

Patente de los Estados Unidos [19] [11] **Numero de Patente** 4,673,505
Wong [45] **Fecha de la Patente:** 16 de Enero de 1987

[54] ADITIVO BACTERIAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

- [75] Inventor: John M. Wong, Cleveland, Ohio
[73] Apoderado: Envirodyne, Inc., Manistee, Mich.
[21] No. Aplicación: 836,141
[22] Archivado: 4 de marzo de 1986
[51] Int. Cl.⁴ C02F 3/34; C12N 1/04; C12N 1/20; C12N 1/36
[52] U.S. Cl..... 210/611; 210/620; 210/631; 435/244; 435/245; 435/253; 435/260
[58] Campo de Búsqueda: 210/610, 611, 764, 631, 210/620; 435/184, 188, 244, 245, 253, 260, 264, 267, 800
[56] Referencias Citadas

DOCUMENTOS DE PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

3,963,576	6/1976	Horsfall, III otros	435/260
4,250,254	2/1981	Modrovich	435/188
4,391,887	7/1983	Baumgarten y otros.....	210/610
4,430,427	2/1984	Hopkins	435/188

DOCUMENTOS DE PATENTES EXTRANJERAS

57-71695	5/1982	Japón	210/601
----------	--------	-------------	---------

Examinador Principal - Benoit Castel

Abogado, Agente, o Firma - Birch, Stewart, Kolasch & Birch

[57] **RESUMEN**

El uso de un compuesto inorgánico de azida como inhibidor en una formulación aditiva bacteriana para el tratamiento de aguas residuales. Los compuestos inorgánicos de azida usados en esta invención sirven para conferir vida útil a la formulación aditiva bacteriana, no obstante el tiempo relativamente corto de reactivación, lo cual constituye una gran ventaja para los sistemas de tratamiento de aguas residuales con tiempos de retardo de corta duración. Los compuestos inorgánicos de azida empleados como inhibidor en aditivos de compuestos bacteriales incluyen azidas de metales alcali, azidas de metal alcalinotérreo, azida de plomo y ácido hidrazoico.

12 Reivindicaciones, Sin Dibujos

ADITIVO BACTERIAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

ANTECEDENTES Y CAMPO DE APLICACIÓN

Una variedad de productos de composición bacterial están disponibles en el mercado para uso en función de la mejora de instalaciones para el tratamiento biológico de aguas residuales. Para que sea práctica su aplicación, cada uno de estos productos debe ser suministrado con un período de caducidad y a través de algún medio. La mayoría de estos productos son liofilizados, por lo que están inactivos en estado seco y requieren reactivación en un medio acuoso antes de su adición a las aguas residuales. Otros productos constituyen suspensiones líquidas. Los productos líquidos requieren de la adición de un inhibidor con una concentración suficiente para conferirles vida propia. Al agregar al agua residual la suspensión líquida con el inhibidor ocurre una disolución que reduce la concentración del inhibidor por debajo del nivel requerido para el estado de letargo de la bacteria. Una vez que el nivel del inhibidor baja por debajo del nivel mínimo requerido, la bacteria se reactiva, se metaboliza y crece. Suspensiones líquidas como las anteriores tienen ventajas sobre los productos liofilizados ya que no requieren de una fase independiente de reactivación y simplemente, se adicionan al medio que requiere de tratamiento.

Para las preparaciones bacteriales líquidas o liofilizadas es primordial el tiempo de demora entre la adición al agua residual y la subsiguiente liberación de la inhibición y reactivación del crecimiento.

En los productos líquidos, la liberación de la inhibición comienza con la adición al agua residual. En sistemas de circulación directa en los cuales el tiempo de retención de cualquier material adicionado puede ser una cuestión de horas, es absolutamente necesario que el tiempo de retardo antes de la reactivación sea de breve duración.

La Patente Estadounidense No. 3,963,576 de Horsfall y otros está orientada a un inhibidor para una suspensión bacterial líquida y trata el uso de sulfuro de sodio o de potasio para tal propósito.

