

EVOLUCIÓN DE UN SISTEMA DE LODOS ACTIVOS SIN APORTE DE ALIMENTACIÓN

María Dolores Coello Oviedo, Diego Sales Márquez y José María Quiroga Alonso

Resumen:

En el presente trabajo se ha estudiado el comportamiento de una unidad de lodos activos durante un periodo de tiempo de 21 días durante los cuales no se realizó aporte alguno de materia orgánica al sistema. Se ha observado un descenso en la biomasa presente en el reactor, el cual puede estar relacionado con la degradación de los componentes intracelulares como consecuencia del metabolismo endógeno, así como con la disminución producida en el valor de los sólidos durante los cuatro primeros días. La degradación de los lodos durante el tiempo en que se lleva a cabo el ensayo, produce un descenso de la actividad respiratoria y enzimática de los microorganismos presentes en el sistema.

Palabras clave: Lodos activos, actividad enzimática, tasa de respiración, biodegradación.

INTRODUCCIÓN

La biomasa que constituye la unidad de los lodos activos está constituida por una mezcla compleja de microorganismos, parte de los cuales son separados en el clarificador secundario y posteriormente eliminados mediante diferentes tecnologías. Dado el elevado volumen de fangos que se producen en este tipo de sistemas, existe una necesidad, tanto económica como ecológica, de conseguir una reducción de la producción de lodos debido al costoso y complejo tratamiento que estos implican.

Diferentes autores (Kjelleberg et al., 1987; Roszak et al., 1987) han demostrado que las bacterias acuáticas pueden sobrevivir en condiciones de escasez de alimento, lo que parece estar controlado por distintos parámetros tales como: presencia de polímeros, estructura de la envuelta celular, periodo de preadaptación o condiciones ambientales tales como la temperatura. Esto es debido a que las

bacterias en condiciones de limitación de sustrato bien mueren, bien provocan la lisis de sus células o bien las poblaciones se adaptan a las condiciones establecidas persistiendo sólo las más resistentes.

Teniendo esto en cuenta, algunos autores (Jenkins et al., 1989; Matin, 1979) han estudiado la posibilidad de someter a los lodos a una etapa previa de ausencia de alimento antes de enviarlos al digestor de lodos. En esta etapa previa, se produciría una reducción de los lodos producidos como consecuencia de los fenómenos descritos en el párrafo anterior. En este sentido, los trabajos realizados por diferentes autores (Gaudy et al., 1970; Reddy et al., 1983) mostraron que mantener los lodos en condiciones aerobias en la cuba de fangos activos sin adición de alimentos, y antes de enviarlos al digestor de lodos, no sólo no modifica la eficacia del proceso en dicha cuba sino que no se generan nuevos lodos. Esto provoca un descenso en la masa seca y un importante descenso de la actividad enzi-

Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Facultad de Ciencias del Mar. Polígono Río San Pedro. Apartado 40. 11510 Puerto Real, Cádiz. Telf.: 956016158. Fax: 956016040. E-mail: dolores@uca.es

Artículo recibido el 6 de septiembre de 2000, recibido en forma revisada el 14 de diciembre de 2000 y el 3 de septiembre de 2001 y aceptado para su publicación el 30 de octubre de 2001. Pueden ser remitidas discusiones sobre el artículo hasta seis meses después de la publicación del mismo siguiendo lo indicado en las "Instrucciones para autores". En el caso de ser aceptadas, éstas serán publicadas conjuntamente con la respuesta de los autores.

mática, así como una liberación al medio de moléculas orgánicas (biodegradables o no degradables).

