

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**PRODUCCION DE INOCULOS PARA REACTORES
ANAEROBIOS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:
MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

TUTOR

M. en C. OSCAR MONROY H.
CO-TUTOR: DR. JEAN PIERRE GUYOT

JURADO

M. en C. GLORIA MORENO R.
M. en C. FLORINA RAMIREZ V.
M. en C. RAFAEL CAMPOS M.

MEXICO, D. F.

MAYO DE 1997

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

Mi mamá

a Enrique

a mis hijas, Alicia y Daniela.

y

a todos mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Jean Pierre Guyot y al M. en C. Oscar Monroy H por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección y asesoría.

Al comité evaluador: la M. en C. Florina Ramírez, M. en C. Gloria Moreno y al M. en C. Rafael Campos, por el tiempo que dedicaron en revisar esta tesis.

De igual manera a Florina, Mónica Méraz, Margarita, Bety, Acela, Zenia, Jacobo, Paco, Oscar por su apoyo incondicional.

ESTA TESIS SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO DE
MICROBIOLOGIA AMBIENTAL DEL DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA -IZTAPALAPA.

INTRODUCCION.....	1
1.JUSTIFICACION.....	1
2.OBJETIVOS.....	2
3. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
3. 1. BIOQUIMICA DE LA DIGESTION ANAEROBIA.....	3
HIDROLISIS Y FERMENTACION.....	4
ACETOGENESIS.....	4
METANOGENESIS.....	4
3.2. MICROBIOLOGIA DE LA DIGESTION ANAEROBIA.....	5
HABITAT.....	6
COMPOSICION INORGANICA.....	6
MORFOLOGIA.....	7
BACTERIAS SULFATOREDUCTORAS.....	7
COMPETENCIA POR EL HIDROGENO.....	7
COMPETENCIA APOR ELACETATO.....	8
3.3.FORMACION DE AGREGADOS EN REACTORES UASB.....	9
4 MATERIALES Y METODOS.....	12
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	12
4.2. METODOS.....	13
FISICOQUIMICOS.....	13
MICROBIOLÓGICOS.....	13
5. RESULTADOS.....	16
5.1 ESTUDIO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TRANSFORMACION DE LODOS ACTIVADOS EN INOCULOS ANAEROBIOS.....	17
5.2. ESTUDIO DE LA ALIMENTACION DE LOS LODOS ACTIVADOS CON ACETATO SOBRE SU TRANSFORMACIONN EN LODOS INOCULO.....	24

5.3. PRODUCCION DE INOCULOS ANAEROBIOS EN REACTORES UASB AGITADOS.....	29
5.4 ARRANQUE DE UN REACTOR UASB ALIMENTADO CON VINAZAS DE CAÑA.....	40
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	55
7. BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXO	62

INTRODUCCION

1. JUSTIFICACION

El arranque de reactores biológicos es un punto importante para el buen funcionamiento de los digestores. Durante esta fase la biomasa sufre cambios para adaptarse al agua residual, produciéndose un periodo de inestabilidad. Debido a la tasa tan lenta de generación de la biomasa en los procesos anaerobios, se sugiere utilizar un inóculo con buenas características de sedimentación y actividad metanogénica.

Generalmente este inóculo proviene de otro reactor anaerobio. Pero en lugares que no cuentan con este tipo de procesos es necesario encontrar una fuente de inóculo alternativo que tenga las características necesarias.

Wu et al. (1987) proponen a los lodos activados como una buena fuente para obtener inóculo para los reactores anaerobios, ya que cuentan con bacterias metanogénicas y son fáciles de obtener. Otras fuentes de inóculo pueden ser lodos de fosa séptica, estiércol de vaca, estiércol de cerdo, sedimentos de lagunas y lodos de lagunas anaerobias. (Field, 1986, Noyola, 1994). En caso de contar con un lodo con baja actividad metanogénica, Guyot (1989,1993) sugiere proporcionar un acondicionamiento previo al inóculo con el fin de activarlo.