La presente invención está dirigida al uso de un inhibidor que además de conferir un período de conservación, proporciona también un tiempo de reactivación que es aproximadamente la mitad del requerido por productos similares inhibidores a base de sulfuro, lográndose así una sustancial ventaja en sistemas con tiempos de retención de corta duración.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esta invención abarca la elección de composiciones bacteriales y condiciones de crecimiento para crear una suspensión líquida, así como el método para proporcionar el estado inactivo de la suspensión que a la vez posee la capacidad de rápida regeneración. Específicamente, la invención incluye:

1. El crecimiento de una combinación de varias bacterias, por ejemplo, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Myxobacteria*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacteria*, y(o) *Bacteria Thiobacilo*.
2. La adición de un inhibidor químico, específicamente, una cantidad suficiente de un compuesto de azida ($-N_3$) para hacer que la suspensión sea metabólicamente inactiva. La cantidad de inhibidor químico a ser adicionado a la suspensión de microorganismos es adecuado desde 0.002% a 0.02% de iones de azida por el peso de la suspensión bacterial líquida. La cantidad de iones de azida empleados como inhibidor, además de

proporcionar un período de conservación, también contempla un breve tiempo de reactivación después de agregar la suspensión a las aguas residuales.

3. Un factor que influye en el ritmo de reactivación de la bacteria *Bacillus* es la formación de esporas. El uso de un inhibidor a base de sulfuro como se describe en la patente Estadounidense No. 3,963,576, requiere de varias horas para inducir la formación de esporas de la bacteria *Bacillus*, después de la adición del sulfuro. Después de agregar al agua residual la bacteria *Bacillus* en forma de esporas, se requieren hasta 12 horas para su germinación, es decir, para transformarse de esporas a forma metabolizada activa. La adición del inhibidor de azida en correspondencia con la presente invención no induce la formación de esporas en la bacteria *Bacillus*, lográndose así un tiempo de reactivación muy breve, por ejemplo, de cerca de 30 minutos.

Los aditivos químicos usados para la inhibición en la presente invención son compuestos inorgánicos de azida. Los compuestos adecuados de azida incluyen azidas de metales alcali, tales como azida de sodio, de potasio; azidas alcalinotérreas: azida de calcio, de magnesio; otros azidas metálicos: azida de plomo, ácido hidrazoico (HN₃).

La suspensión bacteriana a la cual se agrega el compuesto de azida, se produce mediante técnicas bien conocidas. Las bacterias crecen bajo condiciones aeróbicas en un medio nutriente acuoso que incluya fuentes apropiadas de carbono, nitrógeno y fósforo, tal y como se ejemplifica a continuación. El aditivo del compuesto de azida se agrega a las bacterias, ya sea un cultivo simple o mixto y después de lograr un crecimiento estacionario. Tal y como se indicó anteriormente, la cantidad requerida de aditivo de azida es de cerca del 0.002% al 0.02% según el peso de la suspensión bacteriana.

La suspensión bacteriana inhibida puede ser almacenada por lo menos durante 60 días en dependencia de la cantidad de azida adicionada, las especies de bacterias en suspensión, la temperatura de almacenamiento, su exposición al aire durante el almacenaje y otros factores semejantes. La suspensión bacteriana inhibida generalmente se puede almacenar en tanques de 55 galones los cuales se pueden transportar hasta el sitio de tratamiento de las aguas residuales para su uso. Después de la adición de la suspensión bacteriana inhibida al tanque de reacción usado para el tratamiento de las aguas residuales, las bacterias, dentro de las instalaciones de tratamiento, se reactivan en el transcurso de unos 30 minutos.

El uso de la suspensión bacteriana inhibida de la invención mejora objetivos de tratamiento de aguas residuales tales como, la eliminación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la oxidación de amoníaco, la conversión de ácidos orgánicos como es el caso del ácido acético en presencia de nitratos, nitrógeno molecular, CO₂, etc. Por consiguiente, la invención proporciona un medio apropiado para introducir determinadas bacterias con capacidades específicas en sistemas de tratamiento de aguas residuales con requisitos definidos para remoción de contaminantes.

