional y Proporcional-Integral-Derivativo (PID) para oxígeno disuelto y control Encendido / Apagado (On/Off) para pH. Para cultivos exponencialmente alimentados la alimentación se efectúa siguiendo el perfil exponencial predefinido descrito anteriormente, mediante una bomba peristáltica interfazada mediante el estándar RS-232-C. La figura 3 muestra el diagrama de bloques del programa de control y adquisición de datos, y la figura 4 muestra un despliegue típico de las gráficas y datos que aparecen en la pantalla de la computadora. En el apéndice 9.3. se muestra un listado del programa completo.

### 6.5. SISTEMA DE ANALISIS DE FLUJO INYECTADO

El análisis de flujo inyectado se basa en la inyección de una muestra líquida de volumen definido en una corriente móvil de un líquido acarreador adecuado. La muestra inyectada forma una zona que empieza a dispersarse y/o reaccionar con el acarreador mientras es transportado hacia un detector, en el cual se mide la concentración de la muestra o el producto de la reacción (Schügerl, 1991). Basado en este principio, el sistema de adquisición de datos y control se adaptó a una serie de válvulas solenoides, bombas y cámaras de medición, con el fin de automatizar la medición de la VCO y la DBO (García et al., 1993). En la figura 5 se muestra un diagrama del sistema de flujo inyectado acoplado al sistema de lodos activados. En el apéndice 9.4. se presenta un listado del programa completo para análisis de flujo inyectado. A continuación se describe la adaptación del análisis de flujo inyectado en la determinación de estos dos parámetros: la velocidad de consumo de oxígeno y la demanda bioquímica de oxígeno.

#### 6.5.1. Velocidad de Consumo de Oxígeno

Esta prueba se utiliza para determinar la velocidad de consumo de oxígeno de una muestra en una suspensión biológica, tal como los lodos activados. Cuando se realiza como una prueba de

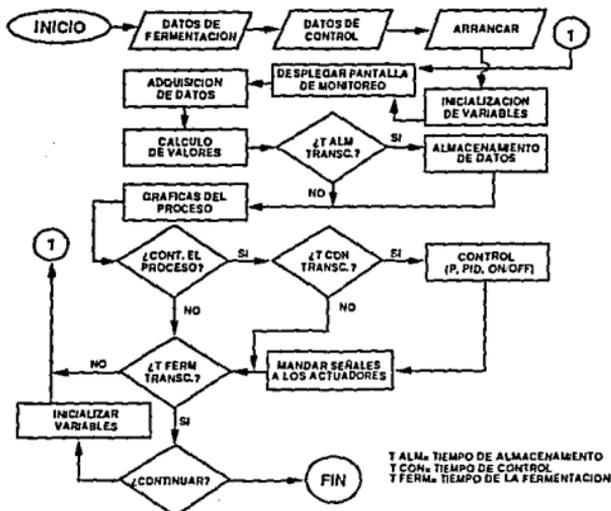


Figura 3. Diagrama de flujo general utilizado por el sistema de control y adquisición de datos



Figura 4. Pantalla de interfase con el usuario del sistema de adquisición de datos y control durante una fermentación exponencialmente alimentada

rutina en la operación de una planta de tratamiento de aguas, puede indicar en forma inmediata cambios en las condiciones de operación.

Para llevar a cabo las mediciones, previamente se debe de polarizar el electrodo de oxígeno, conectándolo al amplificador durante al menos 6 horas. Posteriormente se calibra el electrodo, colocándolo en una solución de agua provista de aireación hasta que su concentración de oxígeno no varíe, y se ajusta en el valor de saturación de aire (100 %). Una vez que el electrodo está listo para las mediciones, el sistema se encarga de los siguientes pasos:

- 1.- Se introduce una muestra de 300 mL en la cámara de medición provista de agitación suave para minimizar la transferencia de oxígeno a través de la interfase gas/líquido de la superficie, en esta cámara se encuentra el electrodo de oxígeno disuelto.
- 2.- Se adquieren los datos de oxígeno disuelto (O.D.) durante un intervalo de 15 minutos.
- 3.- En una gráfica de O.D. contra tiempo, se calcula la pendiente, y se convierte a velocidad de consumo de oxígeno multiplicando por la concentración de oxígeno en saturación.
- 4.- Se regresa la muestra al reactor.

Si sabemos que la concentración de oxígeno del agua saturada con aire es 6.84 mg/L (a 25° C en la ciudad de Cuernavaca, Morelos), la velocidad de consumo de oxígeno se puede calcular a partir de la fórmula:

$$k_1 a [C^* - C_L] - VCO = \frac{dC_L}{dt} \quad (31)$$

si no hay aireación:  $k_1 a [C^* - C_L] = 0$

$$\frac{dC_L}{dt} = -VCO \quad (32)$$

$$VCO \left( \frac{mg}{L-h} \right) = \left[ \frac{\text{Pendiente (O.D. vs t)}}{100 \%} \left( \frac{\%}{h} \right) \times 6.84 \left( \frac{mg O_2}{L} \right) \right] \quad (33)$$

La velocidad específica de consumo de oxígeno se calcula utilizando la ecuación (20) de la sección de introducción. Al calcular la pendiente en la gráfica de O.D. vs t, se estimó el error experimental a partir del coeficiente de correlación, obteniéndose un intervalo de 0.1 - 2 % para los distintos experimentos. En algunos casos el electrodo de oxígeno presentó problemas, por lo que se obtuvieron errores hasta del 9 %.

### 6.5.2. Demanda Bioquímica de Oxígeno

En la determinación tradicional de la DBO se emplean técnicas titulométricas que requieren de tiempos de por lo menos 5 días, por lo que no pueden ser usadas para mediciones en línea. La determinación de la DBO mediante el uso de biosensores tiene algunas ventajas, por ejemplo, las muestras pueden ser medidas en un amplio intervalo de concentraciones sin tratamientos previos y no son afectadas por la turbidez. Además, lo más importante, es que permite la determinación en línea de la DBO, lo cual posibilita el desarrollo de estrategias de control computarizadas. Se han desarrollado algunos biosensores para este propósito, y estos dispositivos están compuestos por microorganismos inmovilizados en combinación con un sensor electroquímico de oxígeno.

Mediante cambios a las subrutinas, el sistema se adaptó para usarse con un biosensor para la medición de DBO. El principio del instrumento consiste en un sensor convencional de oxígeno, el cual se ha acoplado a una doble membrana en la que se encuentra inmovilizada una población de bacterias (García et al., 1993). Al introducir el electrodo en agua de desecho, las bacterias consumen el oxígeno de la muestra, el cual se cuantifica como un cambio en el voltaje de salida del electrodo. La principal ventaja que presenta el biosensor es que el tiempo en que se realiza la medición se reduce de 5 días a menos de 5 minutos. El sistema se encarga de accionar una serie de válvulas solenoides y bombas para llenar una cámara de medición donde se encuentra el electrodo con solución amortiguadora. El sistema adquiere datos del electrodo hasta obtener una lectura estable (corriente basal), en ese momento, el sistema toma la decisión de vaciar el amortiguador de la cámara y llenarla con la muestra que se desea medir. El sistema espera una vez más la lectura estable y calcula la diferencia de voltajes. Esta diferencia es comparada con una curva de calibración realizada mediante el método tradicional para DBO. En el caso de que la muestra tenga una DBO muy alta, excediendo el intervalo de medición del biosensor, el sistema realiza diluciones de la muestra, ajustando posteriormente el resultado por la dilución realizada. Un diagrama de el sistema completo se muestra en la figura 5. Adicionalmente, el sistema cuenta con una rutina de autocalibración, en donde se realizan mediciones con diferentes diluciones de una solución estándar. De esta forma, el sistema permite una operación totalmente automática y posibilita la aplicación del biosensor en algoritmos sofisticados para sistemas de tratamiento de aguas de desecho. En la figura 6 se presenta el diagrama de bloques del algoritmo utilizado por el sistema.

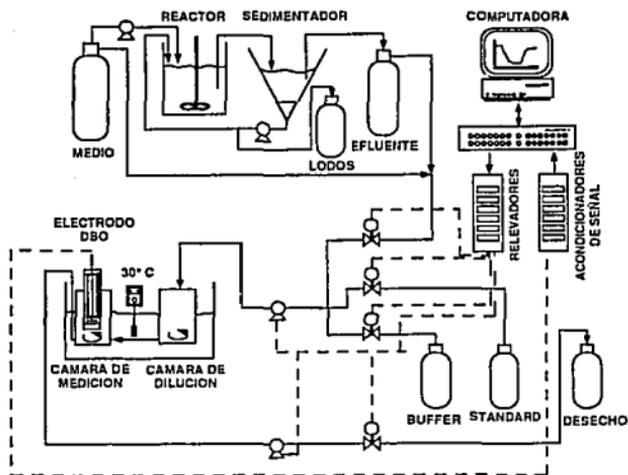


Figura 5. Esquema del sistema de lodos activados acoplado al sistema de flujo inyectado con un biosensor para DBO.

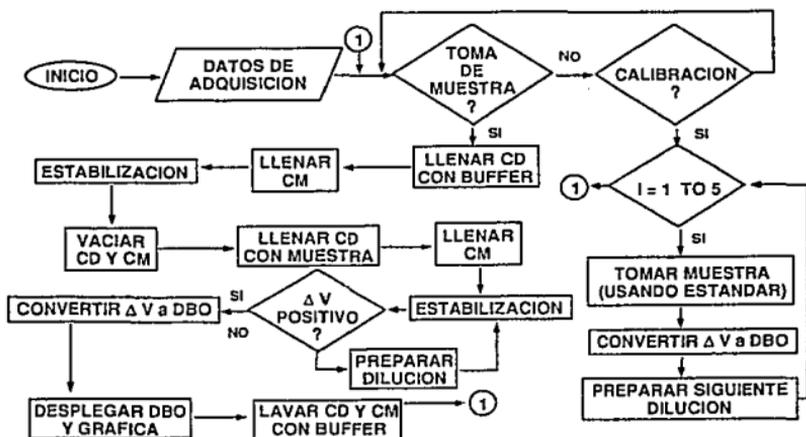


Figura 6. Diagrama del algoritmo para el sistema de análisis de flujo inyectado.

## 6.6. TECNICAS DE ANALISIS

### 6.6.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

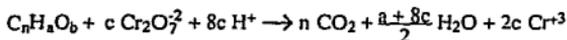
La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se define como la cantidad de oxígeno requerido para oxidar, bajo condiciones químicas específicas, la materia orgánica e inorgánica oxidable contenida en el agua. La DQO se expresa en mg de oxígeno / L. y proporciona una medida de la cantidad de sustancias susceptibles de ser oxidadas bajo las condiciones en que se efectúa esta prueba.

El método de reflujo abierto para determinar la DQO se basa en la oxidación de la mayoría de la materia orgánica en una muestra de agua (del 95 al 100 % del valor teórico), mediante una mezcla de ácido crómico y sulfúrico. Para la oxidación de la biomasa se establece la siguiente reacción:



donde  $C_5H_7NO_2$  es la composición molecular que generalmente se ha encontrado que representa adecuadamente la biomasa. Dividiendo el peso molecular del oxígeno utilizado entre el peso molecular de la biomasa obtenemos que 1 mg de biomasa equivale a  $5 (32 / 113) = 1.42$  g DQO / g biomasa. Para llevar a cabo la medición, la muestra se coloca en solución fuertemente ácida en presencia de un exceso conocido del agente oxidante dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), en reflujo y en la presencia de  $Ag(SO_4)_2$  como catalizador. Después de la digestión, el dicromato que permanece sin reducir, se titula utilizando sulfato ferroso amoniacal ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ), y se calcula el equivalente de oxígeno necesario para oxidar totalmente la muestra.

La prueba de demanda química de oxígeno es ampliamente utilizada para cuantificar el grado de contaminación de desechos líquidos domésticos e industriales. Esta prueba permite medir el residuo en términos de la cantidad total de oxígeno requerido para oxidarlo químicamente a bióxido de carbono y agua. En base a que todos los compuestos orgánicos, con pocas excepciones pueden ser oxidados por agentes oxidantes fuertes, en condiciones ácidas, la materia orgánica representada por la fórmula general  $C_nH_xO_b$  es oxidada químicamente por el dicromato, en presencia de un donador de protones (medio ácido), para obtener bióxido de carbono y agua, de acuerdo a la reacción:



siguiendo la estequiometría de la reacción, a partir de un balance de oxígeno, los moles de dicromato requeridos para llevar a cabo la reacción serán:

$$c = \frac{2}{3}n + \frac{a}{6} - \frac{b}{3} \quad (34)$$

Esta ecuación nos sirve para determinar la DQO teórica, si conocemos la composición molecular de la materia orgánica. En la práctica, para la determinación de DQO se lleva a cabo la oxidación en presencia de un exceso de dicromato, y posteriormente se titula el dicromato remanente, cuantificando en forma indirecta la materia orgánica oxidada.

Técnica para determinación de DQO:

Este método es adecuado para niveles mayores de 60 mg / L y menores de 2000 mg / L de DQO. (APHA, 1989).

Para un volumen de muestra de 20 mL:

- 1.- Transferir en un matraz de bola fondo plano, boca esmerilada, 20 mL de muestra.
- 2.- Agregar sulfato mercúrico en pequeña porción ( $\approx 0.01$  g).
- 3.- Agregar 10 mL de dicromato de potasio 0.25 N.
- 4.- Agregar 30 mL de ácido sulfúrico-sulfato de plata.
- 5.- Conectar el matraz al condensador y hacer circular el agua de enfriamiento.
- 6.- Calentar la muestra, dejar ebullición por dos horas (contando desde el momento en que empieza la ebullición).
- 7.- Dejar enfriar.
- 8.- Agregar aproximadamente 10 mL de agua destilada por la parte superior del condensador.
- 9.- Retirar el matraz del condensador y enfriar a temperatura ambiente.
- 10.- Diluir con agua destilada hasta un volumen final de la muestra de 120 mL.
- 11.- Agregar 8 gotas de fenantrolina como indicador.
- 12.- Titular con una solución de  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$  0.25 N, previamente valorada.
- 13.- La titulación termina cuando se nota un viraje de color azul verdoso a café rojizo.
- 14.- Realizar simultáneamente los pasos 2 al 12 utilizando un testigo preparado con 20 mL de agua y los reactivos requeridos para procesar la muestra.

- 15.- Para niveles menores de 50 mg / L de DQO se procede como se indica en la técnica pero utilizando soluciones de dicromato de potasio 0.025 N y  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  0.025 N.

Modificación para un volumen de muestra de 2 mL (volúmenes más pequeños que 20 mL):

- 1.- Agregar 2 mL de muestra en un matraz aforado.
- 2.- Agregar 18 mL de muestra en el matraz, para tener un volumen final de 20 mL.
- 3.- Agregar 10 mL de dicromato de potasio al 0.025 N.
- 4.- Agregar 30 mL de ácido sulfúrico-sulfato de plata, agitar con movimiento circular.
- 5.- Seguir los pasos 5 al 9 del método para 20 mL de muestra.
- 6.- Agregar 8 gotas de fenantrolina (como indicador).
- 7.- Titular con  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  0.025 N el dicromato de potasio remanente no reducido.

Cálculos:

La DQO se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{DQO} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 8000}{M} \quad (35)$$

en donde:

- V1 = Volumen de la solución de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  utilizado para titular el testigo (agua).  
 V2 = Volumen de la solución de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  utilizado para titular la muestra.  
 N = Normalidad de la solución de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  utilizado en la determinación.  
 8000 = Equivalencia del dicromato gastado para la oxidación, expresado en mg de oxígeno / L.  
 M = Volumen de muestra en mL.

Validación del método:

Para estimar la confiabilidad del procedimiento de manejo y volumen de muestra se determinó la desviación estándar después de medir la misma muestra 6 veces, los resultados de estos análisis se muestran en la tabla 3.

Al miniaturizar el método, se observa que el error se incrementó hasta 4 veces debido a la precisión de la bureta con que se realiza la titulación ( $\pm 0.5$  ml), por lo cual se decidió hacer una

estimación adicional del sustrato, como lo es la concentración de glucosa. Además, para la determinación de la DQO del sustrato sin considerar la DQO aportada por las células, se utilizaron muestras centrifugadas a 3,000 rpm durante 15 minutos.

Tabla 3. Resultados de las mediciones de DQO de distintas muestras utilizando diferentes volúmenes y manejo de muestra. Nótese que cada renglón se refiere a muestras distintas por lo que no son comparables entre sí.

Volumen y Manejo de Muestra	DQO promedio (mg/L)	Desviación estándar (% de la media)
20 mL de muestra	840.3	1.2
10 mL de muestra	1115.8	1.4
10 mL de muestra (congelando 3 días)	843.5	1.2
2 mL de muestra	654.3	3.3
2 mL de muestra (congelando una semana)	710.1	4.7

#### Comentarios sobre el método:

Este método se recomienda como un complemento de la demanda bioquímica de oxígeno, pero no es un sustituto de ésta. Generalmente la determinación de la DQO se utiliza en el tratamiento y control de las aguas de desecho industrial y sólo en ocasiones particulares puede relacionarse con la demanda bioquímica de oxígeno. El indicador fenantrolina también se le conoce como ferroín u ortofenantrolina. El sulfato de plata requiere un tiempo aproximado de dos días para su completa dilución. La solución formada debe mantenerse en la obscuridad para evitar su descomposición. El sulfato de plata actúa en la reacción como catalizador, incrementando la oxidación de algunos compuestos orgánicos. El sulfato mercúrico se agrega para eliminar la interferencia que representan los cloruros, obeniéndose un complejo de cloruro mercúrico soluble que inhibe la reactividad del ion cloruro. Si la muestra tomada para la determinación es menor de 20 mL se debe completar a ese volumen con agua destilada, esto quiere decir que siempre se tendrá un testigo del mismo volumen de la muestra tomada. Debe de enfriarse rápidamente para evitar la pérdida de materia volátil que contenga la muestra. La mezcla debe de agitarse perfectamente antes de llevarla a calentamiento; de no ser así ocurren sobrecalentamientos locales que proyectan la mezcla fuera del condensador. Para algunas aguas residuales el período de reflujo de 2 horas puede resultar ya sea excesivo o insuficiente, para corregir este problema es necesario experimentar con un mismo tipo de muestra en diferentes tiempos de digestión. El volumen de la muestra que se utilice para niveles inferiores de 50 mg/L debe de ser tal, que la cantidad de dicromato de potasio reducido durante la digestión no exceda del 50 %. En caso contrario se debe repetir la determinación con un volumen menor de muestra.

### Forma de preparar las soluciones:

1.- Dicromato de potasio solución 0.25 N: Disolver 12.25 g de dicromato de potasio (previamente secado a 105 °C durante dos horas, aforar con agua a 1 L y homogeneizar. Solución 0.025: Transferir con una pipeta 100 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 1 L y homogeneizar (dilución 1 : 10).

2.- Sulfato ferroso amoniacal solución 0.25 N: Disolver 98.035 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  en aproximadamente 800 mL de agua y agregar 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, dejar enfriar y aforar a 1000 mL en un matraz volumétrico y homogeneizar. Para valorar la solución se procede de la siguiente manera: Tomar 25 mL de dicromato de potasio 0.25 N; diluir con agua destilada hasta 275 mL. Agregar cuidadosamente 50 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dejar enfriar. Titular con  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  0.25 N. Agregar 8 gotas de fenantrolina como indicador hasta notar un vire de color de azul verdoso a café rojizo.

NOTA : Para el  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  0.025N se hace el mismo procedimiento pero con soluciones de dicromato de potasio 0.025 N.

### 6.6.2. Sólidos

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-AA-34, 1981), la definición para los distintos tipos de sólidos es la siguiente:

El término sólidos totales se aplica al residuo de materia que permanece en un recipiente después de la evaporación de una muestra y su subsecuente secado en un horno a una temperatura dada. Los sólidos totales se dividen en sólidos totales suspendidos, que es la porción que no pasa a través de un filtro, y sólidos totales disueltos, la porción que pasa a través del filtro. Los principales factores que afectan la separación de los sólidos suspendidos de los sólidos disueltos son el tipo de soporte del filtro, el tamaño de poro, porosidad, área y espesor del filtro, y la naturaleza física, tamaño de partícula y cantidad de materia que se deposita en el filtro.

Los sólidos volátiles se definen como la pérdida de peso de los sólidos suspendidos durante ignición a tiempo y temperatura determinados. La determinación de sólidos volátiles no hace una distinción precisa entre la materia orgánica e inorgánica, ya que algunas sales minerales se volatilizan. Generalmente los sólidos suspendidos volátiles se considera que representan la biomasa. El material que se sedimenta durante un período de tiempo determinado se denomina sólidos sedimentables.

## Determinación de sólidos suspendidos totales:

- 1.- Lavar perfectamente un filtro tipo Gooch, secar y adherir con agua un filtro de fibra de vidrio de 2.4 cm de diámetro Whatman 934-AH.
- 2.- Poner a peso constante el filtro tipo Gooch:
  - a) Poner el filtro Gooch en una estufa a 100° C durante 12 horas.
  - b) Sacar de la estufa, y dejar enfriar en un desecador a temperatura ambiente.
  - c) Cuando el filtro está a temperatura ambiente pesar en una balanza analítica con una sensibilidad de 0.0001g.
  - d) Poner el filtro Gooch en la estufa a 100° C durante una hora, enfriar en el desecador y pesar.
  - e) Repetir el paso d hasta obtener un peso constante.
- 3.- En el caso de muestras con pocas concentración celular es conveniente centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 15 min y resuspender la biomasa en un volumen conocido (menor al original)
- 4.- Conectar un matraz Kitasato con alargadera y el filtro Gooch al vacío, y adicionar entre 2 y 10 mL de muestra poco a poco, cuidando que la muestra pase sólo por el filtro Whatman.
- 5.- Se deja el filtro en una estufa a 100° C durante dos horas.
- 6.- Se saca de la estufa y se deja enfriar en un desecador a temperatura ambiente,
- 7.- Una vez que el filtro está a temperatura ambiente, se pesa.

## Determinación de sólidos suspendidos volátiles:

- 1.- Una vez que el filtro Gooch contiene los sólidos secos, se calcina a 550° C durante 15 minutos.
- 2.- Dejar enfriar en un desecador y pesarlo una vez que el filtro se encuentra a temperatura ambiente

## Cálculos:

$$S.S.T. = \frac{G4 - G3}{V} (1000) \quad (36)$$

$$S.S.V. = \frac{G4 - G5}{V} (1000) \quad (37)$$

donde:

- S.S.T. = Sólidos suspendidos totales, mg / L.  
 S.S.V. = Sólidos suspendidos volátiles, mg / L.  
 G3 = Masa del filtro, mg.  
 G4 = Masa del filtro incluyendo sólidos secos, mg.  
 G5 = Masa del filtro con los residuos después de la calcinación, mg.  
 V = Volumen de la muestra, mL.

## Validación del método

Para validar el procedimiento de manejo de muestra se realizaron determinaciones de sólidos utilizando diferentes procedimientos, en la tabla 4 se muestran el promedio y desviación estándar después de medir la misma muestra entre 4 y 6 veces.

Tabla 4. Resultados de las mediciones de SST y SSV utilizando diferentes procedimientos. Nótese que cada renglón se refiere a muestras distintas por lo que no son comparables entre sí.

Manejo de Muestra	SST ó SSV promedio (mg / L)	Desviación estándar (% de la media)
SST:		
después de 2 hrs de secado	492.0	8.6
después de 20 hrs de secado	470.0	6.6
SSV:		
después de 15 min de calcinación	702.6	21.1
después de 3 hrs de calcinación	635.0	20.6

Para cada una de las determinaciones se utilizaron diferentes muestras, por lo que los promedios obtenidos no son comparables entre sí. Debido a el error tan grande que se obtiene en las determinaciones, sobre todo para SSV, se decidió también utilizar densidad óptica para determinar la biomasa.

## Determinación de sólidos sedimentables:

- 1.- Tomar un litro de muestra del reactor.
- 2.- Colocar la muestra en un cono Imhoff.
- 3.- Dejar sedimentar durante 45 min.
- 4.- Con un agitador grande raspar las paredes.
- 5.- Dejar sedimentar durante 15 min adicionales.
- 6.- Tomar la lectura de sedimentación en mililitros sedimentados por litro de muestra.
- 7.- Regresar la muestra al reactor.

### 6.6.3. Densidad Óptica

Se midió densidad óptica de los lodos a una longitud de onda de 620 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman Instruments, Fullerton CA). Ya que en algunos experimentos la densidad óptica se utilizó como una medida de la concentración de biomasa en el reactor, se construyó una curva patrón para relacionar la densidad óptica con las concentraciones de SST y SSV. Esta curva se muestra en la figura 7.

### 6.6.4. Concentración de Glucosa

La concentración de glucosa fue determinada con un analizador enzimático YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). En algunos casos, el sustrato se consideró como la DQO representada por la concentración de glucosa, para lo cual se correlacionó con la DQO utilizando la curva patrón de la figura 8.

### 6.6.5. Conteo de Partículas

Para determinar al número de partículas y la distribución de tamaño de partículas se utilizó un contador electrónico Multisizer II (Coulter Electronics, Hiialeah, FL). Se utilizó un tubo de apertura de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y procesando 500  $\mu\text{L}$  de muestra. La calibración se llevó a cabo utilizando microsferas de látex de 9.86  $\mu\text{m}$  de diámetro. Solamente en un número limitado de experimentos se determinaron estos parámetros. Utilizando este equipo es posible determinar la concentración de partículas y el volumen promedio de las mismas, además se obtiene un análisis de la distribución del tamaño de éstas, cuantificando el número de partículas para 256 distintos intervalos de volumen de partículas.