Diversos autores (Noyola, 1994; Adebawale 1990; Carvalho *et. al.* 1991) coinciden en que se puede reducir el tiempo de arranque si se cuenta con un lodo adaptado al mismo tipo de agua residual a tratar. Cambios en la composición del agua pueden ocasionar la desintegración del gránulo con una subsecuente pérdida de biomasa en el reactor

El arranque de estos reactores anaerobios esta influenciado por diversos factores como son: la composición química del agua residual, la calidad del inóculo (actividad específica, IVL, granulación, contenido de SSV, etc), así como de factores ambientales como son el pH, la temperatura, los nutrientes (N, P, Co, Ni, Fe) entre otros. Los parámetros de operación, como el tiempo de retención hidráulica y el diseño del reactor juegan también un papel muy importante en el arranque y estabilización del proceso.

2. OBJETIVOS

CARACTERIZAR LOS CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS Y FÍSICOQUÍMICOS QUE OCURREN EN LA ADAPTACIÓN DE LODOS ACTIVADOS A LODOS ANAERÓBIOS.

COMPARAR EL EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE INÓCULOS ANAERÓBIOS A PARTIR DE LODOS ACTIVADOS.

OBTENCIÓN DE UN INÓCULO ANAERÓBIO CON BUENAS CARACTERÍSTICAS DE SEDIMENTABILIDAD Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA A PARTIR DE UN LODO CON BAJAS ACTIVIDADES METANOGENICAS.

CARACTERIZAR LOS CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS Y FÍSICOQUÍMICOS DURANTE EL ARRANQUE DE UN REACTOR

3. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1 BIOQUIMICA DE LA DIGESTION ANEROBIA

La transformación de la materia orgánica en condiciones anaerobias se lleva a cabo por un sistema microbiológico mixto. Tal proceso recibe el nombre de digestión anaerobia, e involucra tres etapas: 1) hidrólisis y fermentación, 2) acetogénesis y 3) metanogénesis (Figura 3.1).

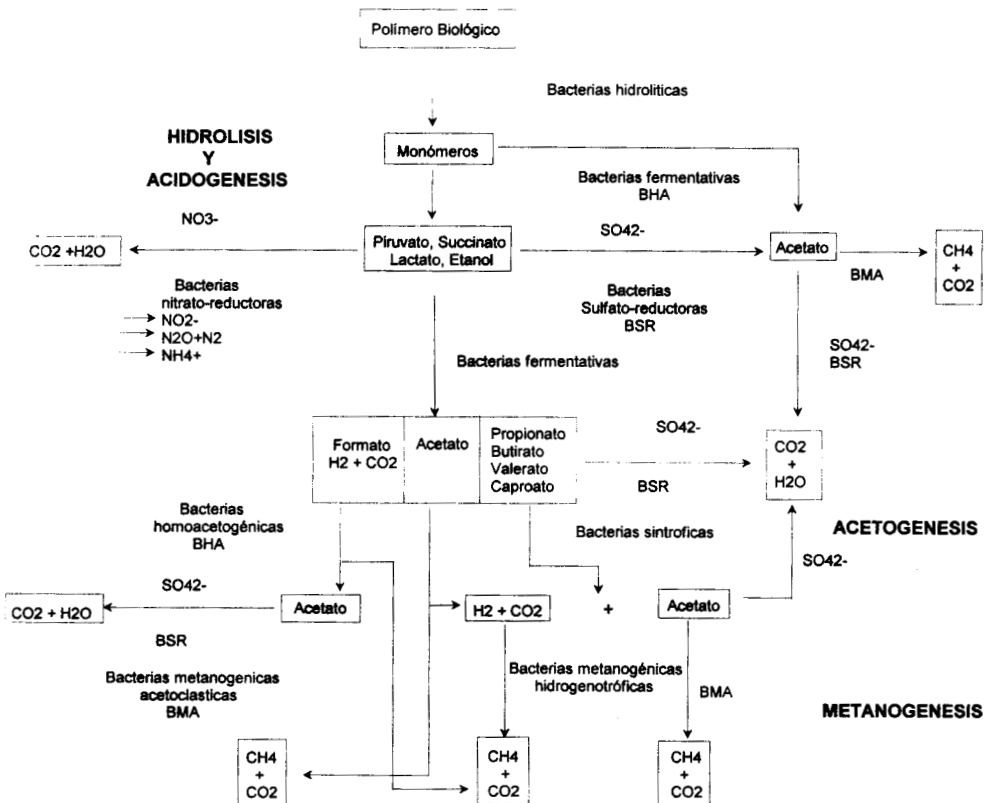


FIGURA 3.1 Esquema de la digestión anaerobia (García, 1991)

HIDROLISIS Y FERMENTACION

Las bacterias hidrolizan inicialmente los polímeros (carbohidratos, proteínas y lípidos) por medio de enzimas extracelulares a polímeros solubles como son: azúcares, aminoácidos y grasas. Estos productos son utilizados por bacterias fermentadoras y transformados en ácidos grasos volátiles (AGV): acético, propiónico, butírico en hidrógeno y CO₂, así como en alcohol y ácidos dicarboxílicos.