Son escasas las investigaciones en donde se estudian la secuencia que siguen las distintas poblaciones presentes en el tanque de aireación o la disminución de la actividad microbiana que tiene lugar ante la falta de alimentación. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el comportamiento de una unidad de lodos activos a escala de laboratorio ante la ausencia de alimentación, mediante el seguimiento de diferentes variables tanto físico-químicas como microbiológicas o enzimáticas y que permitan conocer la secuencia que siguen las poblaciones en el sistema, así como las variaciones de la actividad microbiana que en él tienen lugar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones experimentales

Para realizar los ensayos se ha utilizado un reactor de 6 litros de capacidad al que se añadieron 5 L de lodos activos procedentes de la unidad de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Jerez de la Frontera (Cádiz, España). La aireación al sistema fue suministrada mediante un compresor de aire Tagus 200 a la velocidad de 4 L/min. La transferencia de aire al medio se realizó a través de difusores porosos fabricados en acero inoxidable, los cuales permiten obtener un adecuado fraccionamiento de la corriente de salida en burbujas de pequeño tamaño, favoreciendo la transferencia de oxígeno al medio y evitando las condiciones de oxígeno limitantes.

El reactor se mantuvo a temperatura ambiente (24 ± 2 °C), y diariamente se midió el pH así como la concentración de oxígeno disuelto presente en el mismo.

Durante todos los días que duró el ensayo se tomó un volumen de muestra de 100 mL para el análisis de las variables estudiadas.

Técnicas analíticas empleadas

Identificación de microorganismos

Para la realización del análisis cualitativo de la población microbiológica existente en el reactor, se realizaron observaciones al microscopio óptico. Las muestras se tomaron con una micropipeta, utilizando el objetivo de $\times 100$ para el recuento de cilios y

metazoos y el objetivo de $\times 400$ para el grupo de flagelados. Los cilios se identificaron siguiendo las claves de Curds (1982) y Curds *et al.* (1983). Otros protozoos se identificaron utilizando las claves de Baldwin and Chandler (1966) y Lee *et al.* (1985).

Determinación de los Sólidos en Suspensión y Demanda Química de Oxígeno

La determinación de los Sólidos en Suspensión en sus distintas formas (sólidos totales en suspensión, STS; sólidos volátiles en suspensión, SVS; sólidos no volátiles en suspensión, SNVS) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) se realizó según las indicaciones de los Métodos Normalizados (APHA, AWWA; WPCF, 1989).

Determinación de la actividad bioquímica de los lodos

Recuento de células activas y totales

El control de la población bacteriana (células activas y totales) presente en el reactor se realizó siguiendo las especificaciones del método propuesto por Griebe *et al.* (1997), el cual se basa en el uso combinado de dos fluorocromos: CTC (cloruro de 5 ciano, 2,3, ditolil tetrazolium) utilizado para la determinación de los microorganismos activos y DAPI (dicloruro de 4,6-diamidino-2-fenilindol), para los microorganismos totales.

Brevemente, el método consiste en incubar las muestras de lodos activos con la sal de tetrazolium, CTC, a una concentración 4 mM, durante un intervalo de tiempo de dos horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. Al cabo de este tiempo, la reacción se interrumpe mediante la adición de 1 mL de formol al 37%.

A continuación, y debido a la forma de crecimiento que poseen las bacterias en los lodos activos, la muestra se introducía en un baño de ultrasonidos (ULTRASONS-H, Selecta de 6 L de capacidad) durante un intervalo de tiempo de 15 minutos, con el fin de destruir todos los flóculos bacterianos existentes en la muestra y realizar el recuento de una manera eficaz y fiable.

Posteriormente, a las muestras se les realizaban las diluciones necesarias para llegar a una concentración de células adecuada para ser contadas, entre 10^{-2} y 10^{-6} . El medio de dilución utilizado fue agua Milli Q- filtrada a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ y estéril. A la muestra diluida se le añadía DAPI (10

µg/mL), y se dejaba incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante un intervalo de tiempo de 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las bacterias teñidas por ambos fluorocromos se recogían por microfiltración a través de una membrana negro de policarbonato de 0,2 µm de tamaño de poro (Millipore GTBP, Ireland). Los filtros se secaban al aire y se montaban con aceite de inmersión de baja fluorescencia (Laboratorios Cargille, Inc) sobre un portaobjetos de cristal. El recuento al microscopio se efectuó por triplicado según el trabajo de Schaule et al. (1993).