## 6.7. ANALISIS NUMERICO DE RESULTADOS

La forma de calcular las constantes cinéticas que describen el sistema es resolviendo simultáneamente las ecuaciones (29) y (30) mediante el método numérico Runge Kutta, utilizando iteraciones para diferentes valores de las constantes cinéticas, y comparando el perfil con datos experimentales, para elegir el mejor ajuste. Con los datos de biomasa y sustrato que se miden durante el cultivo alimentado, se obtienen perfiles contra tiempo en estado transitorio, los cuales pueden ser ajustados a el modelo matemático correspondiente, utilizando un algoritmo de búsqueda secuencial numérica que se describe a continuación:

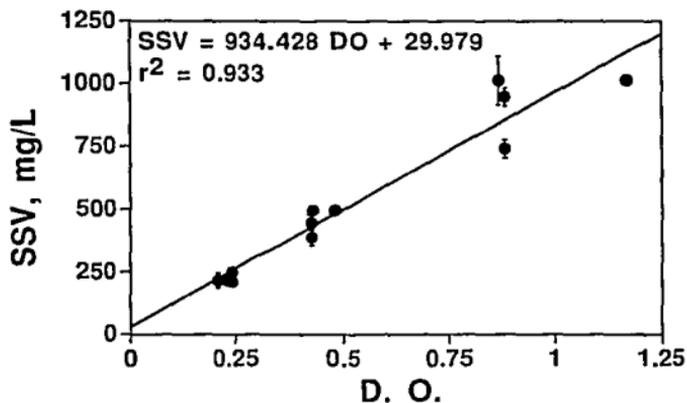


Figura 7. Curva patrón de SSV a partir de densidad óptica.

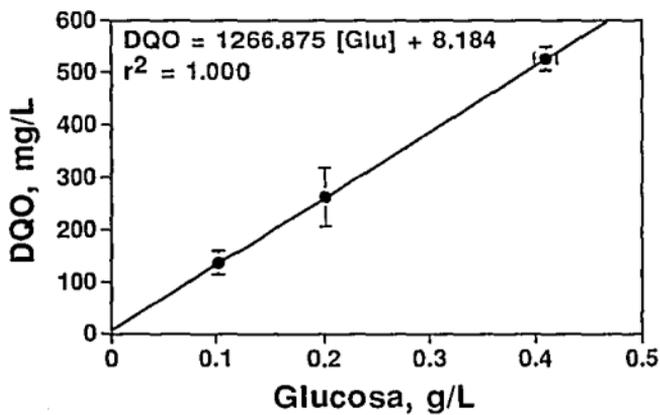


Figura 8. Curva patrón de DQO a partir de glucosa.

1. Suponer un intervalo de valores posibles para cada una de las constantes, arriba mencionadas, y dividir cada intervalo en "n" sub-intervalos.
2. Se toman los primeros valores de cada variable.
3. Resolver el sistema de dos ecuaciones diferenciales [ecuaciones (29) y (30)] simultáneamente utilizando los valores iniciales medidos para biomasa y sustrato, y las constantes supuestas en el paso anterior.
4. Calcular la raíz cuadrada de la sumatoria de los cuadrados de las diferencias entre los valores medidos y calculados (ECM), obteniendo las variables ECMs para el sustrato y ECMx para células.
5. Se toma la siguiente combinación de valores para cada variable y se repiten los pasos 3 y 4.
6. Al terminar de calcular todas las combinaciones en el intervalo definido en 1, se seleccionan los mínimos de ECM con respecto al sustrato [ECMs] y con respecto a la biomasa [ECMx], teniendo así un nuevo intervalo más estrecho para los cuatro valores, y se repiten los pasos 2,3,4,5... y así sucesivamente hasta tener un mínimo global.

El algoritmo anterior se escribió en Turbo Pascal para Macintosh (Borland), y en el apéndice 6 se presenta el listado del programa. El método se puede aplicar tomando como valores iniciales cualquier momento de la fermentación, solamente haciendo la corrección de tiempo, lo cual es muy ventajoso si tratamos de hacer comparaciones en las constantes antes y después de cambiar algún parámetro en una misma fermentación.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1. ARRANQUE Y ESTABILIZACION DEL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS

La operación de un sistema de tratamiento de aguas residuales requiere de una población microbiana aclimatada al agua residual que utilizarán como sustrato. Con el fin de acelerar el proceso de aclimatación, se utilizó un inóculo proveniente de una planta real. De visitas realizadas a refinerías y plantas petroquímicas de Pemex, Celanese, y la planta de tratamiento de efluentes de la zona industrial de Cuernavaca-ECCACIV, se tomaron muestras de lodos activados para ser usadas como inóculo del SLA. Estas muestras se hicieron crecer en matraces en cultivo por lotes, alimentando con ácido acético diluido. La selección del inóculo se basó en la caracterización de las distintas muestras de acuerdo a su actividad, determinada por la velocidad de consumo de oxígeno.

La figura 9 muestra la caracterización de las distintas muestras de lodos activados a diferentes tiempos, donde el número sobre la gráfica indica la edad de la muestra en días, mientras que la tabla 5 presenta los resultados de velocidad de consumo de oxígeno para las muestras de la gráfica. En figura 9A se presenta el comportamiento de la muestra tomada en la planta de tratamientos de la refinería de Pemex en Tula, Hidalgo, la cual presentó inicialmente una actividad muy baja. A medida que la población se aclimató al nuevo sustrato (ácido acético) la velocidad de consumo de oxígeno aumentó considerablemente. En la figura 9B se muestra la actividad respiratoria de las muestras provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales ECCACIV. Esta planta de tratamiento presenta problemas operacionales principalmente debido a las grandes fluctuaciones que se presentan en las condiciones del afluente, originadas por la gran diversidad de industrias a las que esta planta presta sus servicios. Finalmente, en la figura 9C se presenta el consumo de oxígeno de la planta de tratamiento para efluentes de refinerías de Celanese, en Minatitlán, Veracruz.

En los tres casos puede observarse que a medida que la muestra se adapta a las condiciones del medio, la velocidad de consumo de oxígeno aumenta. Este comportamiento se refleja en la tabla 5, al observar la velocidad de consumo de oxígeno de cada una de las muestras a diferentes tiempos. La muestra de lodos obtenida de ECCACIV mostró la mayor actividad en cuanto a la velocidad de consumo de oxígeno, sin embargo, no fué posible utilizarla debido a problemas importantes de formación de espuma cuando dichos lodos se inoculaban en el SLA. De tal forma se seleccionó a los lodos obtenidos de Celanese, los cuales aunque con velocidades de consumo de oxígeno menores a las de ECCACIV, mostraron una mejor estabilidad en el SLA.

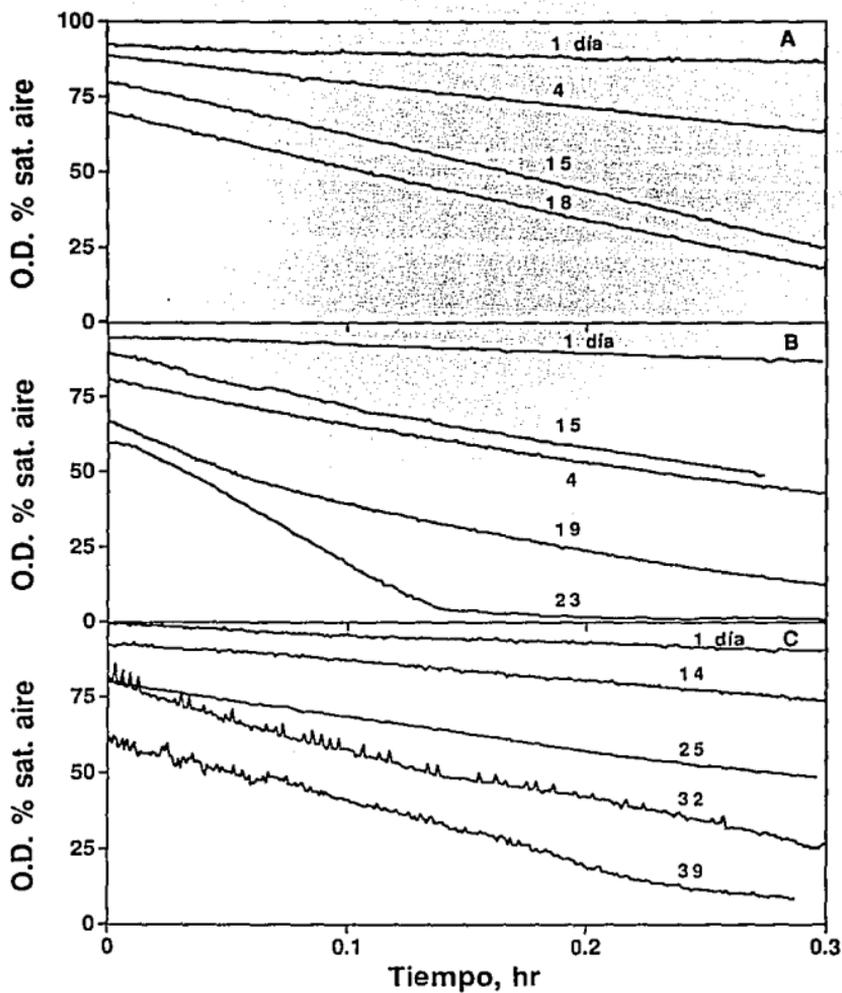


Figura 9. Consumo de oxígeno de tres distintos inóculos de lodos activados.  
A) Refinería de Pemex-Tula B) ECCACIV C) Celanese

Tabla 5. Velocidad de consumo de oxígeno de distintas muestras de lodos activados.

Procedencia	Tiempo (días)	VCO (mg O <sub>2</sub> /L-h)	r <sup>2</sup> (regresión lineal)
Pemex-Tula	1	1.216	0.955
	4	5.859	0.999
	15	11.882	0.999
	18	12.713	1.000
ECCACIV	1	1.913	0.992
	4	8.690	0.994
	15	10.566	0.989
	19	11.931	0.966
	23	29.421	0.998 *
Celanese	1	2.059	0.976
	14	4.423	0.996
	25	7.437	0.998
	32	12.039	0.981
	39	13.282	0.992

\* Sólo se tomaron en cuenta los primeros datos, antes de agotarse el oxígeno disuelto.

Una vez que se seleccionó el inóculo, éste se hizo crecer en cultivo por lotes en el reactor de 25 L, y posteriormente se inició la alimentación de agua de desecho modelo. El sistema de lodos activados se operó en su primera etapa durante el período del 6 de mayo al 24 de noviembre de 1992, teniendo una duración de 202 días (figura 10). La operación del SLA se suspendió debido a el derrame accidental de benzal, mientras se efectuaba la limpieza de las tuberías, teniendo como consecuencia la muerte de la población bacteriana.

La alimentación se realizó utilizando medio sintético no estéril hasta el 17 de noviembre de 1992, fecha en que se empezó a utilizar medio estéril para lograr condiciones más uniformes en el afluente del sistema. La figura 10A muestra una gráfica de los perfiles de DQO del medio de alimentación, en el reactor y en el efluente clarificado, como se puede observar al inicio de la operación del reactor no se obtuvo efluente hasta los 70 días de operación, aproximadamente 20 días después de iniciar la alimentación, que es el tiempo que tardó el sedimentador en llenarse y empezar a funcionar. La tendencia general de la VCO fué a aumentar a medida que la población se aclimataba (Figura 10B). En el caso de la  $q_{O_2}$ , el valor absoluto de la determinación puede verse afectado sensiblemente debido a errores en la determinación de biomasa (Figura 10B). La figura 10C presenta el resultado de las mediciones de SSV, como se puede notar, estas mediciones presentan grandes fluctuaciones, lo cual se atribuye al alto error experimental que presenta este método (hasta del 20%, ver sección de Materiales y Métodos), por lo cual se decidió utilizar la densidad óptica como método alternativo para cuantificar biomasa.

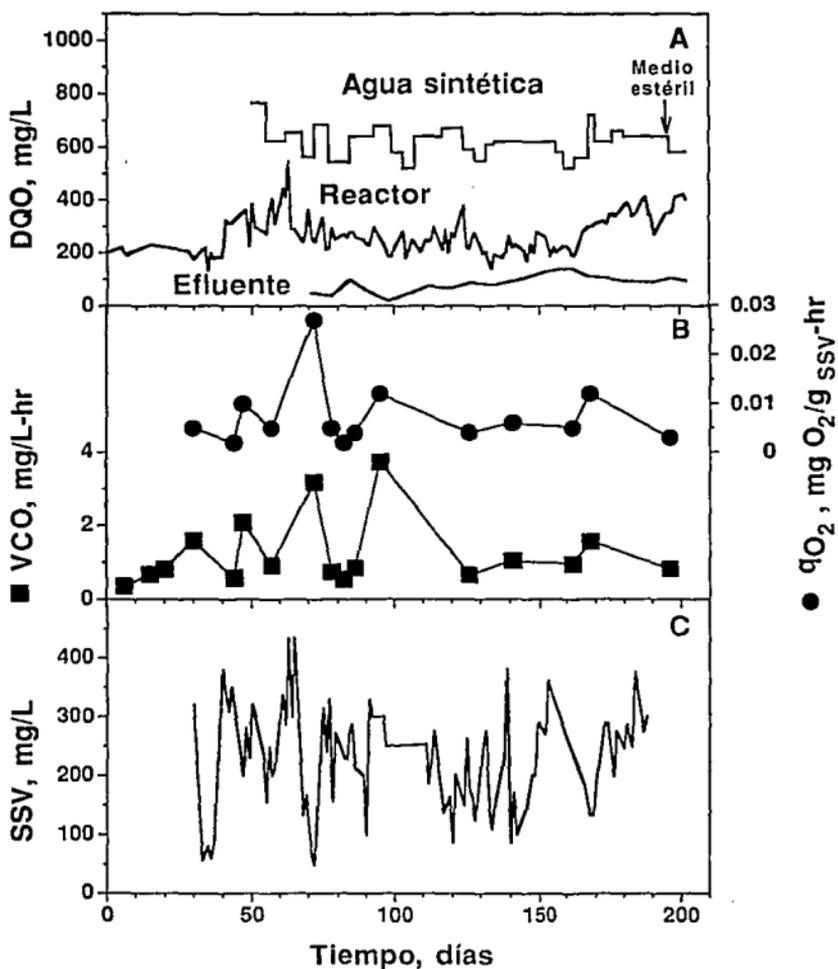


Figura 10. Comportamiento del sistema de lodos activados en su primera etapa.  
[Fecha de inicio (t=0) 6 Mayo 1992]

A través de los distintos resultados obtenidos se logró la caracterización del comportamiento del sistema de lodos activados, el cual se resume en la tabla 6. Tales resultados son los promedios e intervalos de las mediciones de DQO y SSV que se realizaron tanto para el reactor, agua residual sintética y efluente clarificado. Los volúmenes que se reportan para el medio de entrada y lodos de desecho fueron determinados por medición directa, mientras que el volumen de efluente se calculó como la diferencia entre los volúmenes de medio de entrada y lodos de desecho, sin tomar en cuenta pérdidas por evaporación.

Tabla 6. Resultados del sistema de lodos activados durante el primer período de operación.

Tiempo de operación	202 días
<b>Medio de Entrada:</b>	
Volumen total (medido)	349 litros
DQO (intervalo)	520 - 776 mg / litro
DQO (promedio)	636 mg / litro
SS	0 mL / litro
<b>Reactor:</b>	
Volumen	25 litros
DQO (intervalo)	135 - 544 mg / litro
DQO (promedio)	270 mg / litro
SS (intervalo)	1.5 - 40 ml / litro
SS (promedio)	15.2 mL / litro
<b>Efluente:</b>	
Volumen total (calculado)	337 litros
DQO (intervalo)	20 - 142 mg / litro
DQO (promedio)	51 mg / litro
SS	0 mL / litro
<b>Lodos de Desecho:</b>	
Volumen total (medido)	11.2 litros
DQO	nd
SS	545 mL / litro
<b>Eficiencia de Remoción de DQO</b>	
<b>Rendimiento</b>	92.05 % 30 litros SS / Kg DQO removido.

Después de la interrupción de la primera etapa de operación del sistema de lodos activados, se arrancó una segunda etapa, aprovechando como inóculo la gran cantidad de lodos que fueron producidos durante el verano, los cuales se almacenaron a 4° C en un cuarto frío. Previamente al arranque de esta segunda etapa, se realizaron mediciones de VCO para determinar la actividad de estos lodos antes de someterlos a cultivo, encontrándose que una vez que los lodos estuvieron a temperatura ambiente, su actividad metabólica (VCO) aumentó gradualmente.

El sistema de lodos activados fué operado exitosamente en su segunda etapa durante un tiempo de casi un año, como se muestra en la figura 11. Durante el arranque se observó un período transitorio de seis meses, en el cual la eficiencia de remoción de la DQO fué de alrededor

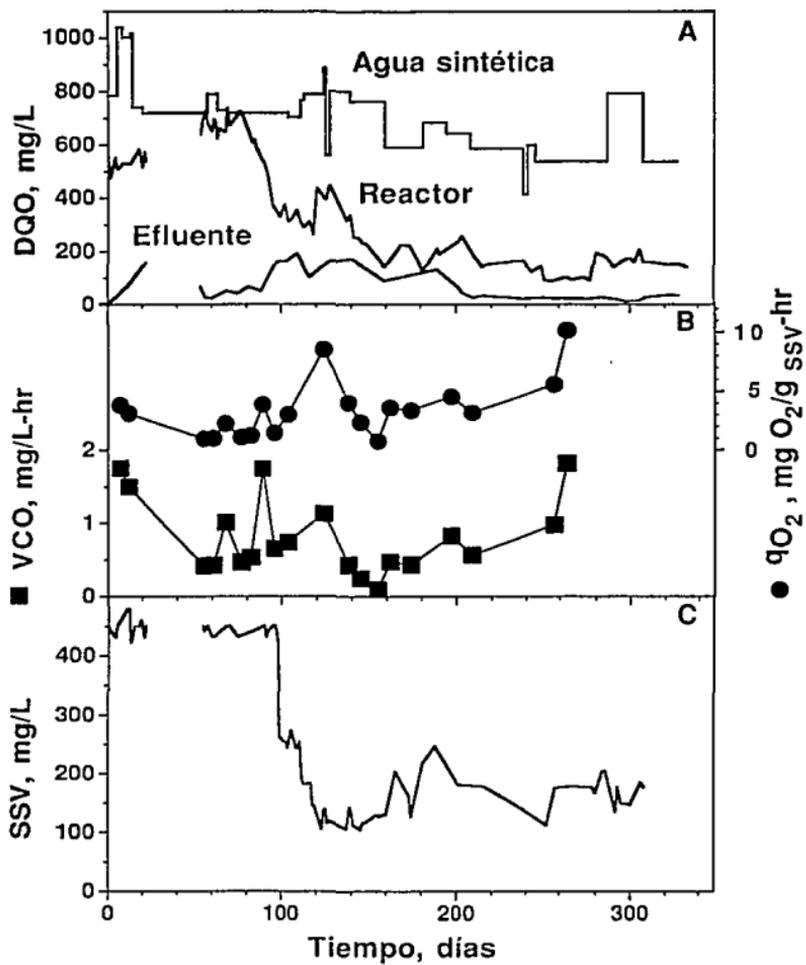


Figura 11. Comportamiento del sistema de lodos activados en su segunda etapa.  
[Fecha de inicio ( $t=0$ ) 27 Noviembre 1992]

de 80%. En la figura 11C se puede apreciar que la concentración de sólidos, inicialmente muy alta, descendió rápidamente alrededor de los 90 días, que corresponde a la fecha en que se estableció un control más estricto de la relación F/M. En este período, ocurrió una disminución importante en los sólidos suspendidos volátiles y la DQO del reactor, esta respuesta dinámica tan lenta del sistema de lodos activados enfatiza la importancia de diseñar herramientas experimentales alternativas para la caracterización de sistemas biológicos de tratamiento de aguas. Nótese en la figura 11A y 11C que el SLA se operó continuamente, sin embargo, no se analizaron muestras durante el período de los días 22 al 54, correspondiente a vacaciones administrativas de Diciembre de 1992 de la UNAM.

La tabla 7 presenta un resumen del desempeño del sistema durante el segundo período de operación completo, en ésta puede observarse que los parámetros globales, como el rendimiento y eficiencia de remoción de la DQO son similares a los reportados para plantas reales de tratamiento secundario convencional para aguas municipales (Bowen et al., 1992) y para un proceso de lodos activados provisto de la adición de una población microbiana para ayudar a la degradación (bioaumentación) con bacterias degradadoras de aceites en una refinería (Wong y Goldsmith, 1986), lo cual demuestra la similitud del sistema de laboratorio con sistemas reales.

Tabla 7. Resultados del sistema de lodos activados durante el segundo período de operación.

<b>Tiempo de operación:</b>	320 días
<b><u>Medio de Entrada:</u></b>	
Volumen total (medido)	633 litros
DQO (intervalo)	536 - 1038 mg / litro
DQO (promedio)	678 mg / litro
SS	0 mL / litro
<b><u>Reactor:</u></b>	
Volumen	25 litros
DQO (intervalo)	88 - 737 mg / litro
DQO (promedio)	336 mg / litro
SS (intervalo)	15 - 45 mL / litro
SS (promedio)	23 mL / litro
<b><u>Efluente:</u></b>	
Volumen total (calculado)	618 litros
DQO (intervalo)	11 - 191 mg / litro
DQO (promedio)	73 mg / litro
SS	0 mL / litro
<b><u>Lodos de Desecho:</u></b>	
Volumen total (medido)	15 litros
DQO	nd
SS	98 mL / litro
<b><u>Eficiencia de Remoción de DQO</u></b>	
<b><u>Rendimiento</u></b>	89.4 % 39 litros SS / Kg DQO removido.

Después de seis meses de operación se alcanzó un claro estado estacionario, con una eficiencia de remoción mayor al 95 %. La velocidad de consumo de oxígeno fluctuó entre 0.5 y 2 mg/L-h durante todo el período de operación del sistema. El aumento en la actividad del lodo en el segundo semestre de operación también puede observarse como un incremento en la velocidad específica de consumo de oxígeno, la cual alcanzó un valor máximo de 10 mg O<sub>2</sub> /g SSV-hr (Figura 11B). Estos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud que los reportados para un cultivo de lodos activados alimentados con aguas residuales de origen industrial, para los cuales se obtuvo un máximo de 30 mg O<sub>2</sub> /g SSV-hr (Shamas y Englande, 1992). Se observó que la población microbiana con una alta actividad metabólica, indicada por las altas velocidades de consumo de oxígeno, tolera adecuadamente variaciones en la carga orgánica, tales como el pico en la DQO del medio de entrada que se observa a los 290 días en la Figura 11A.

En los dos períodos de operación del SLA, la DQO del medio de alimentación presentó grandes fluctuaciones, siendo en casos extremos una diferencia hasta de 500 mg/L. Tales variaciones pueden ser atribuidas al método de determinación de DQO utilizado.

Como puede observarse, el comportamiento del SLA simula adecuadamente el comportamiento de sistemas reales de escala industrial. Por ejemplo, la eficiencia de remoción de DQO es similar a la de la planta de tratamiento de donde proviene la población de lodos, Celanese en Veracruz la cual fluctúa entre 89 y 98 % (Celanese, 1991). Estos valores son superiores a plantas como ECCACIV en Morelos, la cual tiene una eficiencia entre el 62 y 68 % (ECCACIV, 1992). Asimismo, el rendimiento de lodos desechados por DQO removido es muy similar al encontrado en plantas de tratamiento de aguas tanto industrial como municipal.

Los resultados de eficiencia de remoción de DQO y rendimiento de las tablas 6 y 7 fueron calculados utilizando todos los datos obtenidos a lo largo del proceso, por ejemplo, para calcular la eficiencia de remoción de DQO se hizo la sumatoria de la cantidad de DQO que entró al sistema y la que salió del sistema, de igual forma el rendimiento, se calculó utilizando la cantidad de sólidos sedimentables que se desecharon del sistema. Sin embargo, tanto la eficiencia como el rendimiento tuvieron fluctuaciones a lo largo del proceso, hasta que se alcanzó el estado estacionario. La población de lodos en el sistema presentó excelentes características de sedimentación, indicadas por la ausencia de sólidos sedimentables en el efluente, aunada a las bajas concentraciones de DQO en el efluente.

Estos resultados demuestran que el SLA presenta el mismo comportamiento que un sistema real, en lo que se refiere a su desempeño, operación y control. Una vez que se demostró que se

cuenta con una fuente de inóculo con características adecuadas y condiciones poco variables, se procedió a utilizar muestras como inóculo para cultivos por lotes y exponencialmente alimentados. Las muestras tenían un volumen de hasta 400 ml, es decir 1.6 % del volumen del reactor. Por lo tanto la toma de tales fracciones tienen un efecto adverso mínimo en la estabilidad del reactor. A continuación se presentan los resultados de cultivos por lotes y exponencialmente alimentados los cuales se inocularon de la forma descrita anteriormente.

### 7.2. SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS

#### 7.2.1 Control de biorreactores

Una de las actividades principales durante este trabajo fué el desarrollo de un sistema computarizado de control y adquisición de datos. Los resultados en detalle sobre el uso de dicho sistema para el cultivo de lodos activados en biorreactores tanto en cultivo por lote como en cultivo exponencialmente alimentado se presentan en las secciones 7.3 y 7.4 y su uso para la determinación de VCO y en el sistema de análisis de flujo inyectado para la determinación de DBO se presenta en las secciones 7.2.2 y 7.2.3, respectivamente. Asimismo, el sistema ha sido probado por otros investigadores y estudiantes de varios grupos de investigación dentro del Instituto de Biotecnología, en distintos modelos biológicos que van desde bacterias recombinantes y levaduras, hasta hibridomas y poblaciones mixtas, cultivados en lotes o fermentaciones alimentadas. Un resumen del uso del sistema de control y adquisición de datos en tales modelos se presenta en el apéndice 9.1. Dado que uno de los objetivos específicos de este trabajo fué el desarrollo de un sistema versátil, amigable y poderoso, a continuación se resumen algunos de los usos, por otros investigadores, y sus resultados con distintos modelos y sistemas. Se discuten, además, las ventajas logradas con el sistema desarrollado, y se ofrecen las citas correspondientes para el interesado en mayores detalles.