Las principales bacterias involucradas en este proceso son anaerobias estrictas o facultativas y pertenecen a una variedad de géneros como son: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pelobacter* y *Acetobacterium*.

ACETOGENESIS

Durante esta etapa el etanol y los AGV son degradados hasta acetato e hidrógeno por un grupo de bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno **OHPA** (obligate hydrogen producing acetogens), las cuales existen en simbiosis con las bacterias metanogénicas que utilizan hidrógeno (**BMH**). Entre las especies más estudiadas se encuentran: *Clostridium formicoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, *Acetobacterium wieringae*, *Clostridium aceticum*.

METANOGENESIS

La metanogénesis es la producción de metano a partir de dióxido de carbono e hidrógeno, de acetato, metanol y metilaminas por bacterias metanogénicas. La producción de metano a partir de acetato se lleva a cabo por bacterias metanogénicas acetoclásticas (**BMA**, las especies más frecuentes son: *Methanosarcina thermofila*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosaeta soehngenii* y *Methanosaeta concillii*). Así como la conversión de CO₂ e H₂ a metano por bacterias metanogénicas hidrogenofílicas (**BMH**), las especies más representativas son: *Methanobrevibacter arborophilicus*, *Methanospirillum hungatei* y *Methanobacterium formicum*. Las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas se encargan de consumir el

H₂ producido por las **OHPA**, manteniendo la presión parcial de dicho gas a niveles bajos y así proporcionar las condiciones necesarias para la conversión de los ácidos grasos en acético e hidrógeno. Esta relación de simbiosis, con base en el hidrógeno, se conoce como transferencia de hidrógeno entre especies.

3.2 MICROBIOLOGIA DE LAS BACTERIAS METANOGENICAS

En base a estudios bioquímicos y genéricos, las bacterias metanogénicas tienen una posición filogenética especial pertenecen al reino de las Archeobacteriae (Woese, 1977). Su pared celular no contiene mureína y su membrana citoplasmática está constituida fundamentalmente de hidrocarburos isoprenoides, en lugar de ésteres de glicerol y ácidos grasos como el resto de las eubacterias. Presentan coenzimas específicas tales como la CoM, la F-420 y la F-430, las cuales les confieren propiedades características; la coenzima F-420 le proporciona fluorescencia a las bacterias a una longitud de onda de 420 nm (Gorris *et. al.* 1986).

Las bacterias metanogénicas se clasifican dentro de 3 Ordenes que incluyen a 7 Familias (Cuadro 3.1)

Cuadro 3.1 CLASIFICACION DE BACTERIAS METANOGENICAS
(García 1990)

Ordenes	Familias
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanothermaceae</i>
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanococcaceae</i>
	<i>Methanomicrobiaceae</i>
	<i>Methanocorpusculaceae</i>
	<i>Methanoplanaceae</i>
	<i>Methanosarcinaceae</i>

HABITAT

Las bacterias metanogénicas se encuentran en ambientes naturales carentes de oxígeno, por ejemplo en sedimentos de pantanos, lagos, fosas sépticas así como en los digestores, en los cuales constituyen aproximadamente el 10% de la microflora total. También son parte de la flora intestinal de rumiantes e insectos como las termitas. El pH al cual pueden desarrollarse se encuentra entre 6.5 y 7.8 y pueden ser mesófilos (30-40°C) o termófilos (45-65°C). Pueden encontrarse en ambientes extremos de alta temperatura y salinidad como las fuentes termales y los cañones termales marinos (Stetter *et al.* 1981, Jones *et al.* 1987, García 1990).