Los siguientes son solo algunos ejemplos ilustrativos de la presente invención los cuales no deben ser considerados como limitativos. A menos que se estipule lo contrario, los porcentajes de envejecimiento descritos en este respecto son según el peso.

Ensayos comparativos

EJEMPLO 1

Para comprobar tanto la estabilidad del producto como su tiempo de reacción relativo, se realizaron los siguientes ensayos. Una combinación de *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

Amyloliqefaciens y *Pseudomonas Aeruginosa* fue cultivada usando el siguiente medio acuoso nutriente

0.2%	Citrato de Sodio
0.1%	KH ₂ PO ₄
0.05%	MgSO ₄
0.1%	Extracto de Levadura
0.1%	NH ₄ Cl

5 Los nutrientes fueron disueltos en 10% de agua del grifo y 90% de agua desionizada para preparar hasta 500 galones de la referida solución, la cual fue esterilizada a una presión de 15 libras de presión de vapor durante 15 minutos. Después de enfriar hasta 98°F, el medio de nutrición fue inoculado con la combinación de bacterias *Bacillus* y *Pseudomonas* indicadas anteriormente para dar comienzo al proceso de aeración.

10 A las 30 horas de crecimiento, tres tanques de 55 galones de la suspensión bacterial fueron llenados con el contenido del reactor aeróbico. La caracterización de las tomas de las muestras a las 30 horas fue como se describe a continuación.

1. Recuento de bacterias, 1×10^7 células/ml.
2. Demanda Química de Oxígeno soluble (DQO) después de filtrar la solución a través de un filtro de 0.5 micrones, 650 mg/l.

15 A continuación, los tres tanques de 55 galones fueron inhibidos con aditivos químicos tal y como se describe a continuación.

Número del Tanque	Químicos Adicionados	Gramos Adicionados
1	Sulfuro de Sodio	20
2	Azida de Sodio	20
3	Sin adición	--

Los tanques fueron sellados y la suspensión de cada tanque se hizo envejecer durante 30 días.

20 Después de transcurrir los 30 días de envejecimiento, los tanques fueron agitados durante 15 minutos para lograr una mezcla completa y posteriormente, se realizaron nuevamente ensayos de recuento de bacterias y de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), cuyos resultados se muestran a continuación.

Número del Tanque	Químicos Adicionados	Contenido Bacterial / ml	DQO Soluble, mg/l
1	Sulfuro de Sodio	9.6×10^6	625
2	Azida de Sodio	9.1×10^6	575
3	Sin adición	6.0×10^6	130

25 Como se muestra anteriormente, el tanque 3, sin inhibidor, continuó metabolizando hasta consumir hasta el 80% de la DQO soluble presente desde la toma inicial de muestras y hasta el final de los 30 días (650 mg/l en la toma inicial de muestras, 130 mg/l después de 30 días de envejecimiento. Más aún, el recuento de bacterias disminuyó de 1×10^7 hasta 6.0×10^6 , indicando un índice de mortalidad del 40% durante el período de 30 días. En cambio, las suspensiones tratadas con sulfuro y azida consumieron solo el 3.8% y el 11.5%

respectivamente del DQO soluble, mostrando además, un índice de mortalidad del 4% la primera (suspensión con sulfuro) y del 9% la segunda (suspensión con azida). Esto datos, obviamente, muestran que los tratamientos con azida y sulfuro son efectivos para crear suspensiones inactivas de bacterias en comparación con una suspensión no inhibida.

- 5 Para comprobar el tiempo de retardo que transcurre entre la disolución en agua residual y la reactivación, se realizó el siguiente ensayo. El caldo nutriente que se preparó consistía de:

0.1%	NH ₄ Cl
0.1%	KH ₂ PO ₄
0.05%	MgSO ₄
0.05%	Acetato de Sodio
0.05%	Glucosa
0.05%	Citrato de Sodio
0.1%	Extracto de Levadura

- 10 Los ingredientes anteriores fueron disueltos en 10% de agua de grifo y 90% de agua desionizada, esterilizada durante 15 minutos a 15 libras de presión de vapor y sometidos a aeración y a inoculación con 1000 ppm (volumétrico) de suspensión proveniente de los tanques 1, 2 y 3.. En el momento de la inoculación, cada tanque había envejecido durante 35 días.