#### 7.2.2. Análisis de flujo inyectado: Demanda Bioquímica de Oxígeno

Las modificaciones realizadas al sistema de adquisición de datos y control permitieron la toma de muestras, adquisición de datos del biosensor (descrito en Materiales y Métodos), estimación de la DBO, presentación de gráficas, accionamiento de alarmas y ejecución de acciones correctivas en el caso de que los valores de la DBO se encuentren fuera de los límites preestablecidos en el algoritmo de control. En la figura 12 se muestra la respuesta del biosensor

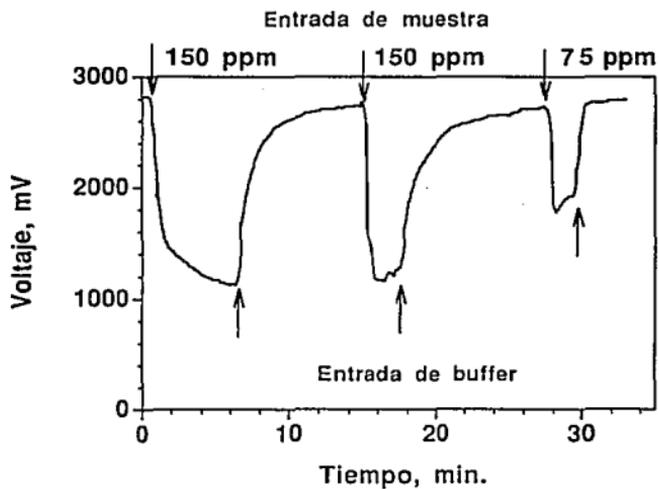


Figura 12. Respuesta del biosensor de DBO ante diferentes concentraciones de materia orgánica (Significado de las flechas descrito en el texto).

para DBO obtenida al analizar una muestra estándar compuesta de glucosa y ácido glutámico en partes iguales a concentraciones de 150 y 75 ppm (tomado de García et al, 1993). En el análisis de esta muestra, el sistema detecta que la señal del biosensor con la cámara de dilución llena de buffer sea estable mediante el cálculo de la pendiente y coeficiente de correlación de los últimos 10 datos (ver figura 6). Una vez que la computadora determina que la corriente basal es estable, enciende la bomba de inyección y abre la válvula solenoide de entrada de muestra, evento indicado por la primera flecha. Después de llenar la cámara de medición con muestra, la computadora continúa adquiriendo datos hasta lograr nuevamente la estabilidad, en ese momento calcula la diferencia de voltajes y lo convierte a unidades de ppm o DBO utilizando una curva patrón previamente construida. Cuando termina la determinación, la computadora vacía la cámara de medición y la vuelve a llenar con buffer, indicado por la segunda flecha, quedando de esta forma preparado el sistema para realizar mediciones adicionales.

Para la automatización del electrodo de DBO (Zambrano, 1994), los valores límite de la DBO fueron establecidos para el sistema de lodos activados, en donde la acción de control se limitó a alertar al operador mediante una alarma. Sin embargo, el sistema permite mediante modificaciones sencillas, acciones de control. Por ejemplo, algunas posibles acciones podrían ser la apertura de válvulas de contenedores con microorganismos degradadores de materia orgánica que pueden ser agregados al sistema, o bien el aumento de agitación al sistema y/o el cambio de los tiempos de residencia hidráulicos y microbianos mediante cambios en los flujos de entrada y de recirculación. Estas acciones de control podrían en principio mejorar substancialmente la eficiencia de un sistema de tratamiento de aguas de desecho por lodos activados durante la operación normal. Al mismo tiempo, este sistema puede ser usado para tomar acciones de emergencia como respuesta a posibles eventualidades en industrias que originen descargas que dañen irreversiblemente la población microbiana del sistema de tratamiento de agua.

Existen pocos reportes en donde se ha demostrado exitosamente el uso de acciones correctivas, como la bioaumentación en sistemas de tratamiento de aguas (Wong y Goldswith, 1988; Hung et al, 1987; Reed, 1987). No obstante, tales acciones se han llevado a cabo en forma manual y a través de la supervisión periódica de operadores. En contraste, el sistema desarrollado permite, en principio, el monitoreo automático y continuo, así como la toma de decisiones y acciones correctivas sin la presencia de un operador.

A pesar de que muchos de los sistemas de tratamiento de aguas son procesos maduros y establecidos en todo el mundo, existe un retraso importante en cuanto a las metodologías de control y operación con respecto a otros procesos biotecnológicos. Esto se debe en parte a la complejidad

del sistema así como a la falta de sensores adecuados para monitorear variables relevantes y de sistemas para controlarlos automáticamente. Los resultados del trabajo efectuado representan un esfuerzo tendiente a solucionar algunos de los retrasos que existen en los sistemas de monitoreo y control en tratamiento de aguas.

### 7.2.3. Análisis de flujo inyectado: velocidad de consumo de oxígeno

Utilizando el sistema de análisis de flujo inyectado, descrito en la sección de materiales y métodos, se llevó a cabo un experimento para determinar el efecto de sobrecargas de sustrato en la velocidad de consumo de oxígeno en cultivo por lotes. En este experimento se realizó un cultivo por lotes con un volumen de 500 ml. Tomando muestras cada hora, se midió la densidad óptica, concentración de glucosa y velocidad de consumo de oxígeno. Antes de que la glucosa se consumiera totalmente, se agregó un pulso de 500 ml de medio de cultivo a una concentración del doble de los componentes normales del medio (equivalente a 1 g/L de glucosa). Los resultados de este experimento se muestran en la figura 13. En la figura 13A, la gráfica correspondiente a SSV muestra que después de entrar a la fase exponencial, la concentración de biomasa disminuye de 186 a 175 mg/L, aproximadamente a las 5 horas de haber iniciado el cultivo, sin haberse terminado la glucosa. En la figura 13B este fenómeno se hace más evidente, ya que tanto la VCO como la  $q_{O_2}$  disminuyen gradualmente hasta llegar a un mínimo, aproximadamente a las 6 horas, en este momento se puede suponer que los microorganismos adaptados a las condiciones del reactor de 25 L, cuya velocidad específica de crecimiento disminuye con las nuevas condiciones, empiezan a ser desplazados por la población que está aclimatada a las nuevas (y cambiantes) condiciones del cultivo por lotes, por lo que a partir de este momento la velocidad específica de crecimiento aumenta.

Después de adicionar el pulso de medio de cultivo, indicado por la línea punteada, la biomasa nuevamente se incrementa, mientras que el perfil de velocidad de consumo de oxígeno siguió a el perfil de biomasa. La velocidad específica de consumo de oxígeno, por el contrario, después de incrementarse inmediatamente después del pulso de sustrato, disminuyó ligeramente, indicando nuevamente un período de adaptación. Los cambios en la pendiente de la VCO contra el tiempo en cultivo por lotes como el mínimo de la figura 13B han sido reportados anteriormente (Shamas y Engle, 1992), aunque su significado metabólico no se discute a fondo, mientras que en otros casos la forma de la determinación de la VCO no permite la observación de estos cambios transitorios (Suschka y Ferreira, 1986).

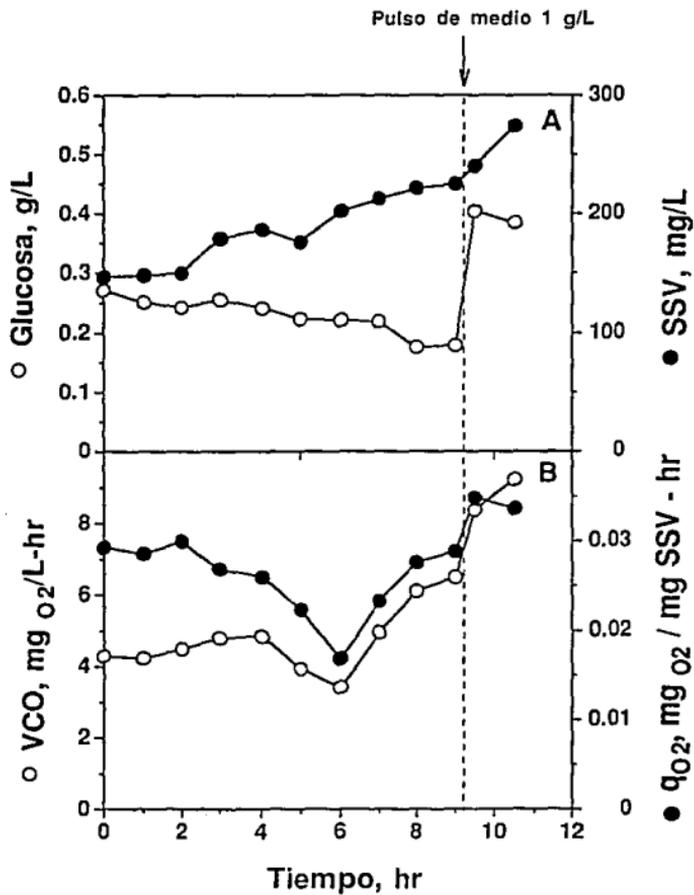


Figura 13. Efecto de un cambio en la carga orgánica en cultivo por lotes.

La labor de desarrollar un sistema de tratamiento de aguas a escala laboratorio no solo se hace mas sencilla al contar con este tipo de herramientas, sino que también permite plantear estrategias de control integradas desde el proceso de diseño de una planta.

### 7.3. CULTIVOS POR LOTES

El cultivo por lotes de lodos activados es de gran utilidad para la identificación de los diferentes estadios del cultivo, tales como las fases lag, exponencial, estacionaria y de consumo endógeno. Además, si no existe limitación por nutrientes o inhibición por sustrato, la velocidad específica de crecimiento es igual a la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu = \mu_m$ ), que es uno de los parámetros de diseño para sistemas de lodos activados. Con estos propósitos se llevaron a cabo varios experimentos de cultivo por lotes.

La figura 14 muestra una cinética típica de crecimiento celular y consumo de sustrato en cultivo por lotes. A partir de parámetros tales como SSV, DQO y concentración de glucosa, se pueden observar claramente dos fases de crecimiento: una fase inicial de crecimiento exponencial durante las primeras 6 horas, y una fase endógena que se presentó aproximadamente después de 8 horas de operación. Durante la fase de crecimiento exponencial, la concentración de partículas aumentó de 0.26 a  $0.37 \times 10^6$  partículas/mL; el volumen promedio de partículas aumentó de 16 a  $38 \mu\text{m}^3$  y los SSV aumentaron de 150 a 500 mg/L, mientras que la glucosa fue consumida totalmente.

La velocidad de crecimiento alcanzada en el cultivo por lotes fue de  $0.2 \text{ h}^{-1}$ , la cual corresponde a la velocidad máxima de crecimiento. En la gráfica se puede observar que a las 6 horas de cultivo, después de agotarse la glucosa, la DQO no llega a 0, debido a que el medio de cultivo contiene, además de la glucosa, otros componentes químicamente degradables y la biomasa. Durante la fase endógena, los SSV disminuyeron y la DQO residual fue lentamente degradada. Sin embargo, puede notarse que la fase endógena puede subdividirse en dos fases adicionales si se analizan parámetros tal como el volumen promedio de partículas (figura 14C). De esta forma, una fase endógena inicial puede distinguirse entre las 8 y 15 horas del cultivo, donde la concentración de partículas se mantiene constante, pero el volumen promedio disminuye de 38 a  $27 \mu\text{m}^3$ . Este comportamiento puede ser indicativo de una población microbiana invariante que metaboliza sus reservas internas, es decir una verdadera fase endógena. Después de 15 horas, la concentración de partículas aumenta rápidamente mientras disminuye el volumen de partícula. Esta segunda fase endógena puede indicar una severa limitación por sustrato, teniendo como consecuencia la ruptura celular y acumulación de restos celulares.

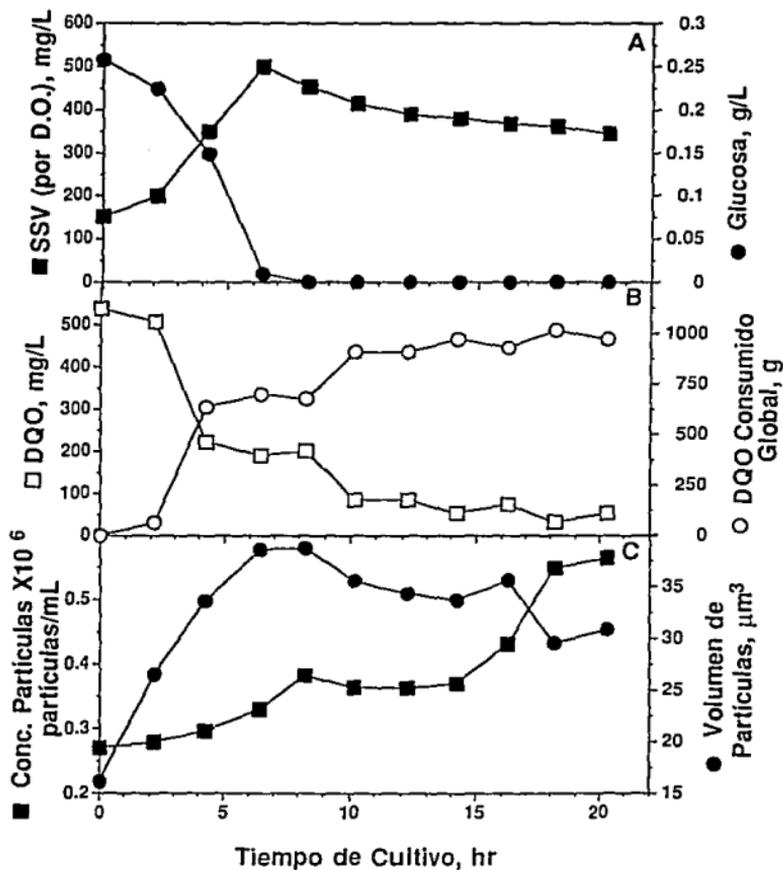


Figura 14. Cinética de crecimiento celular en cultivo por lotes.

El análisis de partículas demostró que la composición de la población de lodos (respecto a volúmenes de células) varía constantemente a través del tiempo en un cultivo por lotes. Como se muestra en la figura 15, al principio de la fermentación la mayoría de las partículas tiene un volumen pequeño, mostrándose en la distribución un pico estrecho, posiblemente compuesto de células pequeñas y con pocas reservas de material intracelular. A medida que se consume el sustrato fácilmente degradable (glucosa), el número de partículas de volumen mayor se incrementa rápidamente, hasta que se agota la glucosa, alrededor de las 8 horas de cultivo, como puede apreciarse en las gráficas de número y volumen promedio de partículas (figura 14C), en este momento se tiene una distribución muy amplia de partículas, indicando que existen diversos tamaños en proporciones "balanceadas" (aclimatadas a estas condiciones de cultivo). A partir de este momento, el consumo endógeno se hace más evidente, esto puede ser notado como un aumento en el número de partículas de volumen pequeño en la figura 15 y la disminución en el volumen promedio de partículas (Figura 14C), mientras que el número de partículas de volumen grande vuelve a disminuir volviendo a las formas de distribución de partículas que el cultivo presentaba inicialmente. El hecho de que la distribución de partículas después del consumo endógeno regrese a su estado original es indicativo de que al momento de inocular la población de lodos, ésta no se encontraba en fase de crecimiento exponencial.

Estos resultados demuestran que parámetros descriptivos de la población, tales como las mediciones celulares generan información adicional, que no es detectable a través de los parámetros globales usualmente determinados, tales como SSV, SST y densidad óptica. Mediante la gráfica de número de partículas de diferentes volúmenes a través del tiempo (como en la figura 15) se pueden detectar cambios que no son apreciables aún conociendo la cuenta total de partículas y el volumen promedio (figura 14C).

Conjuntamente a los cultivos por lotes, se llevaron a cabo cultivos exponencialmente alimentados, con el fin de hacer una caracterización en forma exhaustiva del comportamiento de los lodos activados ante diversas condiciones de crecimiento.

#### **7.4. CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS**

En base al hecho de que un cultivo exponencialmente alimentado de volumen variable simula en forma adecuada el comportamiento transitorio y en estado estacionario de un quimiostato (ver sección 5.3.), se procedió a realizar experimentos con esta modalidad, primeramente a diferentes velocidades de dilución, con el fin de observar los perfiles que se siguen hasta alcanzar el estado estacionario. Posteriormente se realizaron cultivos a los cuales se forzaron perturbaciones

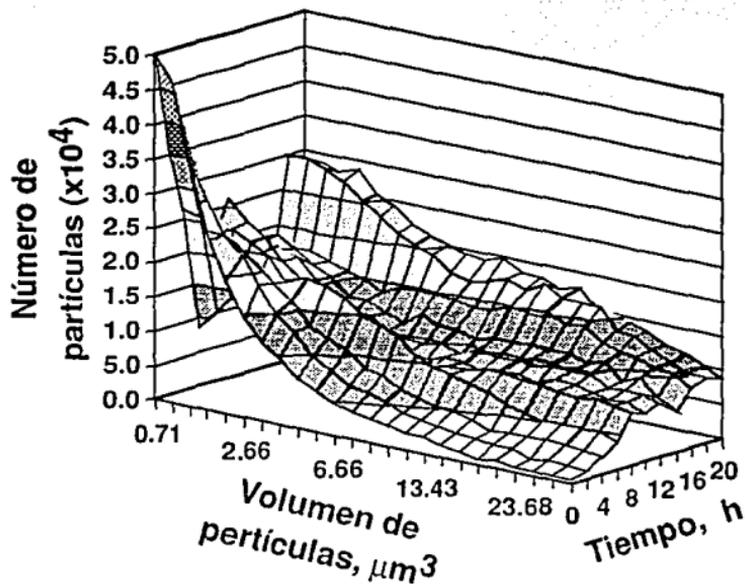


Figura 15. Distribución de partículas a través del tiempo en cultivo por lotes.

en el sistema cuando éste había alcanzado el estado estacionario. Tal esquema experimental permite contar con los datos iniciales (antes de la perturbación) como un testigo interno, y usar la segunda parte del cultivo para determinar el efecto de la perturbación realizada. De tal forma, se evitan errores experimentales causados por las variaciones que se presentan en el sistema de todos activados del cual se toman las muestras para inocular el cultivo exponencialmente alimentado.

#### 7.4.1. Operación

Los cultivos exponencialmente alimentados se llevaron a cabo en la forma descrita en la sección 5.3 de Materiales y Métodos. La figura 16 muestra el comportamiento típico de un cultivo exponencialmente alimentado a una dilución de  $0.05 \text{ h}^{-1}$ , en el cual la línea punteada indica el inicio de la alimentación, como puede notarse del perfil de volumen (figura 16C). En la gráfica correspondiente a SSV (figura 16A) se puede observar el comportamiento de un cultivo por lotes, en el que la biomasa crece hasta alcanzar un máximo. Después de ese momento el consumo endógeno empieza a hacerse evidente. Una vez que se inicia la alimentación se puede observar que tanto la concentración de biomasa como de sustrato (DQO) presentan muy poca variación, indicativo de un estado estacionario.

En la figura 16B se puede apreciar que el oxígeno disuelto es controlado (mediante la manipulación automática de los gases de entrada) después de un período oscilatorio menor de 2 horas. El potencial redox inicialmente sigue el mismo perfil que oxígeno disuelto, pero al cambiar gradualmente las condiciones ambientales del reactor por el crecimiento celular, su comportamiento es muy diferente. Es interesante notar que a pesar de que el oxígeno disuelto se mantiene constante, el potencial redox decrece monotónicamente después de las 4.5 horas y hasta las 15 horas de cultivo, para después mantenerse constante. Tal disminución del potencial redox ha sido reportada anteriormente para diversos modelos biológicos como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Klebsiella aerogenes* y *Candida utilis*, entre otros (Oktyabrsky et al., 1989; Kjaergaard, 1977; Kwong et al., 1992), y ha sido usado como un indicativo de la actividad celular. Los cambios en las condiciones del reactor también están indicados por el perfil de pH, el cual después de disminuir drásticamente, a las 4.5 horas vuelve a aumentar lentamente aproximadamente cuando el potencial redox ya no desciende. A las 4.5 horas las células han dejado de crecer, tal y como lo indica la gráfica 16D en la que el flujo de oxígeno deja de aumentar exponencialmente, y disminuye repentinamente debido a que el consumo de oxígeno de las células se detiene al entrar en la fase de consumo endógeno. Adicionalmente, en este momento el potencial redox aumenta escalonadamente, indicando un cambio drástico en el estado fisiológico de las células y/o el ambiente químico del reactor.

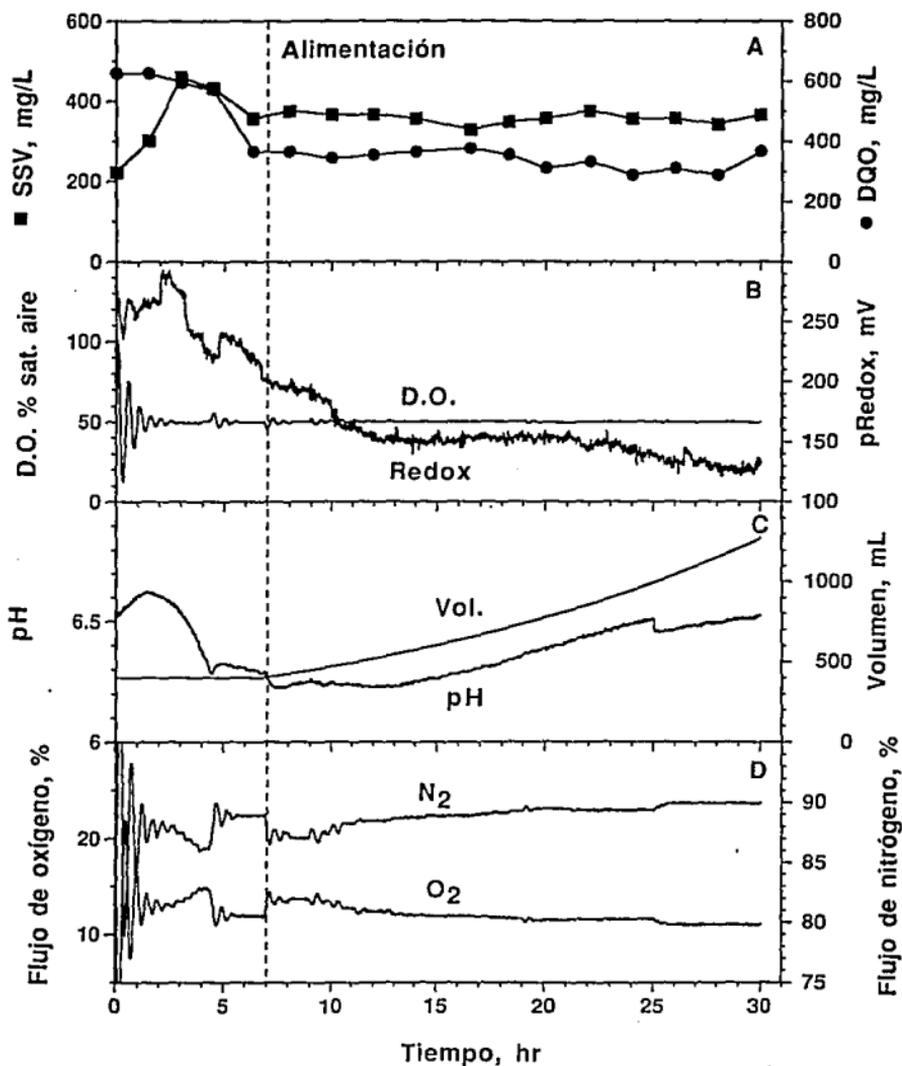


Figura 16. Cultivo exponencialmente alimentado a una velocidad de dilución de  $0.05 \text{ h}^{-1}$

En el instante en que se inicia la alimentación, ocurren una serie de eventos que son fácilmente detectables mediante los parámetros adquiridos en línea. Primeramente la concentración de oxígeno disuelto sufre una perturbación, ya que al introducirse una cantidad de sustrato fácilmente degradable en el reactor, la velocidad de consumo de oxígeno se reestablece. Este fenómeno se corrobora con el aumento en el flujo de oxígeno enviado por el sistema de control de oxígeno disuelto. Otro cambio detectable es la disminución del potencial redox ya descrita. Este comportamiento del potencial redox podría representar un parámetro auxiliar para el control del crecimiento microbiano, tal y como se ha reportado anteriormente, y en el caso de sistemas de lodos activados ya se ha generado una patente (Fujii-Masahiro et al, 1987). Sin embargo, el potencial redox depende de otros factores, tales como la concentración de oxígeno disuelto, presencia de especies químicas, y pH por lo que esquemas de control basados en tal variable necesariamente tendrán que ser más elaborados.

En forma adicional al experimento anterior, se llevaron a cabo cultivos exponencialmente alimentados a diferentes velocidades de dilución con el fin de observar el perfil de crecimiento y el estado estacionario que se alcanza y hacer comparaciones con el comportamiento teórico de cultivos continuos, que representan la modalidad de cultivo más utilizada para estudios cinéticos y pruebas de tratabilidad. En estos experimentos se utilizaron diferentes condiciones iniciales para comprobar la reproducibilidad del método.