Tasa específica de respiración (SOUR)

La tasa específica de respiración se realizó por triplicado utilizando un electrodo de membrana. El procedimiento seguido ha sido el siguiente: 50 ml de muestra se introdujeron en un frasco provisto de un agitador magnético en su interior para facilitar la total homogeneización de la muestra. A continuación se introdujo un electrodo de oxígeno (Mod CRISON OXI330), protegiendo el contenido de la botella de la atmósfera por medio de un tapón de rosca sellado con silicona, de forma que se evitara la transferencia de oxígeno hacia la muestra. Los valores de oxígeno disuelto se registran desde que se estabiliza la lectura hasta que éste alcanzó un valor de 1 mg/l.

Para el cálculo de la tasa de consumo se representa el tiempo frente a las lecturas de oxígeno disuelto (mg/l), y se determina la pendiente de la recta de ajuste óptimo. Esta inclinación representa la tasa de consumo de oxígeno en miligramos por litro y minuto.

Para calcular la tasa específica de respiración se hace uso de la expresión de Awong *et al.*, (1985):
Donde :

$$SOUR = \frac{1440 \times R}{C} \quad (1)$$

SOUR=Tasa Específica de Respiración (mgO₂/gSVS·d)
R=Tasa de consumo de oxígeno (mgO₂/l·min)
C=Concentración de biomasa de la muestra(gSVS/l)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición inicial de los lodos

La composición inicial de los lodos aparece en la Tabla 1. En ella se puede observar que los sólidos

volátiles en suspensión se sitúan en un valor de 1.97 g/l, que representa el 75 % de los sólidos totales en suspensión presentes en el reactor. Estos valores están en concordancia con los que se suelen encontrar en la bibliografía para los sistemas de lodos activos (Metcalf & Eddy, 1981)

PARÁMETROS	VALOR
STS (g/L)	2.56
SVS (g/L)	1.97
Nº Células Totales (cel/mL)	3·10 ⁹
Nº Células Activas (cel/mL)	1.3·10 ⁹
OUR (mgO ₂ /L·min)	0.4
SOUR (mgO ₂ /g SVS·d)	292.4
OD (mgO ₂ /L)	3

Tabla 1. Composición inicial de los lodos

Los valores de tasa de respiración, OUR, (0.4 mg O₂/L·min) y tasa específica de respiración, SOUR, (292.4 mgO₂/gSVS·d) también son indicativos de un buen estado de la población microbiana del sistema. De la población total existente en el reactor al inicio del ensayo, 3·10⁹ células/mL, el 43,4 % de la misma corresponde a población activa.

Comportamiento de las variables de control

Durante los 21 días que duró el ensayo en el reactor ha tenido lugar un descenso continuado de sólidos totales en suspensión hasta un valor del 75 % del inicial, tal y como se observa en la Figura 1.

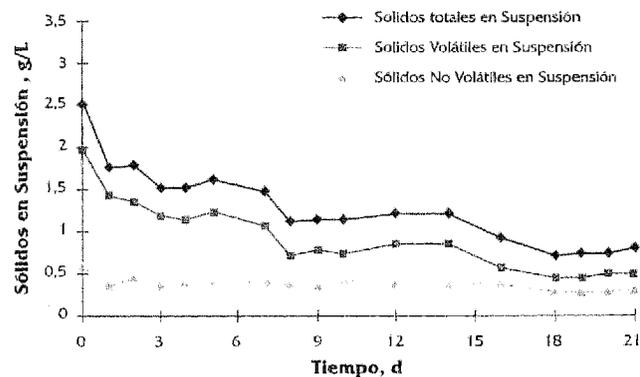


Figura 1. Evolución de los sólidos en suspensión contenidos en el reactor a lo largo del ensayo

En ella se distinguen tres zonas bien diferenciadas. La primera hasta el cuarto día y en la que se produce el mayor descenso del valor de la variable. Este descenso, que fue seguido además por controles al microscopio óptico, estuvo causado por la muerte de rotíferos y nematodos, como consecuencia de la falta de materia orgánica disponible en el reactor. A continuación, en el intervalo de tiempo comprendi-

do entre los días quinto y décimo, se vuelve a producir un descenso aunque menos acusado. En la última fase, que ocupa los últimos diez días, la disminución de la concentración de sólidos volátiles en suspensión es ya muy lenta, obteniéndose una pendiente muy inferior a la de las etapas anteriores.