- 15 Para determinar el tiempo de reactivación se utilizó el método de determinación de la capacidad de absorción espectral (absorbancia). Para calibrar el aparato de medición en cero, se usó agua destilada, determinándose así un 85% de absorbancia para el caldo nutriente esterilizado. Con posterioridad a la inoculación, se realizaron mediciones de absorbancia de las muestras aireadas en intervalos de 20 minutos. El incremento de la absorbancia indica que está ocurriendo el crecimiento (reactivación). En la Tabla 1 se presentan los datos.

TABLA 1

Tiempo (Horas)	Tanque 1 (Sulfuro)	Tanque 2 (Azida)	Tanque 3 (Sin Inhibidor)
0	85	85	85
1	84	85	82
2	86	92	84
3	85	148	87
4	90	225	98
5	112	272	122
6	152	335	145
7	185	362	151
8	228	402	160

- 20 A partir de lo anterior, queda claro que la suspensión inhibida con azida se reactivó en 2-3 horas, que la segunda que contiene sulfuro, se reactivó en 4-5 horas y que la tercera con 35 días de envejecimiento y sin ningún inhibidor, mostró un nivel de crecimiento significativamente menor que cualquiera de las muestras inhibidas. Es importante hacer notar que la muestra inhibida con azida no solo se reactivó en la mitad del tiempo que lo hizo la muestra de sulfuro, sino que además demostró un índice de crecimiento más rápido hasta liberar la inhibición. Tal y como se explicó anteriormente, este menor tiempo de reactivación constituye la ventaja más

significativa del sistema con inhibidor de azida con relación a sistemas anteriores de la técnica a base de sulfuro, especialmente en sistemas de circulación directa con tiempos de retención de corta duración.

EJEMPLO 2

5 Tal y como se mencionó anteriormente, la inducción de la esporulación de bacilos que ocurre en inhibidores a base de sulfuros incrementa el tiempo de retardo que transcurre entre el momento de adición de la suspensión bacteriana al agua residual y su subsiguiente reacción y crecimiento. Para demostrar las diferencias relativas a la esporulación que resultan de la comparación en el uso de inhibidores químicos a base de sulfuro o azida, se realizó el siguiente experimento:

10 El *Bacillus subtilis* fue cultivado en el mismo medio acuoso nutriente que el descrito en el Ejemplo 1, bajo las mismas condiciones y durante 30 horas. Después de transcurridas las 30 horas de cultivo, se adicionaron los inhibidores químicos a varias de las muestras, según las cantidades especificadas en la Tabla 2.

15

TABLA 2

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Sulfuro de Sodio	0	0.013%*	0.013%*
Azida de Sodio	0.013%*	0	0.013%*

*0.5 g/gal

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (20oC) durante 24 horas para permitir el desarrollo del proceso de esporulación.

20 Después de conservar las muestras durante 24 horas y usando una técnica estandarizada de coloración se prepararon transparencias de cada muestra para determinar el porcentaje total de organismos resultantes del proceso de esporulación. En la tabla 3 se muestran los resultados de este análisis.

TABLA 3

	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1
% esporulación	15%	90%*	40%*

25 A partir de estos datos, queda claro que la inhibición a base de sulfuro resultó virtualmente en una total esporulación, lo cual retardó el proceso de reactivación, mientras que la inhibición con azida no solo falló en inducir una esporulación significativa como se observa en la Muestra 1, sino que también evitó una esporulación significativa al ser usada en combinación con sulfuro, como se muestra en la Muestra 3.