En la figura 17 se muestra un cultivo exponencialmente alimentado a una velocidad de dilución de  $0.15 \text{ h}^{-1}$ , en el cual no se llevó a cabo la etapa por lotes. Como puede observarse en la figura 17C, el requerimiento de oxígeno aumentó respecto al tiempo, debido tanto al aumento de la concentración de biomasa (SSV en la figura 17A), como a la disminución de la velocidad de transferencia de oxígeno provocada por el aumento exponencial en el volumen del reactor. En esta figura se puede observar que la DQO (estimada a partir de datos de glucosa) disminuye gradualmente hasta llegar a niveles cercanos a 0. Esto indica un comportamiento transitorio más lento hacia el estado estacionario, lo cual es indicativo de que la utilización de una etapa por lotes al inicio del experimento ayuda a que el sistema alcance rápidamente el estado estacionario (ver discusión en la sección 7.5.). En este experimento se observa que el comportamiento del potencial redox del cultivo inicialmente sigue el perfil de la concentración de oxígeno disuelto, pero a las 2.1 horas de iniciar el cultivo, el potencial redox presenta un descenso súbito que no coincide con ningún cambio tanto en parámetros físicos como biológicos, por lo que se considera una falla operacional, probablemente debido a un falso contacto en el amplificador de potencial redox. Después de que el potencial redox se restablece, este disminuye gradualmente, indicando actividad metabólica al igual que los otros experimentos.

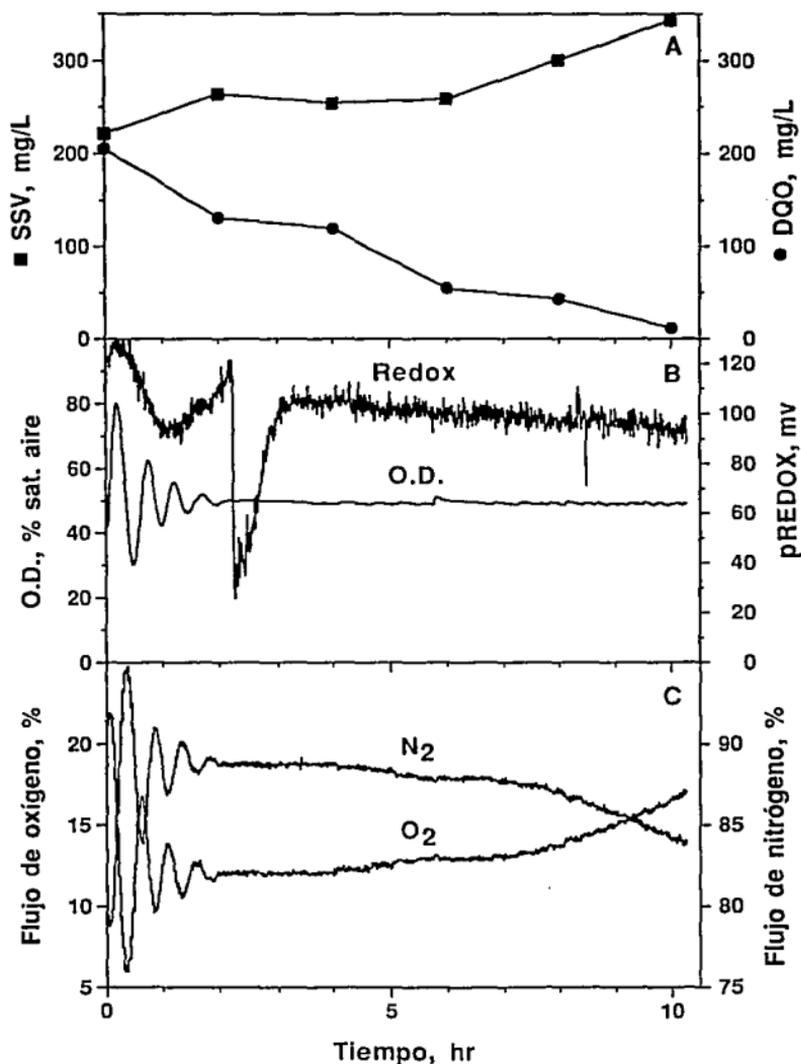


Figura 17. Cultivo exponencialmente alimentado a una dilución de  $0.15 \text{ h}^{-1}$

La figura 18 muestra resultados de un cultivo exponencialmente alimentado operando a una velocidad de dilución de  $0.01 \text{ hr}^{-1}$ , con la concentración de oxígeno disuelto controlada a 40 % con respecto a saturación con aire. Durante la etapa por lotes, tanto la glucosa como la DQO no celular fueron consumidas totalmente, la concentración de SSV y el número de partículas se incrementaron exponencialmente, y el volumen promedio de partículas disminuyó después de un pequeño incremento durante las primeras dos horas de cultivo. Como se puede apreciar en la figura 18E, también ocurrió un incremento exponencial en la velocidad de consumo de oxígeno, esto se infiere a partir del aumento en la concentración de oxígeno en el gas de entrada, la cual fué ajustada por el sistema de control para mantener constante la concentración de oxígeno disuelto. Durante el transcurso de este experimento se agotó el suministro de nitrógeno, en el momento indicado por un asterisco (\*) en la figura 18E. En este lapso de tiempo el sistema de control de oxígeno disuelto no funcionó en forma adecuada, como puede observarse en la figura 18D. Aún después de restablecer la entrada de gases a las 39 horas, el sistema presentó oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto producidas por el cambio repentino en la composición del gas de entrada. Alrededor de las 41 horas se logró nuevamente controlar el oxígeno disuelto.

Al agotarse la glucosa, aproximadamente 11 horas después del inicio del experimento, se inició la alimentación exponencial de medio de cultivo. El agotamiento de sustrato también puede ser inferido mediante la observación del comportamiento de la concentración de oxígeno disuelto, el cual sufre una perturbación al disminuir drásticamente la velocidad de consumo de oxígeno. Después de un corto período transitorio al iniciar la alimentación, la biomasa en el cultivo alcanza el estado estacionario. En contraste, la concentración de glucosa alcanza la condición de estado estacionario, a un nivel muy bajo, inmediatamente después de iniciar la fase alimentada. La concentración de partículas y el volumen promedio de partículas mostraron una dinámica más lenta hacia el estado estacionario; mientras que el número de partículas se incrementó lentamente 10 horas después de iniciar la etapa alimentada, el volumen promedio disminuyó lentamente. Este comportamiento refleja un cambio gradual en la distribución de las especies que forman la comunidad microbiana, posiblemente como un fenómeno de adaptación a las nuevas condiciones del reactor. Este tipo de cambios ha sido observado por Schmidt et al. (1992), quienes reportan un tamaño del flóculo bacteriano más pequeño en reactores por lotes secuenciales cuando la población esta en condiciones de limitación por glucosa que cuando es suplementada con glucosa. La velocidad de consumo de sustrato también alcanzó un estado estacionario de  $5.24 \text{ mg}_{\text{DQO}}/\text{L}\cdot\text{h}$ , esto se muestra en la figura 18B, en la cual la pendiente de la gráfica del total de DQO consumida se mantiene constante.

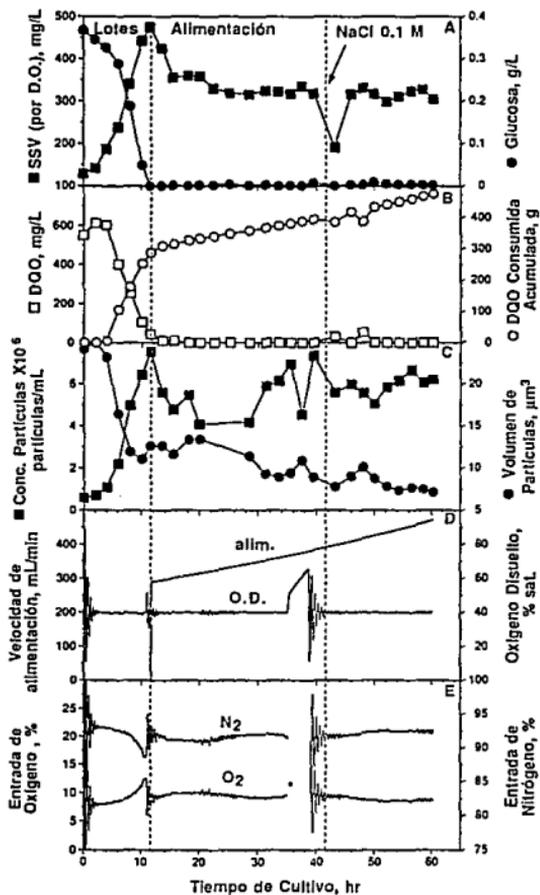


Figura 18. Resultados típicos de cultivo exponencialmente alimentado,  $D=0.01 \text{ h}^{-1}$ .

Haciendo una comparación entre las figuras 14C y 18C, podemos notar que los perfiles de volumen de partículas son diferentes. Mientras que en el cultivo por lotes de la figura 14C el volumen presenta una tendencia a aumentar a medida que las células crecen, en la etapa por lotes de la figura 18C se observa que el volumen disminuye al crecer las células. Estos resultados indican que el comportamiento de un cultivo de lodos activados dependerá en gran medida de las condiciones del inóculo, las cuales cambian día con día, dependiendo de factores tales como la concentración y tipo de sustrato que se utilice, fluctuaciones en la temperatura, oxígeno disuelto y pH. Esta observación remarca la precaución que debe tenerse al realizar experimentos en distintas fechas donde las condiciones del inóculo pueden variar. Alternativamente, la utilización de un testigo interno, como en el caso del protocolo experimental seguido aquí y descrito en la sección 7.4.2., elimina esta fuente de variación.

Los resultados completos del análisis de partículas de un cultivo exponencialmente alimentado típico se muestran en la figura 19, en esta figura se observa que durante la etapa por lotes en la población microbiana se llevan a cabo cambios repentinos, tanto en el número de partículas como el volumen. Al iniciar la alimentación exponencial, estos cambios dejan de ser tan notorios, mostrándose un crecimiento similar entre las células de distintos volúmenes. Después de provocar una perturbación en el sistema (en este caso un cambio escalonado en la concentración de NaCl a las 42 horas e indicado por la segunda flecha en la figura 19), estos cambios repentinos vuelven a ser evidentes, resultando en una acumulación de células de volumen pequeño, tal y como se presenta en el cultivo por lotes de la figura 15. La motivación para efectuar perturbaciones con NaCl se detalla en la sección 7.4.2.

Además de los cultivos exponencialmente alimentados mostrados en las figuras 16, 17 y 18, se realizaron otros 11, los cuales se incluyen en el apéndice 9.2. Tales cultivos se realizaron a diferentes velocidades de dilución, que variaron desde 0.01 a 0.2 h<sup>-1</sup>. La figura 20 presenta un resumen de las velocidades específicas de crecimiento obtenidas en cada caso en función de las velocidades de dilución que fueron probadas. Como puede apreciarse, el comportamiento de las velocidades específicas de crecimiento es igual a el de un quimiostato en estado estacionario, tal y como lo predice la ecuación (30) de la sección de Materiales y Métodos. Es decir, la velocidad de dilución es igual a la velocidad específica de crecimiento (indicado por la diagonal punteada). Sin embargo, a diferencia de los quimiostatos, se obtuvo una operación estable del reactor a velocidades de dilución cercanas a la velocidad específica de crecimiento máxima, cuando normalmente en un quimiostato hubiera ocurrido el lavado. Entre las ventajas adicionales que presenta el cultivo exponencialmente alimentado sobre otras modalidades de cultivo podemos citar la estabilidad a velocidades específicas de crecimiento muy bajas, lo cual no siempre ocurre con los

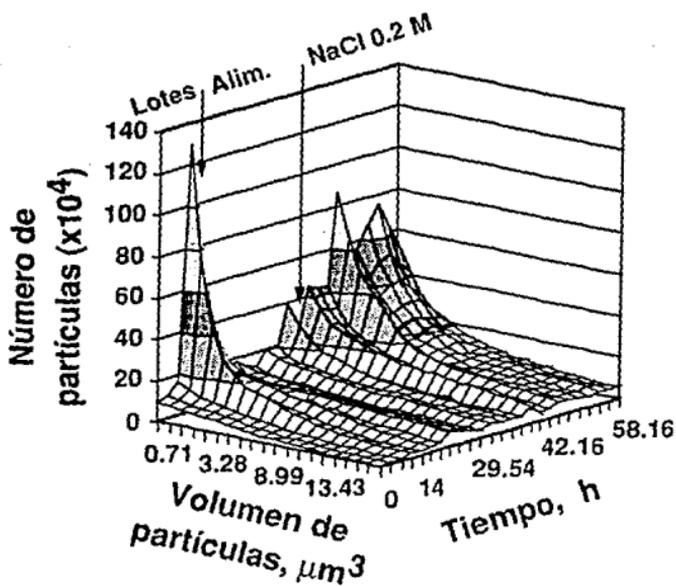


Figura 19. Distribución de partículas a través del tiempo en cultivo exponencialmente alimentado

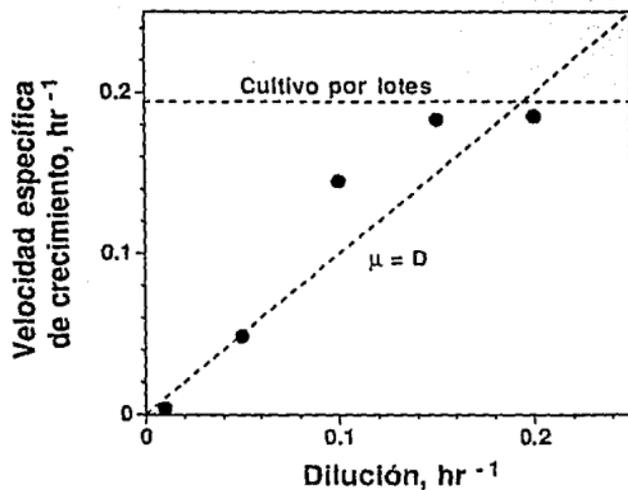


Figura 20. Velocidad específica de crecimiento a diferentes velocidades de dilución en cultivo exponencialmente alimentado.

quimioestatos. A diferencia de los cultivos con recirculación externa de biomasa, el cultivo exponencialmente alimentado no produce turbulencias en la cámara de sedimentación a altas velocidades de dilución, lo cual produce pérdida de biomasa que puede llevar al lavado. Asimismo, aún frente a sistemas como el biorreactor de membranas, presenta la ventaja de alcanzar estados estacionarios reales, cosa que no ocurre en reactores de membranas con recirculación total. Además, estos últimos sistemas presentan problemas de operación tal y como la oclusión de las membranas.

En la figura 20 la línea punteada horizontal indica la velocidad específica de crecimiento en un cultivo por lotes, al no haber limitación por sustrato, este valor puede ser considerado como la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ). Tal velocidad concuerda perfectamente con la máxima obtenida en los cultivos exponencialmente alimentados.

Es importante notar que el comportamiento transitorio y en estado estacionario del cultivo exponencialmente alimentado es diferente al de otros sistemas, como los cultivos con alimentación constante (Esener, 1981) y los biorreactores de membranas (Boulliot, 1990; Uribebarrea, 1990), pero muy similar al de quimioestatos (Ramírez et al., 1994). Por otra parte, el cultivo exponencialmente alimentado permitió una operación sencilla a velocidades de dilución muy bajas, así como cercanas a la velocidad máxima de crecimiento, sin llegar al lavado.

Los resultados de estos experimentos demuestran que la modalidad de cultivo exponencialmente alimentado permiten mantener condiciones de cultivo de estado estacionario, al igual que el quimioestato. Estas características especiales hacen que la modalidad de cultivo exponencialmente alimentado de volumen variable sea un buen candidato para utilizarse en otros tipos de sistemas de tratamiento de aguas. Por ejemplo, este tipo de cultivo podría ser usado como alternativa a la etapa de llenado en el proceso de tratamiento de aguas por cultivo en lotes secuenciales. Los cultivos por lotes secuenciales son comúnmente utilizados para tratamiento de aguas residuales (Norcross, 1992; Wilderer et al, 1991; Arora et al, 1985) y consisten en un reactor de lodos activados convencional, operado como un cultivo por lotes. Una vez terminado el proceso por lotes, se interrumpe la agitación y aireación y se deja sedimentar la biomasa en el reactor, desechando el sobrenadante. Posteriormente se repite el proceso volviendo a llenar el reactor con aguas residuales, utilizando los lodos sedimentados como inoculo. Uno de los principales retos que se presentan en la operación de los reactores por lotes secuenciales es la selección de la estrategia de llenado apropiada (Kennedy et al, 1991). El cultivo exponencialmente alimentado puede ser una buena elección para este proceso, debido a que permite mantener las condiciones de estado estacionario o cuasi-estacionario desde el principio de la operación de

llenado hasta el final. Consecuentemente, se evitan fluctuaciones en el estado metabólico de las bacterias, ya que la adaptación de la población bacteriana a las condiciones cambiantes es uno de los problemas que afectan la operación del sistema por lotes secuenciales.

### 7.4.2. Perturbaciones al sistema

Con el fin de determinar el efecto de perturbaciones al sistema se llevaron a cabo varios experimentos, que consistieron en la adición de cloruro de sodio tanto en el medio de alimentación como en el reactor, produciendo de esta forma un cambio tipo escalón en las condiciones de salinidad de todo el sistema. Este tipo de perturbaciones se ensayó en varios experimentos, utilizando concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 M. El criterio de selección de cambios en la concentración de NaCl en el reactor se seleccionó por ser una estrategia de modificación del metabolismo y fácil de implementar.

Se conoce que la respuesta de algunos microorganismos a altas concentraciones de sales en el medio, es la acumulación de solutos intracelulares, tales como el glicerol y arabinol (Higgins et al, 1987; Reed, 1987). En tales casos, se ha observado que una parte del sustrato es utilizada para la formación de dichos solutos con la consecuente disminución en el rendimiento de biomasa sobre sustrato. Por ejemplo, Larsson y Gustafsson, (1987) reportan un consumo de sustrato adicional del 29 % para formación de glicerol intracelular a partir de glucosa. El fenómeno se presenta tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Watson (1970) reporta un aumento de 4 veces en la energía de mantenimiento para levaduras utilizando una concentración de 1 M. Como se detalló en la sección de Introducción, la generación de lodos residuales representa un problema importante de contaminación. Por lo tanto, cualquier método que pueda canalizar el metabolismo hacia otros productos, como el bióxido de carbono o productos extracelulares fáciles de degradar, en principio puede representar una solución a la formación excesiva de lodos de desecho.

La aplicación práctica del estrés osmótico ya se ha implementado en sistemas de tratamiento de aguas residuales, generando incluso la patente de un método de tratamiento de aguas residuales adicionando agua de mar (Akatsuka-Hisashi et al, 1978). Debido a la naturaleza de tal trabajo, no se dispone de información detallada.

La figura 18 (discutida en la sección 7.4.1) presenta un cultivo exponencialmente alimentado en el que se aplicó NaCl a una concentración de 0.1 M después de alcanzar el estado estacionario. Como puede observarse en las figuras 18A y 18B, en el estado estacionario la velocidad específica de consumo de sustrato era constante, indicado por la pendiente constante de

la DQO consumida acumulada y la pendiente igual a cero de la concentración de biomasa (SSV). Inmediatamente después del cambio en la concentración de cloruro de sodio, el sistema sale del estado estacionario entrando en un período transitorio. Aproximadamente a las 50 horas el sistema entra de nuevo en estado estacionario esta vez con una velocidad específica de consumo de sustrato mayor (esto puede notarse en que la pendiente de la DQO consumida acumulada es ligeramente mayor que la del estado estacionario anterior).

En un experimento llevado a cabo a una concentración de NaCl cercana a la salinidad del mar (0.6 M), el cual se muestra en el apéndice 9.2. (así como los demás experimentos en los que se perturbó con NaCl), se encontró que las células prácticamente dejan de crecer y de consumir sustrato, lo cual indica que altas concentraciones de NaCl tienen un efecto adverso en sistemas de lodos activados. Los resultados de todos los experimentos en que se aplicó NaCl se resumen en la tabla 8; los cálculos de los parámetros que se presentan se realizaron tomando en cuenta las cantidades totales de biomasa (SSV) y sustrato (DQO) en el estado estacionario.

Tabla 8. Efecto de la concentración de NaCl sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ), velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ , mg DQO / mg SSV - h) y rendimiento observado (Y, mg SSV / mg DQO) en cultivo exponencialmente alimentado.

Antes del pulso de NaCl			[NaCl] mol/L	Después del pulso de NaCl		
$\mu$	$q_s$	Y		$\mu$	$q_s$	Y
0.006	0.052	0.107	0.1	0.005	0.073	0.063
0.021	0.034	0.621	0.2	0.012	0.033	0.370
0.005	0.059	0.088	0.4	0.008	0.094	0.082
0.017	0.049	0.348	0.6	0.012	-	-

Para las concentraciones de 0.1 y 0.2 M, el rendimiento después del pulso es de aproximadamente sólo el 60 % del valor antes del pulso, mientras que para la concentración de 0.1 M se observa un aumento en la velocidad específica de consumo de sustrato, para la concentración de 0.2 M la velocidad de consumo de sustrato permanece constante, mientras que la velocidad específica de crecimiento aumenta. Para el caso de NaCl a una concentración de 0.4 M, la disminución en el rendimiento sólo fué del 7 %, lo cual indica que a estas concentraciones el efecto de la concentración de NaCl deja de disminuir notablemente el rendimiento, sin embargo, la velocidad específica de consumo de sustrato aumenta en un 40 %. Para una concentración de 0.6 M, que es aproximadamente la concentración del agua de mar, los microorganismos dejaron de crecer y consumir el sustrato. En la tabla 8 se incluyen también las velocidades específicas de crecimiento y consumo de sustrato, a partir de las cuales se calcularon los rendimientos. Es

importante notar que los valores obtenidos para cada experimento corresponden a diferentes condiciones del inóculo, por lo que no son comparables entre ellos.

Estos resultados nos llevan a afirmar que la adición de NaCl podría ser una buena práctica en sistemas de tratamiento de aguas residuales, porque reducen significativamente (hasta en un 60 %) el rendimiento celular, aunque su campo de aplicación estaría restringido a aquellos sistemas en los que el efluente es depositado en el mar, o en cuerpos de agua donde la salinidad no represente un problema adicional de contaminación. No obstante, aún es necesario un estudio más detallado y exhaustivo sobre el tema. El presente trabajo solamente tuvo la finalidad de probar la factibilidad experimental de realizar tales perturbaciones y cuantificar sus efectos en un sistema de cultivo exponencialmente alimentado.

### 7.5. ANALISIS DE RESULTADOS POR SIMULACION

Para validar los resultados de la sección 7.4. se utilizaron resultados de cultivos axénicos, tomando como modelo biológico la bacteria *Escherichia coli*, que es uno de los organismos más ampliamente utilizados en una gran cantidad de estudios. Esto se llevó a cabo ya que las poblaciones mixtas como los lodos activados, el caso real se complica en gran medida, puesto que cada microorganismo tiene sus propias constantes cinéticas y estequiométricas, además se presentan otros fenómenos, como el consumo endógeno, predación e inhibición. La forma más sencilla de representar estos procesos es utilizando modelos simplificados, que si bien no son muy acertados para describir la situación actual del sistema, para describir el estado estacionario resultan bastante adecuados.

Utilizando como parámetros del modelo valores típicos para *E. coli* (Atkinson, 1987), se resolvieron simultáneamente las ecuaciones de balance de biomasa y sustrato descritas en la sección de Materiales y Métodos (ecuaciones 29 y 30). Un resumen de los resultados obtenidos para una velocidad de dilución de 0.1 h<sup>-1</sup>, y diferentes concentraciones iniciales tanto de biomasa como de sustrato se muestra en la figura 21. A partir de estos resultados se puede concluir que el comportamiento dinámico del cultivo dependerá principalmente de las concentraciones iniciales de biomasa y sustrato, además se observó que en todos los casos se llega a un estado estacionario (excepto para concentraciones iniciales de biomasa igual a 0, donde no existe crecimiento), y la ruta más rápida de alcanzar este estado estacionario, es iniciar el cultivo en condiciones cercanas a éste, es decir a una concentración de biomasa relativamente alta (alrededor de 6 g/L) y concentración de glucosa cercana a cero.

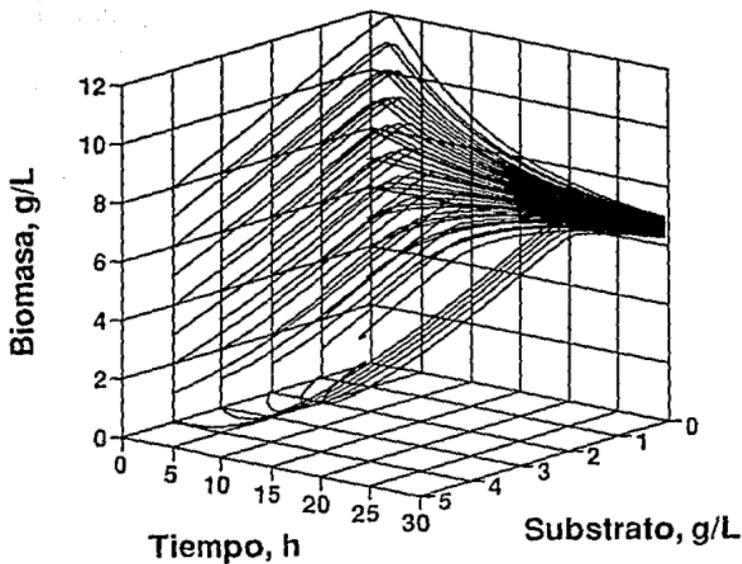


Figura 21. Simulaciones de cultivo exponencialmente alimentado, utilizando:  $\mu_{\max} = 0.35$ ,  $K_s = 0.01$ ,  $Y = 0.5$ .