Este descenso en el valor de los sólidos totales en suspensión está provocado por el descenso de los sólidos volátiles en suspensión, ya que como se observa en la Figura 1, los sólidos no volátiles en suspensión permanecen prácticamente constantes. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores (Gaudy *et al.*, 1970 ; Reddy *et al.*, 1983) que observaron un descenso en la masa seca en el reactor durante los ensayos en ausencia de alimentación.

La velocidad con la que los sólidos totales en suspensión (STS) desaparecen del sistema se corresponde con una ecuación de primer orden con una constante de velocidad de 0.081 d^{-1} , no obstante, y como se ha comentado anteriormente, si se consideran sólo los cuatro primeros días, en los que el descenso es muy rápido, la constante de velocidad es de 0.14 d^{-1} , valor superior al que otros autores han determinado en sus trabajos : 0.073 d^{-1} para Urbain *et al.* (1993), 0.057 d^{-1} para Benedek *et al.* (1972) y 0.048 d^{-1} para Kim *et al.* (1990).

Los valores de la DQO del contenido del tanque de aireación experimentan un comportamiento análogo al de los sólidos totales en suspensión, pasando de un valor inicial de $1993 \text{ mgO}_2/\text{L}$ hasta $686 \text{ mgO}_2/\text{L}$, lo que supone una reducción del 65 %.

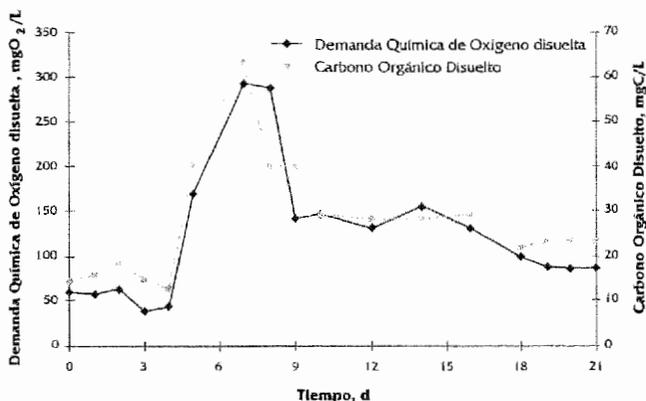


Figura 2. Evolución de la Demanda Química de Oxígeno disuelta y Carbono Orgánico Disuelto del contenido del tanque de aireación durante el experimento.

La evolución de la cantidad de materia orgánica soluble del sistema fue seguida a través de la

medida de Demanda Química de Oxígeno disuelta (DQOd) y del Carbono Orgánico Disuelto (COD) (Figura 2). El máximo que experimentan ambas variables entre los días 4 y 9 se corresponde con la liberación al medio de la materia orgánica contenida en el protoplasma celular como consecuencia de la muerte de los microorganismos superiores. De estos polímeros orgánicos, constituidos fundamentalmente por proteínas y polisacáridos, son eliminados aquéllos que son más fácilmente degradables por lo que posteriormente se produce una disminución del valor de la DQOd y COD del sistema. Los niveles de estas variables registrados al final del ensayo se deben a moléculas orgánicas que pueden ser consideradas como refractarias en las condiciones en que se ha realizado este experimento. Estos resultados indican claramente que se está entrando en una fase de metabolismo endógeno que trae como consecuencia un descenso en el contenido de sólidos.

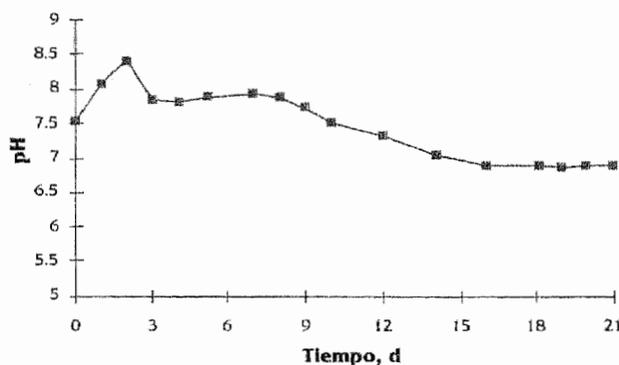


Figura 3. Variación del valor del pH del sistema de lodos activos.