COMPOSICION INORGANICA DE BACTERIAS METANOGENICAS

Las bacterias metanogénicas contienen los compuestos esenciales nitrógeno, fósforo y azufre en concentraciones normales, mientras que algunos micronutrientes como el níquel, hierro y cobalto, están presentes en concentraciones más altas que en otros microorganismos como las eubacterias. (Cuadro 3.2)

CUADRO 3.2 COMPOSICION ELEMENTAL DE LAS BACTERIAS METANOGENICAS (Scherrer, 1983)

ELEMENTO	mg/Kg de peso seco
N	65000
P	15000
S	10000
Ca	4000
K	10000
Mg	3000
Fe	1800
Ni	100
Co	75
Mo	60
Zn	60
Mn	20
Cu	10

MORFOLOGIA DE LAS BACTERIAS METANOGENICAS

Las bacterias metanogénicas presentan una gran diversidad de formas (cocos, sarcinas, bacilos largos y espirales). Pueden ser Gram positivos o Gram negativos y miden entre 0.5 y 0.8 μm de ancho y de 0.8 a 7.0 μm de largo. La morfología colonial reporta que las colonias pueden ser blancas o grises, esféricas o filamentosas.

BACTERIAS SULFATOREDUCTORAS

En presencia de sulfato, sulfito o tiosulfato, las bacterias sulfatoreductoras (BSR) son capaces de utilizar algunos de los intermediarios de los procesos anaerobios.

Las BSR son bacterias anaerobias estrictas, que utilizan el sulfato como aceptor de electrones. Pueden utilizar una variedad de compuestos orgánicos, como formato, acetato, propionato y butirato entre otros como sustratos.

Las BSR se clasifican en dos grupos:

- a) Las bacterias del tipo *Desulfovibrio sp.* que oxidan de manera incompleta su sustrato, como la oxidación del lactato en acetato y CO_2 .
- b) Las bacterias del género *Desulfosarcina sp.* que oxidan de manera completa su sustrato, como la oxidación completa de compuestos aromáticos.

En presencia de sulfato las bacterias acetogénicas y metanogénicas compiten con las BSR por sustratos como son el acetato, hidrógeno, propionato y otros ácidos.

Las BSR producen más energía libre durante el consumo de hidrógeno (-38.0 KJ/mol) y acetato (-39.5 KJ/mol) que las bacterias metanogénicas las cuales producen -32.7 KJ/mol para el hidrógeno y de -28.2 KJ/mol para el acetato.

COMPETENCIA POR EL HIDROGENO.

En ausencia de sulfatos el hidrógeno es obtenido de la oxidación de compuestos como son el lactato, propionato y butirato por las bacterias acetogénicas, pero en presencia de sulfatos estos compuestos pueden ser oxidados directamente por las BSR sin producir hidrógeno, disminuyendo así la cantidad indispensable de hidrógeno para las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas.

COMPETENCIA POR EL ACETATO.

Se ha demostrado que ambos grupos bacterianos, BSR y BM, pueden coexistir en reactores operando en presencia de sulfatos, donde el acetato es completamente transformado a metano. Sin embargo Visser (1995) encontraron una dominancia de las BSR sobre las BM, con lo que aún no queda claro si existe o no una competencia por el acetato. Se habla de factores que influyen en dicha competencia, como son la concentración de acetato, concentración de sulfato, propiedades de inmovilización, tipo de inóculo, tipo de sustrato, temperatura, pH y presencia de compuestos tóxicos (Visser 1995).

3.3 FORMACION DE AGREGADOS EN REACTORES UASB

El reactor UASB, Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Fig 3.2) es un proceso bien establecido para el tratamiento anaerobio de varios desechos líquidos (Lettinga 1983, Lettinga *et al.* 1991, Monroy *et al.* 1996, Macarie 1996).

Este reactor cuenta con cuatro partes principales:

- a) Un separador gas-líquido-sólido.
- b) Una cámara de lodos en la parte baja.
- c) Sistema hidráulico de distribución de la alimentación y evacuación.

La alimentación de estos reactores se hace por la parte inferior. El influente atraviesa la cama de lodos. En la parte superior se encuentra el sedimentador, el cual evita la pérdida de lodos y favorece la evacuación del gas.