Se determinaron experimentalmente las constantes cinéticas de una cepa recombinante de *E. coli* utilizando una gráfica de doble recíproco y a partir de los datos de cinco experimentos en matraces (Zamora, 1993), obteniéndose los siguientes valores:  $\mu_m = 0.35 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_s = 0.14 \text{ g/L}$ ;  $Y = 0.65 \text{ g/g}$ . Adicionalmente, se realizó la determinación de las constantes cinéticas y estequiométricas utilizando el método numérico que se describe en la sección de Materiales y Métodos y utilizando los datos de un solo experimento en bioreactos, obteniendo como resultado los siguientes valores:  $\mu_m = 0.36 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_s = 0.18 \text{ g/L}$ ;  $Y = 0.59 \text{ g/g}$ . Como puede observarse, estos valores son muy parecidos a los obtenidos por el método convencional y describen muy bien los perfiles de biomasa y sustrato de los experimentos realizados.

Se encontró que se obtienen resultados más consistentes cuando se comparan cultivos realizados a la misma velocidad de dilución. Al analizar la estimación de los parámetros  $\mu_m$  y  $K_s$  se encontró que puede existir multiplicidad de parejas de valores, dando como resultado múltiples mínimos locales además del mínimo global, estos resultados concuerdan con las conclusiones obtenidas por Holmberg y Ranta (1982), y coinciden con algoritmos más formales como el de optimización de gradiente conjugado de Le (Karim y Rivera, 1992).

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se diseñó y construyó un sistema de tratamiento de aguas por lodos activados a escala laboratorio, el cual fué operado exitosamente durante dos períodos, sumando un período de 520 días, obteniéndose parámetros de desempeño global y comportamiento dinámico que simulan los de una planta de tratamiento de aguas.

Se desarrolló un sistema computarizado de control y adquisición de datos para bioreactores, que tiene como principales características su versatilidad que le permite incorporar distintos esquemas de control, facilidad de operación tanto en la interfase con el usuario como en la modificación a sus rutinas, y la amplia variedad de opciones que lo hace un programa poderoso. Además de su aplicación para sistemas de lodos activados, este sistema ha sido utilizado en diversos sistemas biológicos, como la fermentación de bacterias recombinantes y levaduras, el cultivo de híbridomas e incluso sistemas no biológicos como columnas de lecho empacado, para la determinación de tiempos de residencia. Los esquemas de control que se han implementado en el sistema incluyen control proporcional, encendido/apagado, proporcional-integral-derivativo, control de setpoint oscilante y distintas estrategias de alimentación de medio de cultivo, como forzar perfiles exponenciales, y la adición de pulsos de nutrientes al detectarse el agotamiento del sustrato por parámetros secundarios.

Usando el sistema de adquisición antes mencionado, se hicieron adaptaciones para incorporar técnicas de análisis de flujo inyectado, que por medio de bombas peristálticas y valvulas solenoides permite el muestreo automático y realizar mediciones de velocidad de consumo de oxígeno y demanda bioquímica de oxígeno en tiempos de tan solo una fracción de los métodos convencionales. El sistema permite hacer fácilmente modificaciones adicionales para incorporar estrategias de control de acuerdo a los requerimientos de un sistema en particular.

Se diseñó un protocolo experimental, que consiste en la utilización de una muestra de volumen relativamente pequeña como inóculo para el cultivo de lodos en bioreactor, tanto en la modalidad de cultivo por lotes como exponencialmente alimentado. Este arreglo probó ser una importante herramienta que permite realizar experimentos múltiples de procesos lentos en períodos cortos de tiempo sin perturbar el sistema de lodos.

En los experimentos de cultivo por lotes se identificó que los lodos activados presentan 4 fases de crecimiento: lag, exponencial, estacionaria y fase de consumo endógeno. Si se analiza la distribución poblacional de las bacterias, la fase endógena se puede subdividir en dos fases: en la

## VII. Conclusiones y Recomendaciones

primera las células consumen sus reservas, por lo que disminuye su volumen, mientras que en la segunda fase ocurre la ruptura celular y acumulación de restos.

Se demostró que los lodos activados pueden ser cultivados en un reactor exponencialmente alimentado y que su comportamiento transiente y de estado estacionario asemeja a un quimiostato. La tasa de dilución pudo ser establecida en forma predeterminada, lo cual resultó en una velocidad de crecimiento constante igual a la tasa de dilución seleccionada. Esta característica puede ser potencialmente útil en la aplicación de el cultivo exponencialmente alimentado como una nueva alternativa para la etapa de llenado de reactores por lotes secuenciales, los cuales son comunmente utilizados en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Además, se observó que mediante la determinación de parámetros poblacionales de las células, tales como la distribución de volúmenes celulares se puede generar información importante sobre el comportamiento dinámico de poblaciones mixtas, haciendo posible de esta forma tener una técnica adicional para cuantificar el estado metabólico en que se encuentran las células en cualquier momento del proceso de crecimiento de lodos activados.

Se aprovechó la característica de estado estacionario que presentan los cultivos exponencialmente alimentados para realizar experimentos con un control interno, el cual consistió en inducir cambios al sistema una vez que se alcanzó el estado estacionario, contando de esta manera con datos del mismo cultivo antes y después del cambio para realizar una comparación confiable eliminando las variaciones entre experimentos causadas por la historia del cultivo previa al experimento y el estado metabólico de las células en el momento de iniciar el cultivo.

Se utilizaron perturbaciones que consistieron en la adición de NaCl al sistema para explorar su viabilidad en esquemas de control bioenergético para la reducción de la formación de lodos activados, teniendo como resultado que los cambios en la concentración de NaCl menores a 0.4 M provocaron una perturbación transiente del estado estacionario original, que más tarde se recuperó en un nuevo estado estacionario. Se encontró que la adición de sal a una concentración en 0.1 y 0.2 M en el sistema, además de servir como una perturbación, disminuye hasta en un 60 % el rendimiento de biomasa sobre sustrato en lodos activados, lo cual puede representar una mejora substancial para sistemas de lodos activados, puesto que una de sus principales desventajas es la producción de grandes volúmenes de biomasa que no tiene utilidad práctica alguna. Un estudio más detallado al respecto aún es necesario.

Los estudios de simulación permitieron predecir adecuadamente el comportamiento de cultivos axénicos, encontrando de esta forma las condiciones ideales para alcanzar rápidamente el

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## *VII. Conclusiones y Recomendaciones*

estado estacionario en cultivo exponencialmente alimentado. Mediante la utilización de métodos numéricos se desarrolló un método novedoso para la determinación de las constantes cinéticas y estequiométricas que describen el crecimiento celular en cultivos axénicos. Si bien este tipo de análisis presenta problemas al aplicarse a poblaciones mixtas como los lodos activados, debido a la complejidad misma del sistema, los métodos de estimación de parámetros que se exploraron representan un avance hacia una mejor comprensión cuantitativa de algunos fenómenos biológicos.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Adams, C.E., Eckenfelder, W.W. and Hovious, J.C. 1975. A kinetic model for design of completely-mixed activated sludge treating variable-strength industrial wastewaters. *Wat. Res.* 9, 37-42.
- Aguilar-Aguila, A., Valentinotti, S., Galindo E. y Ramírez O.T. 1993. Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de bioreactores. *Biotecnología*, 3, 5-6, S-130 - S-139.
- Aitken, M.D., Heck, P.E., Mines, R.O and Sherrard, J.H. 1992. Activated sludge. *Wat. Environ. Res.*, 64:4, 347-359.
- Akatsuka H., Iwata M., Kobayashi Y. and Yoshida S. 1978. Method of treating waste water with activated sludge; adding sea water. International patent classification: C02c-005/10, U.S. Patent Number: US-4098689.
- Anaya, D. A. 1991. La contaminación, su prevención y control. *Revista del IMIQ.* 22, 21-37.
- Andrews, G. 1989. Estimating cell and product yields. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 256-265.
- APHA-AWWA-WPCF. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> edition., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Washington D.C. 2 p. 71-87, 5 p. 10-17.
- Arora M.L., Barth E.F. and Umphres M.B. 1985. Technology evaluation of sequencing batch reactors. *J. Water-Pollut. Control-Fed.* 57:8, 867-75.
- Aston, W.J. 1992. Manufacturing biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.* 7, 161-163.
- Atkinson, B and Mavituna, F. 1987. Biochemical engineering and biotechnology handbook. Stockton Press, New York. p. 115-128
- Bailey, J. E. and Ollis, D. F. 1986. Biochemical engineering fundamentals. Second edition, McGraw-Hill, New York.
- Bermúdez, J., Jimeno, A., Cánovas-Díaz, M., Manjón, A. and Iborra, J. 1988. Stability of an aerobic percolating filter successive feed changes and organic and hydraulic overloading. *Process Biochem.* 12, 178-181.
- Bouillot, P., Canales, A., Pareilleux, A., Huyard, A. and Goma, G. 1990. Membrane bioreactors for the evaluation of maintenance phenomena in wastewater treatment. *J. Ferm. Bioeng.* 69, 3, 178-183.
- Bowen, P.T., Magar, V.S., Otoski, R. and McMonagle, T. 1992. Boston Harbor clean-up: comparison of conventional oxygen activated sludge with and without anaerobic selectors. *Wat. Sci. Tech.*, 25:4-5, 281-287.

- Cingolani, L., Cossignani, M. and Miliani, R. 1992. Relationships between population dynamics and operating parameters in an activated sludge-plant by statistical analysis. *Wat. Sci. Tech.* 25:4-5, 399-400.
- Comisión Nacional de Agua, 1991. Plantas de tratamiento de aguas residuales por lodos activados: curso: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Octubre 1991
- Cortés, G. 1994. Simulación de condiciones de fermentadores de gran escala en biorreactores de laboratorio y planta piloto. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Puebla (en proceso).
- Eckenfelder, W.W. and Ford, D.L. 1988. Water pollution control. Pemberton Press, New York, p. 131-144.
- De León, A. 1994. Simulación de condiciones de fermentadores de gran escala en biorreactores de laboratorio y planta piloto. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (en proceso).
- Esener, A. A., Roels, J. A. and Kossen, W. F. 1981. Fed-batch culture: modeling and application in the study of microbial energetics *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1851-1871.
- Farrell, J.B. 1984. Recent developments in sludge digestion in the United States and a view of the future. En: Sewage sludge stabilization and disinfection. Bruce A.M., ed. Ellis Horwood LTD. 16, p. 317-329.
- Forster, C.F., 1985. Biotechnology and wastewater treatment. Cambridge University Press. 7, p. 194-235.
- Fujii M., Kamada M. and Matsubara S. 1987. Process for treating industrial wastewaters by activated sludge; adding phytic acid or salt; controlling oxidation-reduction potentials in aeration tank and settling tank. International patent classification: \*C02F-003/12. U.S. patent number: US-4698158.
- Galindo, E., García, J. L., Torres, L. G., and Quintero, R. 1986. Characterization of microbial membranes used for the estimation of biochemical oxygen demand with a biosensor. *Biotech. Tech.*, 6:5, 399-404.
- García, J.L., Zambrano, N., Aguilar-Aguila, A., Ramírez, O.T. y Galindo, E. 1993. Posibilidades de monitoreo y control de la DBO mediante un biosensor acoplado a una microcomputadora. *Biocología*. 3:5-6, S-120 - S-129.
- Gaudy A. and Gaudy, E. 1981. Microbiology for environmental scientists and engineers. 1st Edition, Mc Graw-Hill Ed. p. 52-59.
- Grau, P., Sutton, P.M., Henze, M., Elmach, S., Grady C.P., Gujer, W. and Koller, J. 1987. Notation for use in the description of wastewater treatment process. *Wat. Res.*, 22, 135-139.
- Gujer, W. and Henze, M. 1991. Activated sludge modelling and simulation. *Wat. Sci. Tech.* 23, 1011-1023.

- Henze, M., Grady, C.P.L., Gruyer, W., Marais, G.V.R. and Matsuo T. 1987. A general model for single sludge wastewater treatment systems. *Wat. Res.*, 21, 505-515.
- Higareda, A.E., Aguilar-Aguila, A., Possani, L.D. y Ramírez, O.T. 1993. Desarrollo de un sistema computarizado y de estrategias de control para la optimización de la producción de anticuerpos monoclonales por cultivo de hibridomas en biorreactores. Premio Anual Casa de la Ciencia 1993, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Higareda, A.E., Possani, L.D. and Ramírez, O.T. 1994. Metabolic and kinetic studies of hybridomas in exponentially fed-batch cultures using T-flasks. *Cytotechnology*.
- Higgins, C.F., Cairney, J., Stirling, D.A., Sutherland, L. and Booth, I.R. 1987. Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal. *Trends in Biochemical Science*, 12, 339-344.
- Holmberg, A., and Ranta, J. 1982. Procedures for parameters and state estimation of microbial growth process models. *Automatica*. 18:2, 181-193.
- Hung, Y.T., Shah, D.B. and Horfall, F.L. 1987. Effect of bioaugmentation on the performance of activated sludge reactors, *Process Biochem.* 6, 68-73.
- Karapanagiotis, N.K., Rudd, T., Stervit, R.M. and Lester, J.N. 1989. Extraction and characterization of extracellular polymers in digested sewage sludge. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94, 107-120.
- Karim, M.N. and Rivera, S.L. 1992. Artificial neural networks in bioprocess state estimation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 46, 1-33.
- Keller R. and Dunn, I.J. 1978. Fed-batch microbial culture: models, errors and applications. *J. App. Chem. Biotechnol.* 28, 805-514.
- Kennedy K.J., Sanchez.W.A., Hamoda M.F. and Droste R.L. 1991. Performance of anaerobic sludge blanket sequencing batch reactors. *Res.J. Water Pollut. Control Fed.* 63:1, 75-83
- Kjaergaard, L. 1977. The redox potential: its use and control in biotechnology. En: *Advances in Biochemical Engineering*. Ghese, T. K., Fiechter, A., Blakerbrough, N. (Ed.), Springer-Verlag. p. 131-150.
- Kwong, C. W., Simon, K. W. and Rao, G. 1991. Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 38:9, 711-720.
- Larsson, C. and Gustafsson C. 1987. Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaromyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. *Arch. Microbiol.* 147, 358-363.
- Lee, J., Choi, Y., Kang, S. and Park, H. 1989. Production of human leukocyte interferon in

- Escherichia coli* by control of rate in fed-batch fermentation. *Biotech. Lett.* 2:10, 695-698.
- Lübert, A. 1991. Automation in biotechnology. En: Biotechnology, Rehm, H.J. and Reed, G. (Eds), 17, p. 561-602.
- Marsili-Libelli, S. 1983. Modelling, identification and control of the activated sludge process. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 38, 89-148.
- Metcalf and Eddy, 1972. Wastewater Engineering, McGraw-Hill, New York.
- Nam, S.W., Sung, U.K. and Lee, K.S. 1993. On-line integrated control system for an industrial activated sludge process. AIChE Annual meeting, St. Louis, Missouri, USA. November 7-12
- Namdev, P. K., Irwin, N., Thompson, B.G. and Gray, M. R. 1992. Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 666-670.
- NOM-AA-34-1981, 1981. Análisis de agua, determinación de sólidos. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Secretaría de Salubridad y Asistencia, Comisión Federal de Electricidad, Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial. p. 1-7.
- Norcross, K.L. 1992. Sequencing batch reactors - an overview. *Water-Sci.Technol.* 26:9-11, 2523-2526.
- Novonty, V., Capodaglio, A. and Jones, H. 1992. Real time control of wastewater treatment operations. *Wat. Sci. Technol.* 25:4-5, 89-101.
- Noyola, A. 1992. Reactores anaerobios de segunda y tercera generación. Curso: Bioprocesos anaerobios para el tratamiento de efluentes industriales. UAM, ORSTOM, IMP.
- Oosterhuis, M. M. G., Kossen, N. W. F., Olivier, A. P. C. and Schenk, E. S. 1984. Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter Oxydans*. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 711-720.
- Orr, T. 1992. Expert systems increasingly applied to control of bioprocess operations. *Gen. Eng. News.* 8, 8.
- Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanalatu, K. and Vilu, R. 1990. Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 312-319.
- Páca, J. 1980. Induction effect of  $pO_2$  during continuous yeast production from ethanol in a multistage tower fermenter. *Eur. J. App. Microb. Biotech.* 9, 93-100.
- Pons, M.N. 1992. Bioprocess monitoring and control. Hanser Publishers, Munich. 4, 279-287.
- Pullammanappallil, P., Owens, J.M., Svoronos, S.A., Chynoweth, D.P. and Liberatos, G. 1993. Development and experimental verification of an expert system for the control of anaerobic digesters. AIChE Annual meeting, St. Louis, Missouri, USA. November 7-12.

- Quirasco, B.M. 1994. Producción y caracterización de un biocatalizador con actividad glucosiltransferasa. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 31-34.
- Ramahlo, R. S. 1977. Introduction to wastewater treatment processes. Academic Press, New York.
- Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. 1994. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enz. Microb Technol.* (en prensa)
- Reed, W.M. 1987. Energy conservation in aerobic digesters by bacterial augmentation. En: *Bioenvironmental systems*. 4:4, p. 99-135.
- Reisenberg, D. 1991. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotech.* 2, 380-384.
- Reisenberg, D., Shulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H-D., Korz, D., Sanders, E.A., Roß, A. and Deckwer, W-D. 1991. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotech.* 20, 17-28.
- Schmidt, S.K., Smith, R., sheker, D., Hess, T.F., Silverstein, J. and Radehaus, P.M. 1992. Interactions of bacteria and microflagellates in sequencing batch reactors exhibiting enhanced mineralization of toxic organic chemicals. *Microbial Ecology*. 23, 127-142.
- Schneider, I. 1992. Update on current fermentation control software packages and systems. *Gen. Eng. News*. 8, 10-11.
- Schugerl, K. 1991. On line analysis of broth. En: *Biotechnology*. Rehm, H.J. and Reed, G. (Eds). 5, p. 150-178.
- SEDUE, Comisión Nacional de Ecología. 1991. Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1989-1990. México.
- Shamas, J.Y. and Englande, Jr. A.J. 1992. Use of the immediate maximum specific oxygen uptake rate as an activated sludge process control parameter. *Wat. Sci. Technol.* 25:1, 123-132.
- Sheintuch, M., Lev, O., Eianv, P. and Rubin E. 1986. Role of exocellular polymer in the design of activated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1564-1576.
- Smith, M. S., Davison, S. W. and Payne, G.F. 1990. Development of a strategy to control the dissolved concentrations of oxygen and carbon dioxide at constant shear in a plant cell bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 1088-1101.
- Spinosa, L., Mininni, G. and Brunett, A. 1987. Biotechnology applied to sewage sludge. En: *Bioenvironmental systems*. 2:3, p. 67-94.
- Stephanopoulos, G. and Stephanopoulos, G. 1986. Artificial intelligence in the development and

- design of biochemical process. *TIBTECH*. 9, 241-249.
- Stephenson, D. and Stephenson, T. 1992. Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotech. Adv.* 10, 549-559.
- Suschka, J. and Ferreira, E. 1986. Activated sludge respirometric measurements. *Wat. Res.* 20:2. 137-144.
- Sweeney, M.W. 1992. Instrumentation and automation. *Wat. Environ. Res.* 64:4, 398-402.
- Sweere, A. P. J., Janse, L., Luyben, K. Ch. A. M. and Kossen, N. M. F. 1987. Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: II. two-fermenter system. *Biotech. Bioeng.* 31, 579-586.
- Träger, M., Hollmann, D., Buse, R. and Onken, U. 1991. Device for fermentation with oscillations of dissolved oxygen. *J. Ferm. Bioeng.* 72:1, 46-53.
- Tyagi, R.D. 1992. Microbial leaching of metals from municipal sludge: effects of sludge solids concentration. *Process Biochem.* 27, 89-96.
- Tyagi, R.D., Sreekrishnan, T.R. and Villeneuve, J.P. 1993. Neural model for the operational control of activated sludge process. *Process Biochem.* 28, 259-267.
- Uhlman, D. 1979. Hydrobiology. 1st edition. John Willey & Sons, p. 159-222.
- Uribelarrea, J. L., Winter, J., Goma, G. and Pareilleux, A. 1990. Determination of maintenance coefficients of *Saccharomyces cerevisiae* cultures with cell recycle by cross-flow membrane filtration. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 201-206.
- Van Esbroeck, H., Schram, E. and Vereecken, J. 1984. An automatic ATP monitor for activated sludge characterization. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34, 76-86.
- Verstraete, W. and Van Vaerenbergh, E. 1985. Aerobic activated sludge. En: *Biotechnology*. Brauer (ed) 2, 43-112.
- Watson, T.G. 1970. Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 64, 91-99.
- Wilderer P.A., Rubio M.A. and Davids L. 1992. Impact of the addition of pure cultures on the performance of mixed culture reactors. *Water-Res.* 25:11, 1307-13
- Williams, D. 1988. Problems of measurement and control in biotechnological processes. En: *Chemical engineering problems in biotechnology*. Winkler, M. A. (Ed.), 4, p. 167-213.
- Wong, A. D. and Goldsmith, C. D. 1984. The impact of a chemostat discharge containing oil degrading bacteria on the biological kinetics of a refinery activated sludge process. *J. Wat. Sci. Technol.* 20:11-12, 131-136.

- Yamane, T. and Shimizu, S. 1984. Fed-batch techniques in microbial processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* **30**, 145-194.
- Yee, L. and Blanch, H.W. 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *E. coli*. *BioTechnology*. **10**, 1550-1556.
- Yegneswaran, P. K., Gray, M. R., Thompson, B. G. 1991. Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermenters: effect on *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1203-1209.
- Zambrano, M.N. 1994. Construcción de un sensor microbiano para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. (en proceso).
- Zamora, F.R. 1993. Cultivos exponencialmente alimentados en la producción de la enzima penicilina acilasa por *E. coli* recombinante. Tesis de licenciatura. Escuela de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Puebla.

## 9.1. USOS DEL SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS

Como se muestra en la tabla 5, comparado con otros sistemas comerciales, el SCAD es poderoso y presenta ventajas importantes en precio, versatilidad y facilidad de uso. Las características principales del "software" diseñado son su versatilidad para incorporar distintos esquemas de control, adquisición, procesamiento y presentación de datos, así como la facilidad (amigable) de ser usado y modificado en un mínimo de tiempo por personas sin experiencia en computación, a través del rápido acceso a menús mediante el ratón de la computadora. Además, debido a que el programa se escribió en un lenguaje de alto nivel, el código es relativamente fácil de modificar para incluir tareas adicionales por personas con conocimientos mínimos en programación. Asimismo, se seleccionó e instaló el "hardware" o equipo necesario como tarjetas de interfase, relevores y amplificadores, y se integró al "software". Como se ha visto esto resultó en un sistema completo de control y adquisición de datos el cual ha sido probado en varios y muy distintos modelos que se describen a continuación.

Tabla 5. Comparación del sistema de control desarrollado con sistemas de control comerciales.

Sistema	MENTOR	ANALYZE	LABVIEW	SCAD-IBT
Desarrollador	LSL Biolaftite	Taylor	National Instruments	Instituto de Biotecnología
Precio (dólares): (software) (sistema completo)	\$ 8,000 \$ 60,000	\$ 8,000 \$ 16,000	\$ 2,000 \$ 17,000 *	** \$ 15,000 *
Tipo de control	CDD / CS	CDD / CS	CDD	CDD / CS
Ambiente	DOS (PC)	DOS (PC)	Mac / Windows	Macintosh
Programación por el usuario	Hasta 300 líneas	Hasta 64 KB	Limitado por RAM	Limitado por RAM
Config. en línea	Sí	Sí	No	Sí
Sintonía en línea	Sí	Sí	No	Sí
Manipulación de datos	Limitada a 2 variables	Usando software adicional	Sí	Sí
Facilidad de operación	Requiere curso introductorio	Requiere curso introductorio	Entorno gráfico	Intuitivo

\* Precio del hardware estimado, incluye computadora, sensores y reactor. \*\* Software no comercializado.  
CDD = Control Digital Directo. CS = Control Supervisorio

## Fermentaciones exponencialmente alimentadas:

Las fermentaciones alimentadas, o "fed-batch", han sido utilizadas exitosamente como un método de cultivo a través del cual se pueden evitar efectos negativos como lo son: inhibición por sustrato, represión catabólica, aumento de la viscosidad, pérdida del agua y efecto Crabtree, entre otros (Yamane y Shimizu, 1984). De tal forma, las fermentaciones alimentadas han permitido prolongar los tiempos de cultivo y obtener concentraciones celulares superiores a los 100 g/L resultando en aumentos sustanciales de la productividad (Riesenberg, 1991). Debido a su

facilidad, las fermentaciones alimentadas más empleadas son aquellas en las que el flujo de alimentación es constante. No obstante, las fermentaciones alimentadas con un flujo que aumenta en forma exponencial presentan mayores ventajas ya que se pueden lograr condiciones de estado cuasi-estacionario en donde se puede fijar en forma predeterminada una velocidad específica de crecimiento constante. Sin embargo, el uso de fermentaciones exponencialmente alimentadas ha sido limitado debido principalmente a la mayor complejidad existente en el establecimiento de perfiles de flujo variables.

Para probar el sistema en fermentaciones exponencialmente alimentadas se usó como modelo una cepa de *E. coli* recombinante productora de la enzima penicilino acilasa (Ramírez et al. 1993). La resolución del flujo fue de  $\pm 0.1$  mL/hr, logrando un perfil exponencial casi perfecto. Asimismo, se logró establecer la condición de estado cuasi-estacionario ya que el oxígeno disuelto, la concentración de glucosa y de biomasa permanecieron relativamente constantes. Entre las peculiaridades del control se puede destacar que el momento de agotamiento de glucosa, que indica el inicio y final de la fase alimentada, puede ser estimado en línea al observarse desviaciones bruscas del valor al que se controla el oxígeno disuelto. Se probó que el sistema permite el cultivo de fermentaciones exponencialmente alimentadas en forma sencilla y con una baja inversión en cuanto a equipo se refiere. En contraste, los métodos que han sido utilizados por otros investigadores para generar perfiles de flujo exponenciales van desde los muy rudimentarios, como lo son el cambio escalonado en forma manual (Lee et al, 1989), o el uso de dispositivos fotomecánicos (Yamane y Shimizu, 1984), hasta los muy sofisticados que requieren de 4 microcomputadoras y un poder de cómputo exagerado (Reisenberg et al, 1991). En algunos casos se usa equipo de cómputo sencillo pero con resoluciones de 8 bits lo que resulta en una baja precisión de control (Paalme et al, 1990). En ninguno de estos casos se puede decir que se tiene un sistema totalmente satisfactorio.