El pH del contenido del reactor experimentó importantes variaciones durante el intervalo de tiempo en el que se desarrolló el ensayo. Mientras los constituyentes de los lodos son degradados, el pH se incrementa desde 7.53 hasta 8.43 entre los días 0 y 2 y luego decrece hasta un valor de 6.80 el día 21 de ensayo (Figura 3).

El incremento inicial del pH podría ser el resultado de la liberación de amonio al medio, provocado por la hidrólisis de proteínas. La acidificación que se produce en el sistema a partir de los dos días de inicio del ensayo, ha sido observada por diferentes autores (Jenkins *et al.*, 1989 ; Urbain *et al.*, 1993) y constituye el principal inconveniente de los procesos de digestión aerobia ; la causa de esta acidificación podría estar en el metabolismo hidrolítico (producción de ácidos grasos volátiles), o en las reacciones de nitrificación que se producen en el sistema.

Actividad microbiana del sistema de lodos activos

Las observaciones realizadas al microscopio y con la utilización de las distintas claves citadas anteriormente en el apartado de material y métodos, han servido de ayuda para determinar el estado de la población y los cambios a los que se ve sometida la microbiota de los lodos activos en el ensayo, además de contribuir a explicar la evolución de los parámetros anteriores (Sólidos en Suspensión, Demanda Química de Oxígeno, etc.).

La población que existía en el sistema al inicio del ensayo era la característica de una unidad de lodos activos, con la presencia de todos los grupos funcionales típicos de estos sistemas. En los primeros días del ensayo, los lodos del reactor adquieren un aspecto gelatinoso no presentando una buena sedimentación en el decantador. Las observaciones al microscopio permitieron determinar una reducción considerable del número de individuos perteneciente a los grupos de organismos superiores, apareciendo sólo protozoos ciliados sésiles del género *Vorticella*, habiendo desaparecido otras formas de protozoos ciliados sésiles coloniales de los géneros *Epistilys* o *Zoothamnium*. A continuación, entre el quinto y décimo día, los lodos toman un color oscuro y en el decantador se observa el sobrenadante turbio, como consecuencia de la considerable disminución que se ha producido en la población de ciliados sésiles y la aparición de los grupos de flagelados y de ciliados arrastreros, en particular la especie *Aspidisca cicada*. Estos organismos se han identificado utilizando las claves de Curds (Curds, 1982;1983).

Hacia el décimo día del ensayo los individuos que se establecen en el sistema son ciliados libres nadadores (principalmente pertenecientes a la especie *Coleps hirtus*), los cuales son capaces de consumir todo tipo de microorganismo, y flagelados de pequeño tamaño, además de algunos individuos de la subclase Suctorina (Curds, 1982;1983). Estos organismos son típicamente oportunistas y se han desarrollado aprovechando las condiciones creadas en el reactor.

Este proceso de eliminación de algunos grupos de microorganismos y la evolución de la población en el reactor son las respuestas a las condiciones de inanición creadas en el sistema, las cuales han sido descritas por diferentes autores (Urbain *et al.*, 1993).

Al final del ensayo, la población existente en el sistema ha desaparecido casi completamente, apareciendo flóculos dispersos con muy poca actividad.

La tasa de respiración, cuyos valores aparecen representados en la Figura 4, tiene un comportamiento análogo al de los Sólidos en Suspensión (Figura 1) y la Demanda Química de Oxígeno del reactor. Así, en los cuatro días primeros del ensayo, existe un fuerte descenso de la actividad respiratoria como consecuencia de la desaparición de los organismos superiores. A partir del sexto día, la tasa de respiración no experimenta prácticamente variación alguna hasta el final del ensayo, lo que indica la baja actividad que tienen los pocos organismos que quedan en el sistema. Este comportamiento es análogo al obtenido por Teuber y Brodish (1977) que obtienen un descenso de hasta un 88% de la actividad respiratoria en los tres primeros días de su experimento, aunque es diferente al que obtuvieron Horan y Shanmugan (1986), quienes determinaron un descenso de la actividad respiratoria del 60% a los 7.5 días del inicio del ensayo y un 80% a los 12.5 días.