30 Para demostrar la ventaja de este fenómeno, se usó 1 ml de partes alícuotas de las Muestras 1 y 2 para inocular muestras de un litro del medio nutriente acuoso con la composición que se describe en el Ejemplo 1, y se cultivó bajo las mismas condiciones. Se usó nuevamente el método de absorbancia para determinar el crecimiento bacteriano. El nivel de absorbancia se midió en los intervalos que se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Nivel de Absorbancia, según horas de cultivo (Unidades Klett)	Muestra 1	Muestra 1
0	80	80
1	105	80
2	135	80
4	175	82
6	255	86
12	310	85
14	345	128
24	460	256

5 A partir de estos datos se puede ver que la Muestra 2, tratada con inhibidor a base de sulfuro y compuesta por un 90% de esporas, no mostró un crecimiento apreciable hasta haber transcurrido 12 horas. Al contrario, la Muestra 1, tratada con inhibidor de azida y compuesta por un 15% de esporas mostró un crecimiento (reactivación) en solo una hora. Resulta obvio que en sistemas de tratamiento de aguas residuales con tiempos de retención, por ejemplo de 6 horas, la adición de bacilos inhibidores a base azida proporcionarían una función de utilidad en los procesos de tratamiento, mientras que la adición de bacilos inhibidores a base de sulfuro no serían de ningún valor.

10 Resulta evidente, a partir de lo anterior, que los compuestos inorgánicos de azida como inhibidores proporcionan un período de conservación, además de mantener una población bacteriana alta y viable al menos de 60 días, y en el caso de bacilos, también proporciona una ventaja significativa en términos de tiempo de reactivación para sistemas de tratamiento de aguas residuales.

15 Resulta obvio, a partir de la invención descrita, que la misma puede ser variada de múltiples maneras. Tales variaciones no fueron consideradas como partida en el espíritu y alcance de la invención, ya que las mismas, como resulta obvio a quien sea experto en la técnica, se pretende que sean incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones:

20 1. Una suspensión acuosa de bacterias inhibidas compuesta por organismos bacteriales aeróbicos capaces de degradar materiales orgánicos la cual utiliza la demanda bioquímica de oxígeno, agua y una cantidad efectiva de inhibidor de cerca de 0.002 a 0.02 % según el peso de la suspensión bacteriana acuosa de un compuesto inorgánico a base de azida.

25 2. La suspensión acuosa de la reivindicación 1, en la que dichas bacterias han sido seleccionadas de un grupo al que pertenecen el *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Myxobactérias*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacterias*, *Thiobacillus* y sus combinaciones.

3. La suspensión acuosa de la reivindicación 1, en la que dicho compuesto inorgánico a base de azida es al menos uno de los elementos seleccionados del grupo compuesto por azidas de metales alcali, azidas de metales alcalinotérreos y azidas de plomo.

30 4. La suspensión acuosa de la reivindicación 1, en la que dicho compuesto a base de azida es ácido hidrazoico.

5. La suspensión acuosa de la reivindicación 1, en la que dicho compuesto es azida de sodio.

6. La suspensión acuosa de la reivindicación 5, en la que la cantidad de azida de sodio en la suspensión bacteriana es de alrededor de 0.002 a 0.02% según el peso.

5 7. En un método para el tratamiento de aguas residuales, la mejora que comprende la adición de una suspensión acuosa de bacterias inhibidas, incluidas las bacterias aeróbicas capaces de degradar materiales orgánicos con el uso de la demanda bioquímica de oxígeno, agua y una cantidad efectiva de inhibidor de cerca de 0.002 a 0.02% según el peso, basado en el peso de la suspensión bacteriana acuosa de un compuesto inorgánico a base de azida, en un
10 recipiente de reacción en el cual el agua residual es degradada.

8. El proceso de la reivindicación 7, en la que dichas bacterias son seleccionadas de un grupo al que pertenecen el *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Myxobacterias*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacterias*, *Thiobacillus* y sus combinaciones.

15 9. El proceso de la reivindicación 7, en la que dicho compuesto inorgánico a base de azida es al menos uno de los elementos seleccionados del grupo compuesto por azidas de metales alcali, azidas de metales alcalinotérreos y azidas de plomo.

10. El proceso de la reivindicación 7, en la que dicho compuesto a base de azida es ácido hidrazoico.

11. El proceso de la reivindicación 7, en la que dicho compuesto es azida de sodio.

20 12. El proceso de la reivindicación 11, en la que la cantidad de azida de sodio en la suspensión bacteriana es de alrededor de 0.002 a 0.02% según el peso.

* * * * *