#### Fermentaciones con oscilaciones de oxígeno disuelto:

Los fermentadores industriales de gran escala se caracterizan por condiciones de no idealidad en el mezclado lo que implica que en tales reactores es inevitable la existencia de gradientes en parámetros tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) y la concentración de nutrientes. El caso del OD resulta ser particularmente crítico ya que afecta en forma significativa el metabolismo celular. Una estrategia empleada para estudiar estos gradientes en equipos de gran escala es simularlos en fermentadores de laboratorio. Entre los reportes existentes destacan: la circulación del caldo de cultivo entre dos fermentadores mantenidos cada uno a un valor de OD distinto (Larsson y Enfors, 1988; Sweere et al, 1987) y la variación de la concentración de oxígeno en los gases de entrada ya sea en forma aleatoria (Oosterhuis et al, 1984; Yegneswaran et al, 1991; Namden et al, 1992) o periódica (Páica, 1980). Estos estudios tienen la desventaja de ser procesos de lazo abierto y no mantener un perfil predeterminado de OD. En contraste, el sistema permite controlar el oxígeno disuelto a cualquier tipo de perfil predeterminado a través de un sistema de lazo cerrado. En particular, utilizando este sistema se generaron oscilaciones sinusoidales en el OD

usando agua sola ó cultivos de *Kluyveromyces fragilis* para la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Cortés, 1994) y *E. coli* recombinante para la producción de penicilino acilasa (De León, 1994; Aguilar-Aguila et al., 1993). El programa permite fijar y modificar en línea la amplitud, el período y el eje de oscilación de la onda así como el flujo total de gases. Los períodos de oscilación que tienen más relevancia desde el punto de vista práctico son menores a 4 minutos. Bajo esta circunstancia, la dinámica de los electrodos de oxígeno convencionales es más lenta comparada a la del proceso. De tal forma, el programa incluye correcciones a los valores medidos de OD con lo que se logra una estimación más cercana al valor real. Para inducir las oscilaciones el programa genera un valor fijado (setpoint) oscilante. El valor de la lectura corregida de oxígeno disuelto se compara con el setpoint y en caso necesario la diferencia es empleada por una rutina de control PID para establecer los flujos de gases necesarios para obtener el setpoint deseado. Debe destacarse que el número de trabajos en los que se ha reportado la generación de oscilaciones en el OD con control de lazo cerrado es muy limitado (Trüger et al, 1991; Smith et al, 1990).

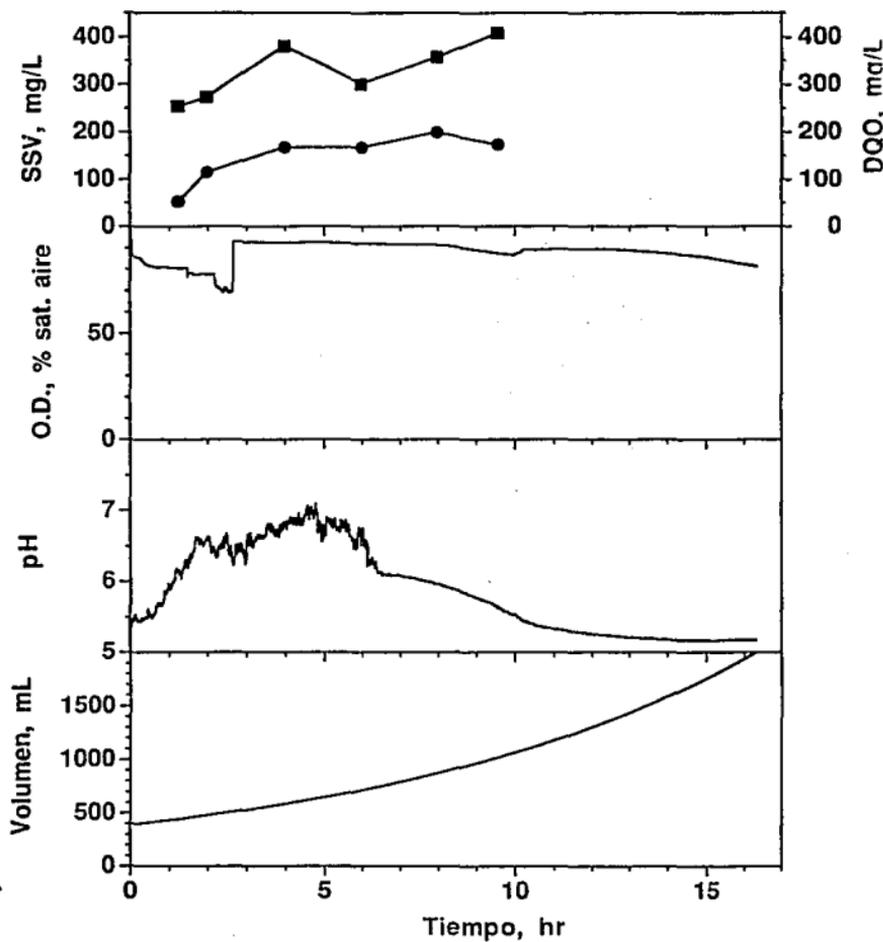
#### Cultivo de hibridomas:

El potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales (AcM) ha hecho de la tecnología de hibridomas una de las más promisorias de la Nueva Biotecnología. Sin embargo, los métodos actuales para el cultivo de hibridomas presentan serias desventajas, incidiendo negativamente en la calidad y costo de los AcM. Higareda et al. (1993) presentan el uso del sistema computarizado así como estrategias de control para la optimización de la producción de AcM secretados por hibridomas cultivados en bioreactores agitados de 1 litro. La línea de hibridomas utilizada, generada con anterioridad, produce un AcM que es específico y neutraliza *in vivo* a la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Con este sistema se monitoreó continuamente la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), el oxígeno disuelto (OD), el pH y el potencial redox del cultivo (PRC). El OD y pH fueron controlados manipulando la composición de oxígeno y dióxido de carbono en el cabezal del biorreactor. Se mostró que a OD constante, el tiempo de agotamiento de glutarnina y/o glucosa puede ser inferido a través de la VCO y del comportamiento dinámico del PRC. Usando esta información, se establecieron estrategias de alimentación resultando en un aumento en la productividad de AcM de más de 9 veces comparado con el control. Asimismo, las mediciones del PRC permitieron discriminar entre un evento metabólico real, como agotamiento de nutrientes, y una eventualidad operacional, tal como fallas eléctricas o mecánicas, abriendo la posibilidad de incorporar conceptos de inteligencia artificial a nuevos algoritmos de control. El sistema presenta ventajas sobre otros sistemas actualmente disponibles y otras estrategias de control rudimentarias comúnmente usadas.

#### Sistemas no biológicos:

El sistema de control y adquisición de datos también ha sido utilizado en sistemas no biológicos, como el caso de un biocatalizador de columna empacada (Quirasco, 1994). En este reactor de flujo pistón se determinó el pH a la salida después de dar pulsos de ácido, con el fin de determinar la distribución de tiempos de residencia en el reactor a diferentes flujos.

## 9.2. RESULTADOS TOTALES DE LOS EXPERIMENTOS

Figura 22. Cultivo exponencialmente alimentado,  $D=0.1 \text{ hr}^{-1}$ .

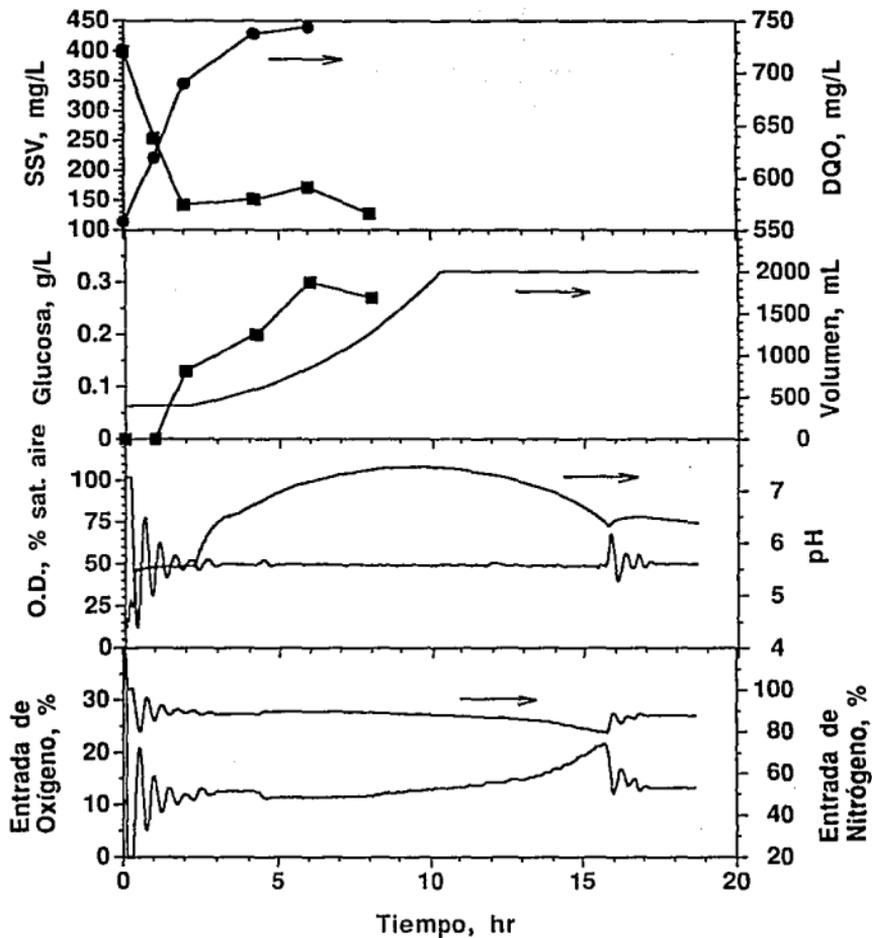
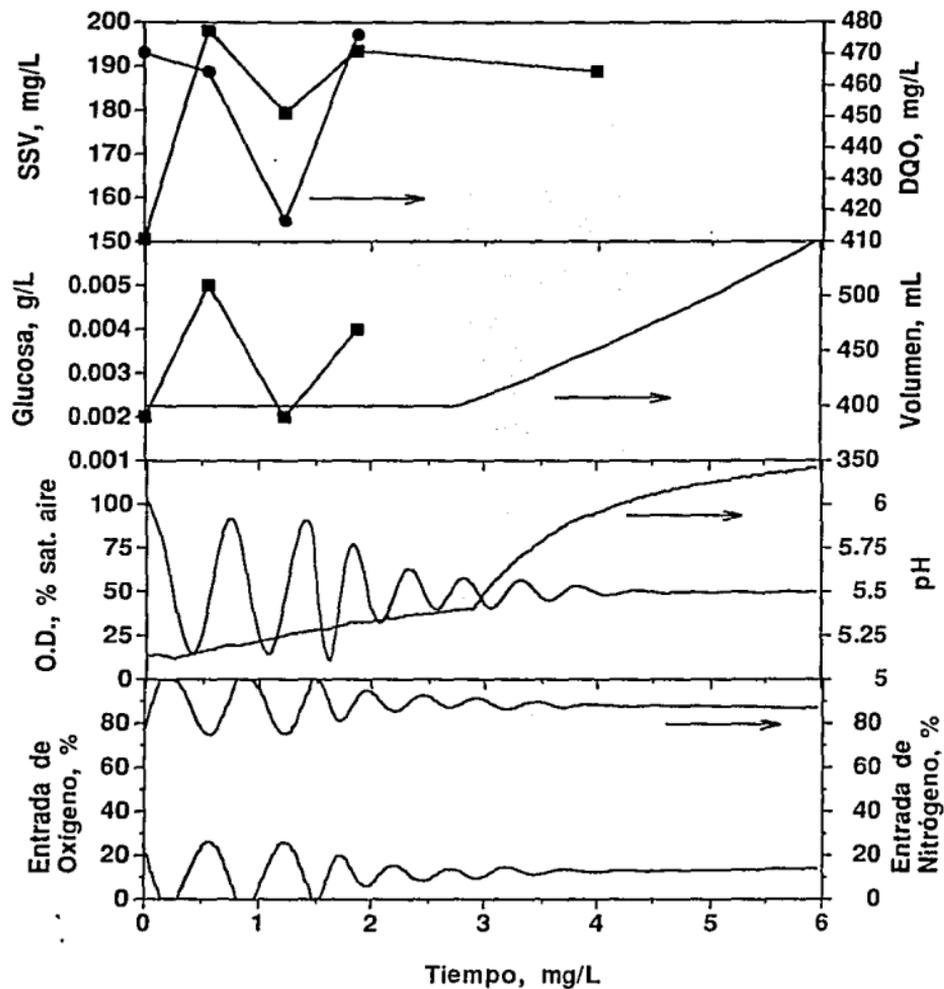
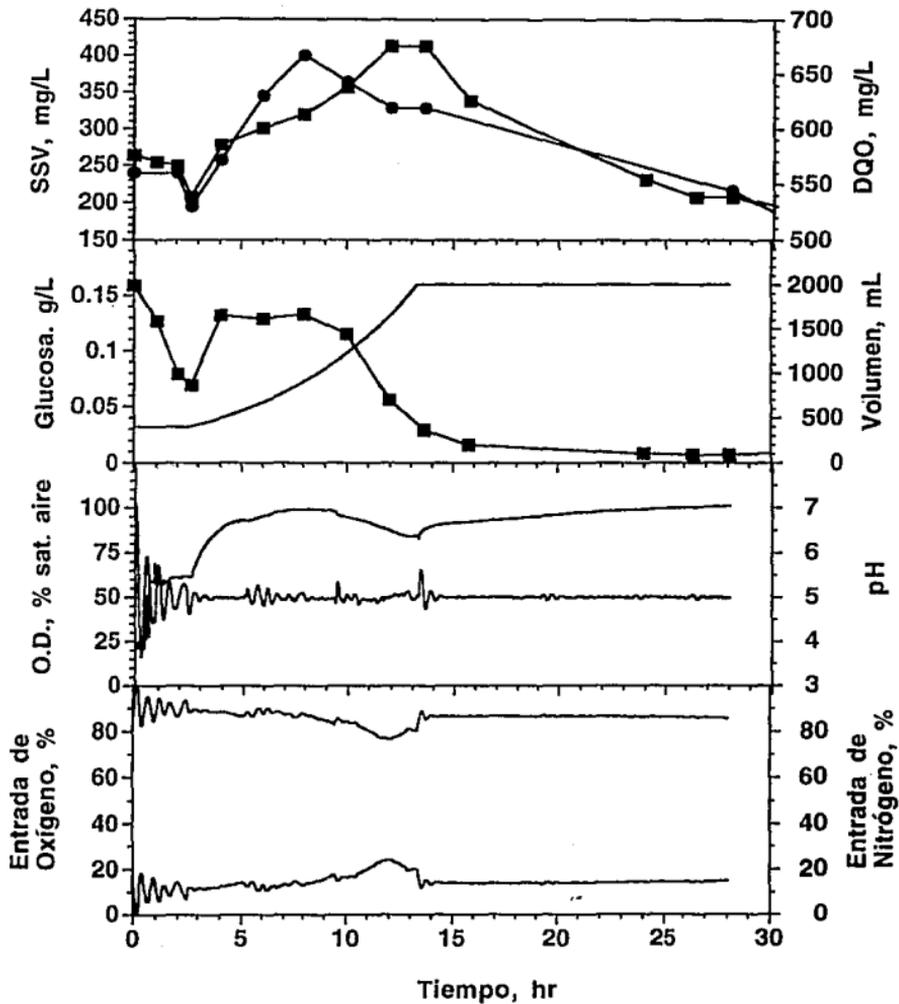


Figura 23. Cultivo exponencialmente alimentado,  $D=0.2 \text{ h}^{-1}$ .

Figura 24. Cultivo exponencialmente alimentado,  $D=0.1 \text{ h}^{-1}$ .

Fig. 25. Cultivo exponencialmente alimentado,  $D=0.15 \text{ h}^{-1}$ .

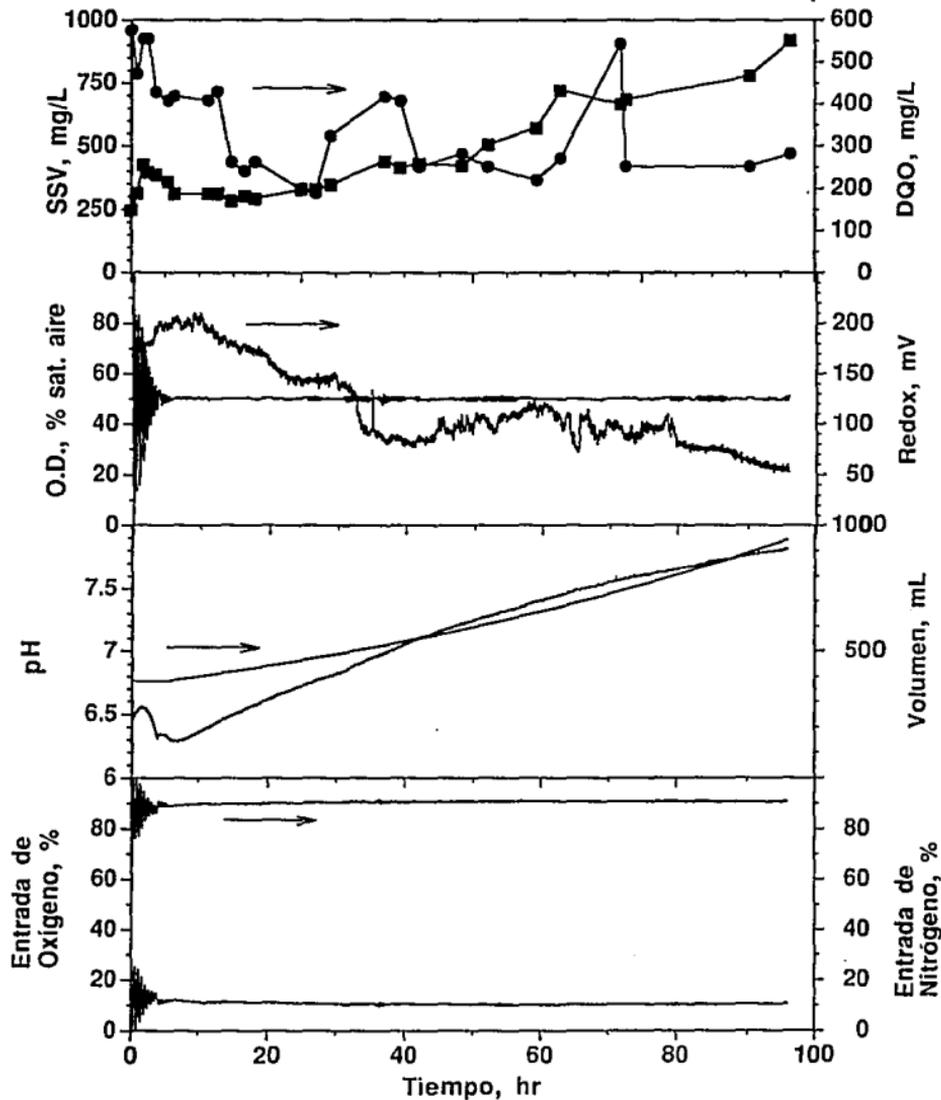


Figura 26. Cultivo exponencialmente alimentado,  $D=0.01 \text{ h}^{-1}$ .

## 9.3. LISTADO DEL PROGRAMA SCAD

START:

```

LIBRARY *TurboDrivers INTERFACE*
LIBRARY *DATAMANIPULATION INTERFACE*
OPEN *COM1:600,O,8,2,* AS #10
CLS
MENU 1,0,1,*INTERACTUAR*
MENU 1,1,1,*CAMBIAR PARAMETROS*:CMDKEY 1,1,*P*
MENU 1,2,1,*DETENER *:CMDKEY 1,2,*D*
MENU 1,3,1,*REINICIAR*:CMDKEY 1,3,*R*
MENU 1,4,1,*TERMINAR*:CMDKEY 1,4,*T*
MENU 2,0,1,*ALIMENTACION*
MENU 2,1,1,*INICIAR*:CMDKEY 2,1,*I*
MENU 2,2,1,*CAMBIAR PARAMETROS*:CMDKEY 2,2,*A*
MENU 2,3,1,*DETENER BOMBA*:CMDKEY 2,3,*S*
MENU 2,4,1,*FLUJO CONSTANTE*:CMDKEY 2,4,*C*
ON MENU GOSUB INTERAC: MENU ON

```

PRNC:

```

WINDOW 2:*PARAMETROS*, (60,40)-(600,470),1
INPUT *Nombre del Archivo (no repetir nombre ya usado)*: ARCHIVOS : PRINT
INPUT *Intervalo de Adquisición de Datos (seg)*:TII : PRINT
INPUT *Tiempo de la Fermentación (Hrs.):*:TFH: PRINT
INPUT *Flujo Total de Gases de Entrada en ccpm (no exceder de 1000)*: FG% : PRINT
PRINT *Composición Inicial de los Gases de Entrada*
INPUT *% N2 (sugerido:79%)*: N2I
INPUT *% O2 (sugerido:21%)*: O2I: PRINT
INPUT *% de Oxígeno Disuelto Deseado*: SDO! : PRINT
INPUT *pH Deseado*:SPHI: PRINT
INPUT *Tiempo de Control*: DELTA! : PRINT
INPUT *Ganancia para Oxígeno Disuelto (-1 para suprimir control)*:GAINDO : PRINT
INPUT *Duración del pulso para control de pH (seg.) (-1 para suprimir control)*:GAINPH : PRINT
INPUT *Banda de Tolerancia para Oxígeno Disuelto (+/- %DO)*:TOLDO : PRINT
INPUT *Banda de Tolerancia para pH (+/- pH)*:TOLPH : PRINT
PRINT *Factor de Corrección por Diferencia de Presión de las Condiciones Standard*
INPUT *= 1.225 para Cuernavaca*: ALFA

```

CLS

WINDOW CLOSE 2

CONSTANTES:

```

TF=TFH*3600
NP=TF/TI
PUMPFLAG=0
DIM value%(15):DIM value!(15)
DIM DOP!(NP+10):DIM PHP!(NP+10):DIM O2P!(NP+10):DIM N2P!(NP+10):DIM TRHP(NP+10):DIM
TEMP(NP+10):DIM VOL(NP+10):DIM REDOX(NP+10)
ER% = 0:slot% = 1:value%(0) = 0:LSB = 10000/4096: ER% = 0
FOR bit% = 0 TO 7
CALL setDoubit (bit%,1,slot%,VARPTR(ER%))
NEXT bit%
PRINT #10, *APMXARSTA*: CHR$(0): *APMXBRSTB*: CHR$(0)
PRINT #10, *APMXA0000*: CHR$(0): *APMXB0000*: CHR$(0)
PRINT #10, *APMXASTRA*: CHR$(0): *APMXBSTRB*: CHR$(0)
ARCHIVO1$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.DO*
ARCHIVO2$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.PH*
ARCHIVO3$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.O2*
ARCHIVO4$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.N2*
ARCHIVO5$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.TEMP*
ARCHIVO6$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.TR*
ARCHIVO7$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.VOL*
ARCHIVO8$ = *Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:* + ARCHIVOS.*.REDOX*
SPO2% = ((FG%*O2I*.05)/(ALFA))/LSB
SPN2% = ((FG%*N2I*.05)/(ALFA))/LSB
CON1 = 1
CON2 = 1
IF NP = 200 THEN COMP% = 0