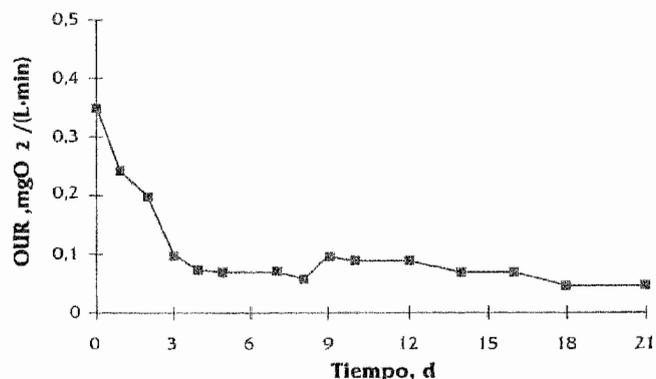


Figura 4. Evolución de la tasa de respiración (OUR) en el ensayo sin aporte de alimentación.

El descenso de la actividad respiratoria (OUR) puede modelarse como un proceso de primer orden con un valor de la constante de velocidad de 0.175 d^{-1} , pudiéndose calcular el valor de esta variable por medio de la ecuación:

$$\text{OUR} = 0.318e^{(-0.175t)} \quad (2)$$

En la Figura 5 aparecen representados los valores obtenidos de la tasa específica de respiración. La tendencia es irregular y distinta a la observada en las variables anteriores. Así, después de un descenso, el sistema recupera su actividad debido a la

aparición de los individuos oportunistas que aprovechan las condiciones creadas para desarrollarse. El descenso que se produce desde el día siete hasta el día veintiuno se debe a procesos de canibalismo, y los microorganismos que quedan en el reactor se alimentan de los productos celulares procedentes de la lisis de los individuos que han sido eliminados anteriormente.

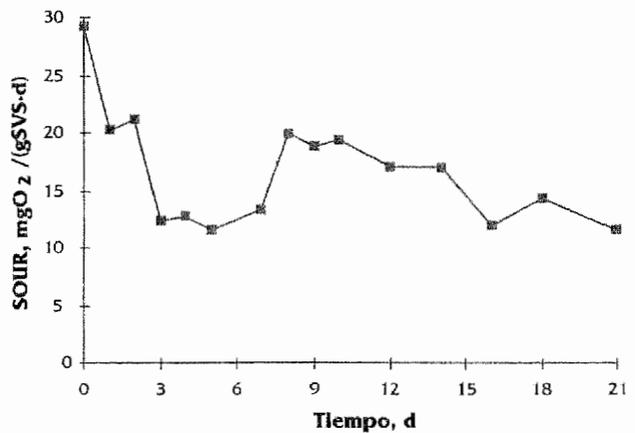


Figura 5. Evolución de la tasa específica de respiración (SOUR) a lo largo del ensayo sin aporte de alimentación.

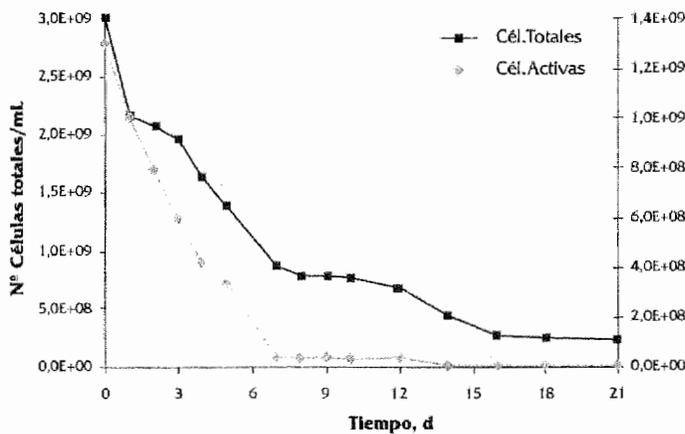


Figura 6. Evolución del número de células (totales y activas) durante el ensayo sin aporte de alimentación.

En la Figura 6 se representan los resultados obtenidos de los recuentos de células totales y activas. Ambas variables siguen un comportamiento bastante similar: existe un descenso exponencial entre los días 0 y 7 del ensayo que coincide con el descenso experimentado por los sólidos y luego un descenso menos acusado hasta el final del ensayo. Esto puede deberse a que se está produciendo la degradación y muerte de los microorganismos que están en el reactor, siendo mayor la pendiente que representa a la población activa que la que representa la población total.

El descenso exponencial presenta una constante de velocidad de 0.123 día^{-1} para la población total existente en el reactor, y de 0.261 día^{-1} para la población activa. Estos valores son similares a los encontrados por Urbain et al. (1993), pero muy diferente al de Mason et al. (1987) que obtuvieron en su trabajo en el estudio de la lisis celular un valor de 0.05 h^{-1} .

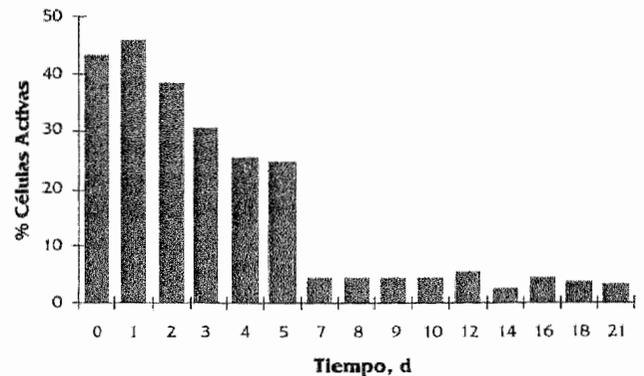


Figura 7. Porcentaje de población activa presente en el sistema en la experiencia sin aporte de materia orgánica.

El porcentaje de población activa que ha ido permaneciendo en el reactor a lo largo del ensayo aparece representado en la Figura 7. Inicialmente la población activa presente en el reactor es bastante importante, representa el 43.4% de la población total, como correspondía a un sistema de lodos activos, pero ésta comienza a descender desde el primer día ante la escasez de materia orgánica que existe en la unidad. Después del quinto día, la población activa experimenta de nuevo una fuerte reducción llegando a valores inferiores al 5% de la población total, porcentaje que se mantiene hasta el final del ensayo. Este porcentaje corresponde a aquellos organismos que necesitan menos energía para sobrevivir y que la obtienen de los sustratos que aún permanece en el reactor.

CONCLUSIONES

Del ensayo realizado sin ningún tipo de aporte de materia orgánica se puede concluir que:

* La unidad de lodos activos experimenta una reducción del 73 % en el valor de los sólidos totales en suspensión presentes en el sistema, lo cual se debe a la lisis celular como consecuencia de la desaparición de los microorganismos ante la falta de alimentación; la población activa es la encargada de degradar las proteínas y los polisacáridos que se excretan al medio.

* Ante la situación creada por la ausencia de alimentación externa al reactor, la microbiota existente en el mismo cambia, apareciendo organismos oportunistas muy diferentes a los que se suelen encontrar en el sistema de lodos activos.

* Los valores de las medidas de actividad disminuyen durante el periodo de escasez de alimento al que son sometidos en la realización del experimento; concretamente, la tasa específica de respiración al final del ensayo se sitúa en valores muy bajos (147 mgO₂/gSVS·d), y solamente el 3,67% de la población existente en el sistema se encuentra en un estado activo.