```

```

IF NP < 200 THEN COMP%=200/NP*(1)
IF NP > 200 THEN COMP%=NP/200
OPEN "O",#1,ARCHIVO1S: CLOSE #1
OPEN "O",#2,ARCHIVO2S: CLOSE #2
OPEN "O",#3,ARCHIVO3S: CLOSE #3
OPEN "O",#4,ARCHIVO4S: CLOSE #4
OPEN "O",#5,ARCHIVO5S: CLOSE #5
OPEN "O",#6,ARCHIVO6S: CLOSE #6
OPEN "O",#7,ARCHIVO7S: CLOSE #7
OPEN "O",#8,ARCHIVO8S: CLOSE #8
CALL PANTALLA
NICO:
TIEMPO0=TIMER
FECHAS=DATES
DIAS=0
TIEMPO1=TIMER-(DIAS*86400)
TIEMPO2=TIMER-(DIAS*86400)
CCLO:
IF FECHAS<DATES THEN DIAS=DIAS+1
FECHAS=DATES
TRH1=((TIMER-TIEMPO0)*DIAS*86400&)/3600
IF CON2=1 THEN TRH1=TRH
CALL CWRITE(145,64,SPO2%,slot%,VARPTR(ER%))
CALL CWRITE(145,72,SPN2%,slot%,VARPTR(ER%))
  setad 0, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  setad 1, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  setad 2, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  setad 3, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  setad 4, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  setad 5, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  setad 6, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  setad 7, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  cread 0, 0, VARPTR(value%(0)), slot%, VARPTR(ER%)
  cread 1, 0, VARPTR(value%(1)), slot%, VARPTR(ER%)
  cread 2, 0, VARPTR(value%(2)), slot%, VARPTR(ER%)
  cread 3, 0, VARPTR(value%(3)), slot%, VARPTR(ER%)
  cread 4, 0, VARPTR(value%(4)), slot%, VARPTR(ER%)
  cread 5, 0, VARPTR(value%(5)), slot%, VARPTR(ER%)
  cread 6, 0, VARPTR(value%(6)), slot%, VARPTR(ER%)
  cread 7, 0, VARPTR(value%(7)), slot%, VARPTR(ER%)
CALL ITOS (VARPTR (value%(0)),VARPTR (value%(0)),0,7)
DO1=(value!(0)*LSB-270)/100.4
FORECOLOR 33:LOCATE 7,15:PRINT USING "% Oxígeno Disuelto: ###.#":DO1
PH1=(value!(1)*LSB)-63.04/701.28
LOCATE 7,55:PRINT USING "pH= ##.##":PH1
REDOX1=(value!(2)-5)*LSB
FORECOLOR 409:LOCATE 7,70:PRINT USING "p REDOX = ###.##":REDOX1
LOCATE 22,4:PRINT "Entrada de Gases (%):"
O21=(value!(5)*LSB)/20*ALFA/FG%
FORECOLOR 205:LOCATE 22,20:PRINT USING "O2:###.#":O21
N21=(value!(6)*LSB)/20*ALFA/FG%
FORECOLOR 341:LOCATE 22,28:PRINT USING "N2:###.#":N21
TEMP1=(value!(4)*LSB)/10
FORECOLOR 137:LOCATE 19,60:PRINT USING "Temperatura = ###.## °C":TEMP1:FORECOLOR 33
LOCATE 4,80:PRINT DATES:LOCATE 5,80:PRINT TIMES
FORECOLOR 137:LOCATE 19,15:PRINT USING "Tiempo Transcurrido = ##.## Hrs":TRH:FORECOLOR 33
DOS1=DOI+DOS:DOI(CON1)=DOS/CON2
PHS1=PH1+PHS:PHP(CON1)=PHS/CON2
O2S1=O21+O2S:O2P(CON1)=O2S/CON2
N2S1=N21+N2S:N2P(CON1)=N2S/CON2
TEMPS1=TEMP1+TEMPS:TEMPP(CON1)=TEMPS/CON2
REDOXS1=REDOX1+REDOXS:REDOXP(CON1)=REDOXS/CON2
TRH2=TRH
TRHP(CON1)=(TRH1-TRH2)/2
CALL PLOT (1,100,230,40,VARPTR (DOP!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,11,0)
CALL PLOT (1,100,230,345,VARPTR (PHP!(0)),9.5,CON1,COMP%,0,11,0)

```

```

FORECOLOR 409:CALL PLOT (1,100,230,345,VARPTR (REDOXP(0)),200,0,CON1,COMP%,0,11,0)
FORECOLOR 205:CALL PLOT (1,290,420,40,VARPTR (O2P(0)),100,0,CON1,COMP%,0,11,0)
FORECOLOR 341:CALL PLOT (1,290,420,40,VARPTR (N2P(0)),100,0,CON1,COMP%,0,11,0)
CON2=CON2+1
IF PUMPFLAG=0 THEN GOTO SINALIM
TIEMPO=(TIMER-TIEMPOA)+(DIAS*86400)
FLUJO=V1*MU*EXP(MU*TIEMPO/3600)
FLUJO(1)=FLUJO
N=1
IF FLUJO > 999.9 THEN GOTO AJUSTE
CS(2)="0": DS(2)="0": ES(2)="0": FS(2)="0"
FOR I=1 TO N
F(I)=FIX (FLUJO(I)/100)
FS(I)=RIGHT$(STR$(F(I)),1)
E(I)=FIX (FLUJO(I)/10)-F(I)*10
ES(I)=RIGHT$(STR$(E(I)),1)
D(I)=FIX (FLUJO(I)-(F(I)*100)-(E(I)*10)
DS(I)=RIGHT$(STR$(D(I)),1)
C(I)=FIX (FLUJO(I)*10)-(F(I)*1000)+(E(I)*100)+(D(I)*10)
CS(I)=RIGHT$(STR$(C(I)),1)
ZS(1)="APMXA"
ZS(2)="APMXB"
AS(I)=ZS(I)+CS(I)+DS(I)+ES(I)+FS(I)
PRINT #10,"APMXARSTA": CHR$(0); "APMXBRSTB": CHR$(0)
PRINT #10,"APMXA0000": CHR$(0); "APMXB0000": CHR$(0)
PRINT #10,"APMXASTRA": CHR$(0); "APMXBSTRB": CHR$(0)
PRINT #10,AS(I);CHR$(0)
NEXT I
FLUJOS(1)=FS(1)+ES(1)+DS(1)+","+CS(1)
FLUJOS(2)=FS(2)+ES(2)+DS(2)+","+CS(2)
FORECOLOR 33
LOCATE 22,55:PRINT USING "ALIMENTACION: (D=#.###):"MU
LOCATE 24,50:PRINT "Bomba A: "FLUJOS(1); " mL/Hr"
LOCATE 26,50:PRINT "Bomba B: "FLUJOS(2); " mL/Hr"
VOL=V1*EXP(MU*TIEMPO/3600)
LOCATE 28,50:PRINT USING "VOLUMEN PRESENTE: #####.## mL (##.## %):VOL:(VOL/VF)*100
LOCATE 30,50:PRINT USING "TIEMPO ALIMENTACION: ####.## Hrs (###.##
%):TIEMPO/3600;((TIEMPO/3600)/TA)*100
IF VOL > VF THEN GOTO FINALIM
SINALIM:
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400)
IF MOUSE(0) <= 0 THEN CALL PANTALLA
IF TRHP(CON1) > TF/3600 THEN GOTO FINAL
IF TIEMPO3-TIEMPO1 > = TII THEN GOTO SALVAR
IF TIEMPO3-TIEMPO2 > = DELTA! THEN GOTO CONTROL
GOTO CICLO
AJUSTE:
IF FLUJO > 999.9 GOTO FLMAX
FLUJO(1)=999.9
FLUJO(2)=FLUJO-999.9
N=2
GOTO CICLO
FINALIM:
PRINT #10,"APMXA0000": CHR$(0); "APMXB0000": CHR$(0)
PRINT #10,"APMXASTPA": CHR$(0); "APMXBSTPB": CHR$(0)
CLS
BEEP:BEEP:BEEP:BEEP
LOCATE 22,50:PRINT "La Etapa Alimentada ha Concluido"
LOCATE 24,50:PRINT "Apagar Bomba"
LOCATE 26,50:PRINT "La Fermentación Proseguirá desde Ahora"
LOCATE 28,50:PRINT "Como un Proceso por Lotes"
PUMPFLAG=0
GOTO SINALIM
FLMAX:
CLS
BEEP:BEEP

```

```

PRINT #10, "APMXA9999"; CHR$(0); "APMXB9999"; CHR$(0)
PRINT "El Flujo Requerido ha Rebাসado la Capacidad de la Bomba"
PRINT "El Flujo se Mantendrá Constante en 1999.8"
TIEMPO1=(TIMER-START)+DIAS*86400!
ESPERA2:
TIEMPO2=(TIMER-START)+DIAS*86400!
IF TIEMPO2-TIEMPO > INTE THEN TIEMPO=(TIMER-START)+DIAS*86400!
FECHA2$=DATES
IF FECHA2$ > FECHAS THEN DIAS=DIAS-1:FECHAS=DATES
VOL=VOL+(((TIEMPO2-TIEMPO1)/3600)*1999.8)
LOCATE 4,4:PRINT USING "EL VOLUMEN PRESENTE DEBE SER #####.## mL (###.##
%)":VOL:(VOL/VF)*100
TIEMPO1=(TIMER-START)+DIAS*86400!
IF VOL > VF THEN GOTO FINAL
GOTO ESPERA2
CONTROL:
IF GAINDO = -1 THEN GOTO CONTROLPH
DIFDO!=$DO!-DOP!(CON1)
IF DIFDO! > TOLDO THEN SPO2%=$SPO2%-(DIFDO!*GAINDO)
IF DIFDO! < (-1)*TOLDO THEN SPO2%=$SPO2%+ABS(DIFDO!*GAINDO)
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0:IF SPO2% > (5*FG%/ALFA)/LSB THEN SPO2%=(5*FG%/ALFA)/LSB
SPN2%=(5*FG%/ALFA)/LSB-SPO2%
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0:IF SPN2% > (5*FG%/ALFA)/LSB THEN SPN2%=(5*FG%/ALFA)/LSB
CONTROLPH:
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400!)
IF GAINPH=-1 THEN TIEMPO2=TIMER-(DIAS*86400!):GOTO CICLO
IF PHP!(CON1) > SPH! + TOLPH GOTO ACIDO
IF PHP!(CON1) < SPH! - TOLPH GOTO ALCALI
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
GOTO CICLO
ACIDO:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400!)
CALL setDoutbit (0,0,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 7,7:PRINT "CONTROLANDO!!!"
IF PULSO2-PULSO1 < GAINPH THEN GOTO ACIDO
CALL setDoutbit (0,1,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 7,7:PRINT "
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
GOTO CICLO
ALCALI:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400!)
CALL setDoutbit (1,0,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 7,7:PRINT "CONTROLANDO!!!"
IF PULSO2-PULSO1 < GAINPH THEN GOTO ALCALI
CALL setDoutbit (1,1,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 7,7:PRINT "
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
GOTO CICLO
SALVAR:
OPEN "A",#1,ARCHIVO1$:OPEN "A",#2,ARCHIVO2$:OPEN "A",#3,ARCHIVO3$:OPEN "A",#4,ARCHIVO4$
OPEN "A",#5,ARCHIVO5$:OPEN "A",#6,ARCHIVO6$:OPEN "A",#7,ARCHIVO7$:OPEN "A",#8,ARCHIVO8$
WRITE #1, DOP!(CON1):WRITE #2, PHP!(CON1):WRITE #3, O2P!(CON1):WRITE #4, N2P!(CON1)
WRITE #5, TEMPP!(CON1):WRITE #6, TRHP!(CON1):WRITE #7, VOL:WRITE #8, REDOXP(CON1)
CLOSE #1: CLOSE #2: CLOSE #3: CLOSE #4 : CLOSE #5: CLOSE #6: CLOSE #7: CLOSE #8
CON1=CON1-1
CON2=1
TIEMPO1=TIMER-(DIAS*86400!)
DOS!=$PHI!-0:O2SI!=$N2SI!-0:TEMPSI!=$REDOXS!-0
GOTO CICLO
FINAL:
WINDOW 3, (215,100)-(420,300),2
BEEP : BEEP : BEEP : BEEP
CALL TEXTFACE (1)
PRINT
PRINT "EL TIEMPO DE FERMENTACION"
PRINT
PRINT " HA TERMINADO"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"CONTINUAR",(20,145)-(180,160),1
BUTTON 2,1,"TERMINAR",(20,175)-(180,190),1
r%(0)=175

```

```

r%(1)=20
r%(2)=190
r%(3)=180
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: SYSTEM
IF BOTON=1 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: CALL PANTALLA: GOTO EXTRA
INTERAC:
NUMMENU=MENU(0): IF NUMMENU < 1 OR NUMMENU > 2 THEN RETURN
IF NUMMENU=2 THEN GOTO MENU2
ARTMENU=MENU(1)
ON ARTMENU GOSUB PARAM, DETENER, REINICIAR, TERMINAR
RETURN
MENU2:
ARTMENU=MENU(1)
ON ARTMENU GOSUB GO,PARAM2, PARAR, CONS:RETURN
PARAM:
WINDOW 4,,(135,70)-(380,430),2
CALL TEXTFACE (1)
PRINT " Parámetro a modificar:"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Tiempo de Adquisición",(20,35)-(210,50),1
BUTTON 2,1,"Tiempo de Fermentación",(20,65)-(210,80),1
BUTTON 3,1,"Flujo de Gases",(20,95)-(210,110),1
BUTTON 4,1,"% de Oxígeno Deseado",(20,125)-(210,140),1
BUTTON 5,1,"pH Deseado",(20,155)-(210,170),1
BUTTON 6,1,"Tiempo de Control",(20,185)-(210,200),1
BUTTON 7,1,"Ganancia DO",(20,215)-(210,230),1
BUTTON 8,1,"Tolerancia DO",(25,245)-(210,260),1
BUTTON 9,1,"Pulse para Control de pH",(20,275)-(210,290),1
BUTTON 10,1,"Tolerancia pH",(20,305)-(210,320),1
BUTTON 11,1,"OK",(150,335)-(200,350),1
r%(0)=335
r%(1)=150
r%(2)=350
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=11 OR DIALOGO=6 THEN WINDOW CLOSE 4: CALL PANTALLA: RETURN
ON BOTON GOSUB TADO, TFER, FLG, OXI, PHD, TCON, GANDO, TOLEDO,GANPH,TOLEPH
WINDOW CLOSE 4: CALL PANTALLA
RETURN
TADO:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.## seg.": TII
INPUT "Tiempo de Adquisición": TII
GOTO PARAM
TFER:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.## Hrs.": TFH

```

```

INPUT "Tiempo de Fermentación": TFH
  NP = TFH*3600/TI
  CON1 = 1
  CON2 = 1
  GOTO PARAM

FLG:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.## SCCPM": FG%
  INPUT "Flujo Total de Gases": FG%
  GOTO PARAM

OXI:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.## %": SDO!
  INPUT "% de Oxígeno Desado": SDO!
  GOTO PARAM

PHD:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.##": SPH!
  INPUT "pH Desado": SPH!
  GOTO PARAM

TCON:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.## seg.": DELTA!
  INPUT "Tiempo de Control": DELTA!
  GOTO PARAM

GANDO:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.##": GAINDO
  INPUT "Ganancia para DO": GAINDO
  GOTO PARAM

TOLEDO:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.## % DO": TOLDO
  INPUT "Tolerancia para DO": TOLDO
  GOTO PARAM

GANPH:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.## seg.": GAINPH
  INPUT "Pulso de Acido/Base": GAINPH
  GOTO PARAM

TOLEPH:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.##": TOLPH
  INPUT "Tolerancia para pH": TOLPH
  GOTO PARAM

DETENER:
  WINDOW 5,(215,100)-(420,300),2
  CALL TEXTFACE (1)
  PRINT
  PRINT " El sistema se ha detenido"
  PRINT
  PRINT " momentaneamente"
  CALL TEXTFACE (0)
  BUTTON 1,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
  r%(0)=175
  r%(1)=5
  r%(2)=190
  r%(3)=200
  inSetRect r%(0),-4,-4
  PENSIZE 3.3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  PENNORMAL
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WHILE DIALOGO<<1 AND DIALOGO<>6
    DIALOGO=DIALOG(0)
  WEND

```

```

INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
CLS: WINDOW CLOSE 5: CALL PANTALLA
RETURN

REINICIAR:
  BEEP
  WINDOW 6,,(215,100)-(420,300),2
  PRINT
  CALL TEXTFACE (1)
  PRINT * ¿ REALMENTE DESEA*
  PRINT * REINICIAR ? *
  CALL TEXTFACE (0)
  BUTTON 1,1,"Reiniciar", (5,135)-(200,150),1
  BUTTON 2,1,"Continuar", (5,175)-(200,190),1
  r%(0)=175
  r%(1)=5
  r%(2)=190
  r%(3)=200
  InSetRect r%(0),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  PENNORMAL
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WEND
  INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  BOTON=DIALOG(1)
  IF BOTON=1 THEN CLEAR:GOTO START
  IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 6: CALL PANTALLA
  RETURN

TERMINAR:
  BEEP
  WINDOW 7,,(215,100)-(420,300),2
  PRINT
  CALL TEXTFACE (1)
  PRINT * ¿ REALMENTE DESEA*
  PRINT * TERMINAR ? *
  CALL TEXTFACE (0)
  BUTTON 1,1,"Terminar", (5,135)-(200,150),1
  BUTTON 2,1,"Continuar", (5,175)-(200,190),1
  r%(0)=175
  r%(1)=5
  r%(2)=190
  r%(3)=200
  InSetRect r%(0),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  PENNORMAL
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WEND
  INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  BOTON=DIALOG(1)
  IF BOTON=1 THEN SYSTEM
  IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 7: CALL PANTALLA
  RETURN

EXTRA:
  WINDOW 8,,(215,100)-(420,300),2
  PRINT * Tiempo Adicional de *
  PRINT * Fermentación*
  PRINT USING "(No Exceder de ###.## Hrs.):"TF/3600
  INPUT TA
  TF = TF + TA
  NP = TF/1
  CON1 = 1

```

```

CON2 = 1
WINDOW CLOSE 8
CALL PANTALLA
GOTO INICIO
GO:
PUMPFLAG=PUMPFLAG+1
IF PUMPFLAG >=2 THEN RETURN
MENU 2,1,0,"INICIAR":CMDKEY 2,1,"I"
TIEMPOA=(TIMER-START)+DIAS*86400!
WINDOW 9,,(150,50)-(500,350),2
PRINT "DATOS PARA ALIMENTACION EXPONENCIAL"
INPUT "Volumen Inicial (mL)":VI
INPUT "Volumen Final (mL)":VF
INPUT "Vel. Esp. de Crecimiento (1/h)":MU
VOL=VI
TA=(LOG(VF/VI))/MU
PRINT "La Etapa Alimentada Durará":TA:"Hrs."
BUTTON 1,1, "OK", (200,100)-(250,118)
  r%(0)=100
  r%(1)=200
  r%(2)=118
  r%(3)=250
  inSetRect r%(0),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  PENNORMAL
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
    DIALOGO=DIALOG(0)
  WEND
  WINDOW CLOSE 9
  RETURN
PARAM2:
WINDOW 10,,(155,70)-(360,340),2
PRINT "Parámetro a modificar:"
BUTTON 1,1,"Tiempo Alimentación ",(5,35)-(200,50),1
BUTTON 2,1, "Volumen Final", (5,65)-(200,80),1
BUTTON 3,1,"Dilución", (5,95)-(200,110),1
BUTTON 5,1,"OK", (150,235)-(200,250),1
  r%(0)=235
  r%(1)=150
  r%(2)=250
  r%(3)=200
  inSetRect r%(0),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  PENNORMAL
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
    DIALOGO=DIALOG(0)
  WEND
  BOTON=DIALOG(1)
  IF BOTON=5 OR DIALOGO=6 THEN WINDOW CLOSE 10: CALL PANTALLA:RETURN
  ON BOTON GOSUB TACT, NVFIN, NMU
  GOTO PARAM2
  RETURN
TACT:
CLS
PRINT USING "ACTUAL: ###.## Hrs.":TIEMPO
INPUT "Tiempo Transcurrido":TIEMPO
RETURN
NVFIN:
CLS
PRINT USING "ACTUAL: ###.## mL":VF
INPUT "Volumen final (mL)": VF
TF=(LOG(VF/VI))/MU

```

```

RETURN
NMU:
CLS
PRINT USING "ACTUAL: ###.## H^-1";MU
INPUT "Dilución"; MU
RETURN
PARAR:
BEEP
PRINT #10, "APMXA0000"; CHR$(0); "APMXB0000"; CHR$(0)
WINDOW 11,,(215,100)-(420,300),2
PRINT "La Bomba se ha Detenido"
PRINT "Momentaneamente"
BUTTON 1,1,"Continuar",{5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSelRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
CLS: WINDOW CLOSE 10: RETURN
ON BOTON GOSUB
WINDOW CLOSE 11
RETURN
CONS:
BEEP
WINDOW 12,,(215,100)-(420,300),2
PRINT
PRINT "¿ REALMENTE DESEA UTILIZAR"
PRINT " FLUJO CONSTANTE ?"
BUTTON 1,1,"OK",{5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",{5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSelRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=1 THEN GOTO FLC
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 12
RETURN
FLC:
WINDOW CLOSE 12
CLS
INPUT "FLUJO DESEADO"; FLUJO
IF FLUJO > 999.9 THEN PRINT "LA BOMBA NO PROPORCIONA FLUJOS TAN ALTOS !!!":GOTO CONS
IF FLUJO > 0 THEN FLU(1)=FLUJO : N=1
IF FLUJO > 999.9 THEN FLU(2)=FLU(1)-999.9 : FLU(1)=999.9 : N=2
FOR I=1 TO N
F(I)=FIX (FLU(I)/100)
FS(I)=RIGHT$(STR$(F(I)),1)
E(I)=FIX (FLU(I)/10)-F(I)*10
ES(I)=RIGHT$(STR$(E(I)),1)
D(I)=FIX (FLU(I))-(F(I)*100)-(E(I)*10)

```

```

DS(I)=RIGHTS(STRS(D(I)),1)
C(I)=FIX (FLU(I)*10)-(F(I)*1000)+(E(I)*100)+(D(I)*10)
CS(I)=RIGHTS(STRS(C(I)),1)
ZS(1)="APMXA"
ZS(2)="APMXB"
AS(I)=ZS(I)+CS(I)+DS(I)+ES(I)+FS(I)
PRINT #10,AS(I):CHR$(0)
NEXT I
GOTO CICLO
ESPERA3:
TIEMPO2=(TIMER-START)+DIAS*86400!
IF TIEMPO2-TIEMPO > INTE THEN TIEMPO=(TIMER-START)+DIAS*86400!
FECHA2S=DATES
IF FECHA2S > FECHAS THEN DIAS=DIAS+1:FECHAS=DATES
VOL=VOL+((TIEMPO2-TIEMPO1)/3600)*FLUJO)
LOCATE 4,4:PRINT USING "EL VOLUMEN PRESENTE DEBE SER #####.## mL (###.##
%)":VOL:(VOL/VF)*100
TIEMPO1=(TIMER-START)+DIAS*86400!
IF VOL > VF THEN GOTO FINAL
GOTO ESPERA3
PANT:
SUB PANTALLA STATIC
WINDOW 1,.(0,20)-(650,480)
CALL TEXTFONT (0)
CALL TEXTSIZE (18)
CALL TEXTFACE (65)
FORECOLOR 409
LOCATE 1,4: PRINT " UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO"
LOCATE 2,11: PRINT "INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA"
LOCATE 3,9: PRINT "DEPARTAMENTO DE BIOINGENIERIA"
FORECOLOR 33
CALL PENSIZE (3,3)
CALL MOVETO (10,70): CALL LINETO (620,70): CALL LINETO (620,450): CALL LINETO (10,450): CALL
LINETO (10,70)
CALL MOVETO (315,70): CALL LINETO (315,450)
CALL MOVETO (10,260): CALL LINETO (620,260)
CALL PENSIZE (2,2)
CALL MOVETO (40,100):CALL LINETO (40,230):CALL LINETO(290,230)
CALL MOVETO (345,100):CALL LINETO (345,230):CALL LINETO(590,230)
CALL MOVETO (40,290):CALL LINETO (40,420):CALL LINETO(290,420)
CALL MOVETO (345,290):CALL LINETO (345,420):CALL LINETO(590,420)
CALL PENSIZE (1,1)
CALL TEXTFONT (1)
CALL TEXTSIZE (10)
CALL TEXTFACE (8)
CALL TEXTSIZE (7)
CALL TEXTFONT (1)
CALL TEXTFACE (0)
LOCATE 11,4: PRINT "100"
LOCATE 24,6: PRINT "0"
LOCATE 11,67: PRINT "9"
LOCATE 24,67: PRINT "5"
LOCATE 30,4: PRINT "100"
LOCATE 43,6: PRINT "0"
LOCATE 30,65: PRINT "100"
LOCATE 43,67: PRINT "0"
CALL TEXTSIZE(10)
END SUB

```

## 9.4. LISTADO DEL PROGRAMA SFI

```

START:
  LIBRARY "TurboDrivers INTERFACE"
  LIBRARY "DATAMANIPULATION INTERFACE"
 CLS
  MENU 2,0,1,"":MENU OFF
  MENU 1,0,1,"MUESTREO"
  MENU 1,1,1,"CALIBRAR":CMDKEY 1,1,"C"
  MENU 1,2,1,"TOMAR MUESTRA":CMDKEY 1,2,"M"
  MENU 1,3,1,"ESPERAR":CMDKEY 1,3,"E"
  MENU 1,4,1,"TERMINAR":CMDKEY 1,4,"T"
  ON MENU GOSUB INTERAC: MENU ON
GOTO BYPASS
PRINC:
  WINDOW 2,"PARAMETROS", (60,40)-(600,470),1
  INPUT "Nombre del Archivo (no repetir nombre ya usado)": ARCHIVOS : PRINT
  INPUT "Intervalo de Adquisición de Datos (seg)":TI : PRINT
  INPUT "Tiempo de la Adquisición (Hrs.):TFH: PRINT
  INPUT "Numero de datos de la correlación (sugerido 5)":NUMDAT:PRINT
  INPUT "Tolerancia para la pendiente (sugerido 0.07)":TSLOPE:PRINT
  INPUT "Tolerancia para la correlación (sugerido 0.8)":TRSC:PRINT
  ASEG=22 ' TIEMPO LLENADO CAMARA DILUCION
  ABSEG=30 ' TIEMPO LLENADO CAMARA ELECTRODO
  BSEG=15 ' TIEMPO ENTRADA MUESTRA PARA DILUIR
  CSEG=0 ' TIEMPO ENTRADA BUFFER PARA DILUIR
  DSEG=35 ' TIEMPO DRENADO CAMARA DILUCION
  LSEG=2 ' TIEMPO ENJUAGADO
  MSEG=5 ' TIEMPO MEZCLADO
  WINDOW CLOSE 2
CONSTANTES:
  TF=TFH*3600
  NP=TF/TI
  DIM value%(15):DIM valuef(15)
  DIM DOP:(NP+10):DIM TRHP:(NP-10)
  ER%=0:slot%=1:value%(0)=0:LSB=10000/4096
  FOR bit%=0 TO 7
    CALL setDoutbit (bit%,1,slot%,VARPTR(ER%))
  NEXT bit%
  ARCHIVO1$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:" + ARCHIVOS + ".D0"
  ARCHIVO2$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:" + ARCHIVOS + ".TR"
  CON1=1
  CON2=1
  E2! = 0
  E3! = 0
  IF NP = 400 THEN COMP%=0
  IF NP < 400 THEN COMP%=400/NP*(-1)
  IF NP > 400 THEN COMP%=NP/400
  OPEN "O":#1,ARCHIVO1$: CLOSE #1
  OPEN "O":#2,ARCHIVO2$: CLOSE #2
  CALL PANTALLA
INICIO:
  TIEMPO=TIMER
  FECHAS=DATES
  DIAS=0
  TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400)
  TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400)
CICLO:
  IF FECHAS<=DATES THEN DIAS=DIAS+1
  FECHAS=DATES
  TRH=((TIMER-TIEMPO)/DIAS*86400)/3600
  IF CON2=1 THEN TRH1=TRH
  setad 0, 1, slot%,VARPTR(ER%)
  cread 0, 0, VARPTR(value%(0)), slot%, VARPTR(ER%)
  IF ER%<>0 THEN GOTO ErrorReport

```

```

CALL ITOS (VARPTR (value%(0)),VARPTR (value!(0)),0,7)
DO!=(value!(0)*LSB)
FORECOLOR 33:LOCATE 10,5:PRINT USING "Lectura (mV):###.##":DO!
FORECOLOR 137:LOCATE 33,30 :PRINT USING "Tiempo Transcurrido = ###.## Hrs":TRH:FORECOLOR 33
DOS!-DO!-DOS!:DOP!(CON1)-DOS!-CON2
FORECOLOR 33:LOCATE 4,80:PRINT DATES:LOCATE 5,80:PRINT TIMES
TRH2=TRH
TRHP!(CON1)=(TRH1-TRH2)/2
CALL PLOT (1,150,400,100,VARPTR (DOP!(0)),5000,0,CON1,COMP%,0,11,0)
CON2=CON2-1
LOCATE 2,2 :PRINT CON1
TIEMPO3=TIMER-(DIAS*86400!)
IF MOUSE(0) <= 0 THEN CALL PANTALLA
IF TRHP!(CON1) > TF/3600 THEN GOTO FINAL
IF TIEMPO3-TIEMPO1 >= TII THEN GOTO SALVAR
GOTO CICLO

SALVAR:
OPEN "A",#1,ARCHIVO1S:OPEN "A",#2,ARCHIVO2S
WRITE #1, DOP!(CON1):WRITE #2, TRHP!(CON1)
CLOSE #1: CLOSE #2
CON1=CON1+1
CON2=1
TIEMPO1=TIMER-(DIAS*86400!)
DOS!-0
GOTO CICLO

INTERAC:
NUMMENU=MENU(0): IF NUMMENU <= 1 THEN RETURN
ARTMENU=MENU(1)
ON ARTMENU GOSUB CALIB, SAMPLE, STANDBY, TERMINAR
RETURN

CALIB:
PRINT "FALTA ESTA RUTINA"
RETURN

SAMPLE:
FOR bit%=0 TO 7
CALL setDoutbit (bit%,1,slot%,VARPTR(ER%))
NEXT bit%
'LLENADO DE LA CAMARA DE DILUCION CON BUFFER
LOCATE 10,25:PRINT "LLENANDO CAMARA DILUCION (BUFFER)"
PULSO1=TIMER-(DIAS*86400!)
CALL setDoutbit (0,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO1:
PULSO2=TIMER-(DIAS*86400!)
IF PULSO2-PULSO1 < ASEG THEN GOTO PASO1
CALL setDoutbit (0,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
'LLENADO DE LA CAMARA DEL ELECTRODO CON BUFFER
LOCATE 10,25:PRINT "LLENANDO CAMARA ELECTRODO (BUFFER)"
PULSO1=TIMER-(DIAS*86400!)
CALL setDoutbit (6,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO1B:
PULSO2=TIMER-(DIAS*86400!)
IF PULSO2-PULSO1 < ABSEG THEN GOTO PASO1B
CALL setDoutbit (6,1,slot%,VARPTR(ER%))
CTEM=CON1
CALL ESTABILIZACION (CON1,NP,TIEMPO0,DIAS,FECHAS,ARCHIVO1S, ARCHIVO2S, NUMDAT, TII, BI)
VALOR(1)=B!
OPEN "I", #3, ARCHIVO1S
FOR I=CON1 TO CTEM STEP -1
INPUT # 3, DOP!(I)
NEXT I
CLOSE #3
CTEM=0
'DRENADO DE LA CAMARA DE DILUCION
LOCATE 10,25:PRINT "DRENADO CAMARA DILUCION

```

```

PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (3,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO2:
PULSO2=TIMER-(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < DSEG THEN GOTO PASO2
CALL setDoutbit (3,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
'ENTRADA DE MUESTRA EN LA CAMARA DE MEZCLADO
LOCATE 10,25:PRINT "LLENANDO CAMARA DILUCION (MUESTRA)"
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (1,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO3:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < BSEG THEN GOTO PASO3
CALL setDoutbit (1,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
'ENTRADA DE BUFFER EN LA CAMARA DE MEZCLADO
LOCATE 10,25:PRINT "LLENANDO CAMARA DILUCION (BUFFER)"
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (0,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO4:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < CSEG THEN GOTO PASO4
CALL setDoutbit (0,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
'MEZCLADO DE MUESTRA+BUFFER
LOCATE 11,25:PRINT "MEZCLANDO"
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
PASO5:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < MSEG THEN GOTO PASO5
LOCATE 11,25:PRINT "
'ENTRADA DE MEZCLA A LA CAMARA DEL ELECTRODO
LOCATE 10,25:PRINT "LLENANDO CAMARA ELECTRODO (MUESTRA+BUFFER)"
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (5,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO6:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < ABSEG THEN GOTO PASO6
CALL setDoutbit (6,1,slot%,VARPTR(ER%))
CTEM=CON1
CALL ESTABILIZACION (CON1,NP,TIEMPOO,DIAS,FECHAS, ARCHIVO1$, ARCHIVO2$, NUMDAT, TII, BI)
VALOR!(2)=BI
OPEN "I", #3, ARCHIVO1$
FOR I=CON1 TO CTEM STEP -1
INPUT # 3, DOP!(I)
NEXT I
CLOSE #3
CTEM=0
VOLTAJEI=VALOR!(1)-VALOR!(2)
LOCATE 12,25:PRINT VALOR!(1),VALOR!(2),VOLTAJEI
'DRENADO DE LA CAMARA DE DILUCION
LOCATE 10,25:PRINT "DRENANDO CAMARA DILUCION"
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (3,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO7:
PULSO2=TIMER-(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < DSEG THEN GOTO PASO7
CALL setDoutbit (3,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
'LAVADO DE LA CAMARA DE DILUCION
LOCATE 10,25:PRINT "ENJUAGANDO CAMARA DILUCION"

```

```

PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (0,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO8:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < LSEG THEN GOTO PASO8
CALL setDoutbit (0,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
PASO9:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < MSEG THEN GOTO PASO9
'LAVADO CAMARA DEL ELECTRODO
LOCATE 10,25:PRINT *ENJUAGANDO CAMARA ELECTRODO*
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (3,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO10:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < DSEG THEN GOTO PASO10
CALL setDoutbit (3,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
'LLENADO DE LA CAMARA DE DILUCION CON BUFFER
LOCATE 10,25:PRINT *LLENANDO CAMARA DILUCION (BUFFER)*
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (0,0,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO1C:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < ASEG THEN GOTO PASO1C
CALL setDoutbit (0,1,slot%,VARPTR(ER%))
CALL setDoutbit (4,1,slot%,VARPTR(ER%))
'LLENADO DE LA CAMARA DEL ELECTRODO CON BUFFER
LOCATE 10,25:PRINT *LLENANDO CAMARA ELECTRODO (BUFFER)*
PULSO1=TIMER+(DIAS*86400)
CALL setDoutbit (6,0,slot%,VARPTR(ER%))
PASO1D:
PULSO2=TIMER+(DIAS*86400)
IF PULSO2-PULSO1 < ABSEG THEN GOTO PASO1D
CALL setDoutbit (6,1,slot%,VARPTR(ER%))

BEEP
RETURN
SUB ESTABILIZACION (CON1, NP, TIEMPO0,DIAS,FECHAS,ARCHIVO1$, ARCHIVO2$, NUMDAT, TILB) STATIC
IF FLAG=1 GOTO SKFL
FLAG=1
LIBRARY "TurboDrivers INTERFACE"
LIBRARY "DATAMANIPULATION INTERFACE"
DIM value%(15):DIM value!(15):DIM X(20):DIM Y(20)
DIM DOP!(NP+10):DIM TRHP(NP+10)
SKFL:
ER%=0:slot%=1:value%(0)=0:LSB=10000/4096:value!(0)=0:CON2=1:CONA=1:DOS1=0
TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400)
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400)
TRH1=((TIMER-TIEMPO0)+DIAS*86400&)/3600
CICLOEST:
IF FECHAS<DATES THEN DIAS=DIAS+1
FECHAS=DATES
TRH=((TIMER-TIEMPO0)+DIAS*86400&)/3600
IF CON2=1 THEN TRH1=TRH
LOCATE 11,25:PRINT *ESTABILIZANDO*
CALL setad (0, 1, slot%,VARPTR(ER%))
CALL cread (0, 0, VARPTR(value%(0)), slot%, VARPTR(ER%))
IF ER%<>0 THEN GOTO ErrorReport
CALL ITOS (VARPTR (value%(0)),VARPTR (value!(0)),0.7)
DOI=(value!(0)*LSB)
FORECOLOR 33:LOCATE 10,5:PRINT USING "Lectura (mV):####.##":DOI

```

```

FORECOLOR 137:LOCATE 33,30 :PRINT USING "Tiempo Transcurrido = ###.## Hrs";TRH:FORECOLOR 33
DOS1=DOS1+DOS1:DOP1(CON1)=DOS1/CON2
FORECOLOR 33:LOCATE 4,80:PRINT DATES:LOCATE 5,80:PRINT TIMES
TRH2=TRH
TRHP1(CON1)=(TRH1+TRH2)/2
'CALL PLOT (1,150,400,100,VARPTR (DOP1(0)),5000,0,CON1,COMP%,0,11,0)
CON2=CON2-1
LOCATE 2,2 :PRINT CON1
IF MOUSE(0) < 0 THEN CALL PANTALLA
IF CONA < NUMDAT+1 THEN GOTO SKIP
IF DOP1(CON1) <= 0 THEN GOTO SKIP
FOR I=NUMDAT+1 TO 2 STEP -1
  X1(I)=((TRHP1(CON1-I)-TRHP1(CON1-NUMDAT))*3600)
  Y1(I)=(DOP1(CON1-I)*2)
  SUMX1=SUMX1+X1(I)
  SUMY1=SUMY1+Y1(I)
  SUMXY1=SUMXY1+(X1(I)*Y1(I))
  SUMX21=SUMX21+X1(I)^2
  SUMY21=SUMY21+Y1(I)^2
NEXT I
M1=(NUMDAT1*SUMXY1-SUMX1*SUMY1)/(NUMDAT1*SUMX21-(SUMX1)^2)
B1=((SUMY1*SUMX21)-(SUMX1*SUMY1))/((NUMDAT1*SUMX21)-(SUMX1)^2)
'R1=(((NUMDAT1*SUMXY1)-(SUMX1*SUMY1))/(SQRT((NUMDAT1*SUMX21)-((SUMX1)^2)))*((NUMDAT1*SUMY21)-
((SUMY1)^2))))
'LOCATE 10,25:PRINT USING "Pendiente: ##.#####";M1
'LOCATE 10,42:PRINT USING "b:#####";B1
'LOCATE 10,55:PRINT USING "r:##.#####";R1
  SUMX1=0
  SUMY1=0
  SUMXY1=0
  SUMX21=0
  SUMY21=0
  IF ABS(M1) <= TSLOPE1 THEN GOTO ESTABLE ' AND ABS(R1) > TRSQ1
SKIP:
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400)
IF TIEMPO3-TIEMPO1 >= T1 THEN GOTO SALVAREST
GOTO CICLOEST
SALVAREST:
  CLOSE #1: CLOSE #2
  OPEN "A",#1,ARCHIVO1$:OPEN "A",#2,ARCHIVO2$
  WRITE #1, DOP1(CON1):WRITE #2, TRHP1(CON1)
  CLOSE #1: CLOSE #2
  CON1=CON1+1
  CONA=CONA+1
  CON2=1
  TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400)
  DOS1=0
  TRH1=((TIMER-TIEMPO0)+DIAS*86400&)/3600
  GOTO CICLOEST
ESTABLE:
  LOCATE 11,25:PRINT "ESTABLE
  VALORMV1=B1
END SUB
STANDBY:
  WINDOW 5,,(215,100)-(420,300),2
  CALL TEXTFACE (1)
  PRINT
  PRINT " El sistema se ha detenido"
  PRINT
  PRINT " momentaneamente"
  CALL TEXTFACE (0)
  BUTTON 1,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
  R%(0)=175
  R%(1)=5
  R%(2)=190
  R%(3)=200

```

```

        InSetRect R%(0),-4,-4
        PENSIZE 3,3
        FRAMEROUNDRECT VARPTR(R%(0)),16,16
        PENNORMAL
    DIALOGO=DIALOG(0)
    WHILE DIALOGO<=1 AND DIALOGO<=6
        DIALOGO=DIALOG(0)
    WEND
    INVERTROUNDRECT VARPTR(R%(0)),16,16
    CLS: WINDOW CLOSE 5: CALL PANTALLA
    RETURN
TERMINAR:
    BEEP
    WINDOW 7,,(215,100)-(420,300),2
    PRINT
    CALL TEXTFACE (1)
    PRINT * ¿ REALMENTE DESEA*
    PRINT * TERMINAR ? *
    CALL TEXTFACE (0)
    BUTTON 1,1,"Terminar", (5,135)-(200,150),1
    BUTTON 2,1,"Continuar", (5,175)-(200,190),1
        R%(0)=175
        R%(1)=5
        R%(2)=190
        R%(3)=200
        InSetRect R%(0),-4,-4
        PENSIZE 3,3
        FRAMEROUNDRECT VARPTR(R%(0)),16,16
        PENNORMAL
    DIALOGO=DIALOG(0)
    WHILE DIALOGO<=1 AND DIALOGO<=6
        DIALOGO=DIALOG(0)
    WEND
    INVERTROUNDRECT VARPTR(R%(0)),16,16
    BOTON=DIALOG(1)
    IF BOTON=1 THEN SYSTEM
    IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 7: CALL PANTALLA
    RETURN
FINAL:
    WINDOW 3,,(215,100)-(420,300),2
    BEEP : BEEP : BEEP : BEEP
    CALL TEXTFACE (1)
    PRINT
    PRINT "EL TIEMPO DE ADQUISICION"
    PRINT
    PRINT * HA TERMINADO*
    CALL TEXTFACE (0)
    BUTTON 1,1,"CONTINUAR", (20,145)-(180,160),1
    BUTTON 2,1,"TERMINAR", (20,175)-(180,190),1
        R%(0)=175
        R%(1)=20
        R%(2)=190
        R%(3)=180
        InSetRect R%(0),-4,-4
        PENSIZE 3,3
        FRAMEROUNDRECT VARPTR(R%(0)),16,16
        PENNORMAL
    DIALOGO=DIALOG(0)
    WHILE DIALOGO<=1 AND DIALOGO<=6
        DIALOGO=DIALOG(0)
    WEND
    INVERTROUNDRECT VARPTR(R%(0)),16,16
    BOTON=DIALOG(1)
    IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: SYSTEM
    IF BOTON=1 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: CALL PANTALLA: GOTO EXTRA
EXTRA:

```

```

WINDOW 8,,(215,100)-(420,300),2
PRINT * Tiempo Adicional de *
PRINT * Fermentación*
PRINT USING "(No Exceder de ###.## Hrs.);TF/3600
INPUT TA
TF = TF + TA
NP = TF/TA
CON1 = 1
CON2 = 1
WINDOW CLOSE 8
CALL PANTALLA
GOTO INICIO
PANT:
SUB PANTALLA STATIC
WINDOW 1,,(0,20)-(650,480)
CALL TEXTFONT (0)
CALL TEXTSIZE (18)
CALL TEXTFACE (65)
FORECOLOR 409
LOCATE 1,4: PRINT * UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO*
LOCATE 2,11: PRINT *INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA*
LOCATE 3,9: PRINT *DEPARTAMENTO DE BIOINGENIERIA*
FORECOLOR 33
CALL PENSIZ (3,3)
CALL MOVETO (10,70): CALL LINETO (620,70): CALL LINETO (620,450): CALL LINETO (10,450): CALL LINETO
(10,70)
CALL PENSIZ (2,2)
CALL MOVETO (100,150):CALL LINETO (100,400):CALL LINETO(500,400)
CALL PENSIZ (1,1)
CALL TEXTFONT (1)
CALL TEXTSIZE (15)
CALL TEXTFACE (65)
LOCATE 5,19:PRINT*ANALIZADOR DE DBO*
CALL TEXTSIZE (7)
CALL TEXTFONT (1)
CALL TEXTFACE (0)
LOCATE 16,18: PRINT *5000*
LOCATE 40,19: PRINT *0*
CALL TEXTSIZE(10)
END SUB
BYPASS:
ARCHIVOS=*ART*: TI=1: TFH=.2:NUMDAT1=.5: TSLOPE!=.07:TRSQ=.8
ASEG=2:BSEG=0:CSEG=2:DSEG=2:LSEG=2:MSEG=2

GOTO CONSTANTES

```

## 9.5. LISTADO DEL PROGRAMA DE SIMULACION

```

program Constantes;
{SI-}
{SR+}
{SS+}
{SR IOSelection,rsrc}
{SU IOSelection}
{SU DifferentialEquat}
uses
  MemTypes, QuickDraw, OSIntf, ToolIntf, PackIntf, PasPrinter,
  {SS SecondSegment}
  DifferentialEquat, IOSelection;
var
  NumEquations : Integer;      { Numero de ecuaciones de primer orden }
  LowerLimit : Extended;      { limite inferior del intervalo }
  UpperLimit : Extended;      { limite superior del intervalo }
  InitialValues : TNvector;   { valores iniciales en el limite inferior }
  NumReturn : Integer;        { numero de valores }
  NumIntervals : Integer;     { numero de intervalos }
  SolutionValues : TNmatrix;
  Error : byte;
  FuncVect : FuncVector;
  D : Extended;
  So : Extended;
  i : integer;
  j : integer;
  k : integer;
  l : integer;
  m : integer;
  Numval : integer;
  Tiempo : array [1..100] of Extended;
  DCO : array [1..100] of Extended;
  SSV : array [1..100] of Extended;
  valMumax : array [1..100] of Extended;
  valKs : array [1..100] of Extended;
  valKd : array [1..100] of Extended;
  valY : array [1..100] of Extended;
  minMumax : Extended;
  maxMumax : Extended;
  numvalMumax : integer;
  minKs : Extended;
  maxKs : Extended;
  numvalKs : integer;
  minKd : Extended;
  maxKd : Extended;
  numvalKd : integer;
  minY : Extended;
  maxY : Extended;
  numvalY : integer;
  Mumax : Extended;
  Ks : Extended;
  Kd : Extended;
  Y : Extended;
  Intervalo : Extended;
  ecm1 : Extended;
  ecm2 : Extended;
  secm1 : Extended;
  secm2 : Extended;
  datos : Text;
function TNTargetF1(V : TNvector) : Extended;
begin
  TNTargetF1 := ((Mumax * V[2] / (Ks + V[2])) + Kd - D) * V[1];
end; { function TNTargetF1 }
{SS ThirdSegment}

```

```

function TNTargetF2(V : TNvector) : Extended;
begin
  TNTargetF2 := D * (So - V[2]) - ((Mumax * V[2] / (Ks - V[2])) * V[1] / Y);
end; { function TNTargetF2 }
procedure GetConstants ( var Numval      : Integer;
                        var D            : Extended;
                        var So           : Extended;
                        var NumIntervals : Integer);

begin; {procedure Constantes}
writeln ('Programa para calcular constantes cinéticas para cultivo exponencialmente alimentado');
writeln;
writeln;
write ('Dilución ? ');
readln(D);
writeln;
write ('DQO en alimentación ? ');
readln(So);
writeln;
writeln;
writeln ('Entrada de Valores Experimentales:');
writeln;
write ('numero de valores ? ');
readln(Numval);
writeln;
  for i:=1 to Numval do
    begin
      write ('Tiempo ' ,i,' ');
      readln(Tiempo[i]);
      write ('DQO ' ,i,' ');
      readln(DQO[i]);
      write ('SSV ' ,i,' ');
      readln(SSV[i]);
      writeln;
    end;
  writeln;
  writeln;
  write ('Estimado mínimo para  $\mu_{max}$  ? ');
  readln(minMumax);
  writeln;
  write ('Estimado máximo para  $\mu_{max}$  ? ');
  readln(maxMumax);
  writeln;
  write ('numero de valores para  $\mu_{max}$  ? ');
  readln(numvalMumax);
  valMumax[1]:= minMumax;

  intervalo := (maxMumax - minMumax) / (numvalMumax - 1);
  for j:=2 to numvalMumax do valMumax[j] := valMumax[j-1] + intervalo;
  writeln;
  writeln;
  write ('Estimado mínimo para Ks ? ');
  readln(minKs);
  writeln;
  write ('Estimado máximo para Ks ? ');
  readln(maxKs);
  writeln;
  write ('numero de valores para Ks ? ');
  readln(numvalKs);
  valKs[1]:= minKs;

  intervalo := (maxKs - minKs) / (numvalKs - 1);
  for k:=2 to numvalKs do valKs[k] := valKs[k-1] + intervalo;
  writeln;
  writeln;
  write ('Estimado mínimo para Kd ? ');
  readln(minKd);
  writeln;

```

```

write ('Estimado máximo para Kd ? ');
readln(maxKd);
writeln;
write ('numero de valores para Kd ? ');
readln(numvalKd);
valKd[1]:= minKd;
Intervalo := (maxKd - minKd) / (numvalKd - 1);
for l:=2 to numvalKd do valKd[l] := valKd[l-1] + Intervalo;
writeln;
writeln;
write ('Estimado mínimo para Y ? ');
readln(minY);
writeln;
write ('Estimado máximo para Y ? ');
readln(maxY);
writeln;
write ('numero de valores para Y ? ');
readln(numvalY);
valY[1]:= minY;
Intervalo := (maxY - minY) / (numvalY - 1);
for m:=2 to numvalY do valY[m] := valY[m-1] + Intervalo;
writeln;
writeln;
write ('Número de intervalos de integración ? ');
readln(NumIntervals);
end; { procedimiento Constantes }
procedure Initialize(var j : integer;
                    var k : integer;
                    var l : integer;
                    var m : integer;
                    var NumEquations : integer;
                    var LowerLimit : Extended;
                    var UpperLimit : Extended;
                    var InitialValue : TNvector;
                    var NumReturn : integer;
                    var Error : byte;
                    var Mumax : Extended;
                    var Ks : Extended;
                    var Kd : Extended;
                    var Y : Extended);
begin
Mumax:=valMumax[j];
Ks:= valKs[k];
Kd:= valKd[l];
Y:= valY[m];
NumEquations := 2;
LowerLimit := 0;
UpperLimit := 0;
FillChar(InitialValue, SizeOf(InitialValue), 0);
NumReturn := 1;
Error := 0;
FuncVect[1] := @TNTargetF1;
FuncVect[2] := @TNTargetF2;
end; { procedimiento Initialize }
procedure GetData(var LowerLimit : Extended;
                  var UpperLimit : Extended;
                  var InitialValues : TNvector);
procedure GetLimits(var LowerLimit : Extended;
                   var UpperLimit : Extended);
begin
LowerLimit := Tiempo[1];
UpperLimit := Tiempo[j];
end; { procedimiento GetLimits }
procedure GetInitialValues(var LowerLimit : Extended;
                           var InitialValues : TNvector);
begin

```

```

InitialValues[0] := LowerLimit;
InitialValues[1] := SSV[1];
InitialValues[2] := DCO[1];
end; { procedure GetInitialValues }
begin { procedure GetData }
  GetLimits(LowerLimit, UpperLimit);
  GetInitialValues(LowerLimit, InitialValues);
end; { procedure GetData }
begin { program Constantes }
  GetConstants(Numval, D, So, NumIntervals);
  rewrite (datos,'datos.dat');
  writeln ('umax Ks Kd Y ecm1 ecm2');
  writeln (datos,'umax Ks Kd Y ecm1 ecm2');
  for j:= 1 to numvalMumax do
    begin
      for k:= 1 to numvalKs do
        begin
          for l:= 1 to numvalKd do
            begin
              for m:= 1 to numvalY do
                begin
                  for l:=2 to Numval do
                    begin
                      Initialize(j, k, l, m, NumEquations, LowerLimit, UpperLimit, InitialValues,
                        NumReturn, Error, Mumax, Ks, Kd, Y);
                      GetData( LowerLimit, UpperLimit, InitialValues);
                      InicialConditionSystem(NumEquations, LowerLimit, UpperLimit,
                        InitialValues, NumReturn, NumIntervals,
                        SolutionValues, Error, FuncVect);
                      ecm1 := Sqr (SSV[j] - SolutionValues[1,1]);
                      ecm2 := Sqr (DCO[j] - SolutionValues[1,2]);
                      secm1 := secm1 + ecm1;
                      secm2 := secm2 + ecm2;
                      ecm1 := 0;
                      ecm2 := 0;
                    end;
                  secm1 := Sqrt (secm1);
                  secm2 := Sqrt (secm2);
                  writeln (valMumax[j] :4:4, ' ', valKs[k] :4:4, ' ', valKd[l] :4:4, ' ',
                    valY[m] :4:4, ' ', secm1:4:4, ' ', secm2:4:4);
                  writeln (datos,valMumax[j] :4:4, ' ', valKs[k] :4:4, ' ', valKd[l] :4:4, ' ',
                    valY[m] :4:4, ' ', secm1:4:4, ' ', secm2:4:4);
                end;
              secm1 := 0;
              secm2 := 0;
            end;
          end;
        end;
      end;
    end;
  Close (datos);
  WaitReturnOrClick;
end. { program ConstantesLodos }

```