LISTA DE SÍMBOLOS

STS	Sólidos totales en suspensión
SVS	Sólidos Volátiles en suspensión
SNVS	Sólidos No Volátiles en Suspensión
DQO	Demanda Química de Oxígeno
CTC	Cloruro de 5 ciano, 2,3, ditolil tetrazolium
DAPI	Dicloruro de 4,6-diamidino-2-fenilindol
SOUR	Specific Oxygen Uptake Rate (Tasa Específica de Respiración)
OUR	Oxygen Uptake Rate (Tasa de Respiración)

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA; AWWA; WPCF (1989). Métodos Normalizados. Para el análisis de aguas potables y residuales. Editorial Díaz de Santos, S. A., Edición en español (1990).
2. Awong, J., Bitton, G., Koopman, B. (1985). ATP, Oxigen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Res.*, 7(19): 917-921.
3. Baldwin, H. And Chandler, G. (1966). *Freshwater Biology*. Edinonson, Washington, D.C.
4. Benedek, P., Farkas, P., Literathy P. (1972). Kinetics of aerobic sludge stabilization. *Water Res.*, 6, 91-97.
5. Curds C. R. (1982). *British and other freshwater Ciliated Protozoa. Part I*. Cambridge University Press, London.
6. Curds, C.R., Gates, M.A. and Roberts, D. McL. (1983). *British and other freshwater Ciliated Protozoa. Part II*. Cambridge University Press, London.
7. Gaudy A. F. Jr, Ramanathan, M., Yong, P.Y. and Degeare, T.V. (1970). Studies of the operational stability of the extend aeration process. *J. Water Poll. Control Fed.*, 42, 165-170.
8. Griebel, T., Shaule, G., Wuertz, S. (1997). Determination of microbial respiratory and redox activity in activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19, 118-122.
9. Horan N. J. and Shanmugan, P. (1986). Effects of starva-

tion ad nutrient depletion on the settling properties of activated sludge. *Wat. Res.* 20, 661-666.

10. Jenkins, C.J. and Mavinic, D.S. (1989). Anoxic.aerobic digestion of waste activated sludge :Part I- Solids reduction and digested sludge characteristics. *Environ. Technol. Lett.*, 10, 355-370.
11. Kim, M. H. and Hao, O.J. (1990). Comparison of activated sludge stabilization under aerobic or anoxic conditions. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 62, 160-168.
12. Kjelleberg, S., Hermansson M., Marden, P., Jones, G. W. (1987). The transient phase between growth and non-growth of 4heterotrophic bacteria, with emphasis on marine environment. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41, 25-49.
13. Lee, J.J., Hunter S.H. and Bovee E. C. (1985). *An illustrated guide to the protozoa*. Society of Protozoologists. Lawrence, Kansas.
14. Mason C. A., Bryers, J.D. and Hamer, G. (1986). Activity, death and lysis during microbial growth in a chemostat. *Chem Eng. Commun.*, 45, 163-176.
15. Mason, C.A.; Hamer, G. (1987). Crytic growth in *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Environ. Biotech.*, 25, 577-584.
16. Matin, A. (1979) Microbial regulatory mechanism at low nutrient concentrations as studied in chemostat. In: *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*, Shilo M. (Ed), pp 323-339, Dahhlem K
17. Metcalf & Eddy. Inc. *Wastewater Engineering. Collection and pumping of wastewater*. G. Tchobanoblos Ed. MacGraw-Hill, Inc., Nueva York, 1981.
18. Reddy, M.P., Gaudy A. F. Jr., and Mannickam, T. (1983). Total oxidation process using and aerobic digester as a source of recycle sludge. *Chem. Eng. Commun.*, 23, 137-150.
19. Roszak D.B. y Colwell R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol.*, 41, 25-49.
20. Schaule, G; Flemming, H-C; Ridgway, H.F.; (1993). Use of 5-Cyano-2,3-Ditoly Tetrazolium Chloride for Quantifying Planktonic and Sessile Respiring Bacteria in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* 11 (59): 3850-3857.
21. Teuber, M. and Brodish, K. E. V. (1977). Enzymatic activities of activated sludge. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 4, 185-194.
22. Urbain, V, Pys, E., Block, J.C., Manem, J. (1993). Composition and activity of activated sludge under starvation conditions. *Environmental Technology*, 14:731-740.