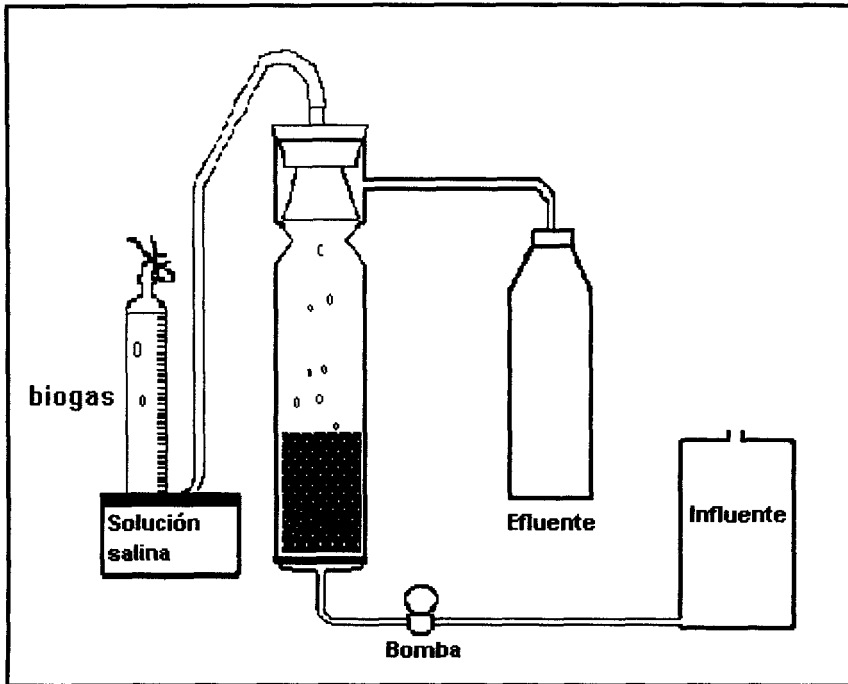


Figura 3.2 Reactor UASB

Las eficiencias de remoción de estos reactores son debidas a la formación de un lecho de lodos granulares con buenas características de sedimentación, favoreciéndose así un alto grado de retención dentro del reactor. Estos lodos cuentan con buenas actividades metanogénicas y permiten alcanzar bajos tiempos de retención hidráulica (Lettinga *et al.* 1982)

En este tipo de reactores los microorganismos son retenidos dentro del reactor, por la capacidad de sedimentación de la biomasa que forma lodos granulares.

La agregación de la biomasa la realizan los propios microorganismos entre sí, formando conglomerados esféricos de poblaciones heterogéneas de microorganismos sintróficos (de 0.5 a 5 μm de diámetro) (Mahoney *et al.* 1987).

Aunque el fenómeno de granulación es ampliamente aceptado aún no ha sido posible unificar criterios en torno al mecanismo y condiciones que favorecen esta forma de agregación debido en gran parte, a la gran diversidad de sustratos y formas de operar los reactores (Alibhai *et al.* 1986, Wu *et al.* 1987, Schmidt *et al.* 1996). Las condiciones de operación y tipo de agua residual influyen en la composición mineral y en granulación. Los gránulos cuentan con un polímero extracelular (glicocalix), el cual juega un papel importante en la estructura y función de los gránulos (Schmidt *et al.* 1996). La procedencia del glicocalix no es clara, una posible explicación es que sea desecho celular.

Se sugiere que la formación de gránulos favorece una relación sintrófica entre los organismos presentes en este, al mismo tiempo que los protege contra depredadores y cambios en la composición del agua residual.

Aunque el proceso de granulación no es claro Schmidt (1996) lo explica basándose en el mecanismo de formación de biopelículas y propone cuatro etapas en el proceso de granulación.

- 1) Transporte de una célula a la superficie de un soporte inerte o a otra célula ya sea por difusión (movimiento Browniano), por convección o por un movimiento activo (por medio de flagelos).
- 2) Una adsorción al sustrato por fuerzas fisicoquímicas, como serían las interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals.
- 3) Una adhesión de las células con el sustrato por apéndices celulares o por ataque del sustrato por la misma célula.
- 4) Multiplicación de la célula y desarrollo del gránulo.

Guiot *et al.* (1991), Alibhani *et al.* (1986) proponen que los gránulos maduros tienen una estructura en tres: Un **núcleo** compuesto de bacterias en forma de filamentos parecidos a *Methanothrix*, una **capa intermedia** en donde se presenta un gran número de bacterias en forma de cocos y bacilos y otras parecidas a *Methanobrevibacter*, y una **capa externa** donde los microorganismos predominantes

son del tipo acidogénico, y algunas metanogénicas de los géneros *Methanococcus* y *Methanosarcina* y otros filamentosos como *Methanothrix* y *Methanospirillum*.

Pero en gránulos jóvenes se ha encontrado que el centro está formado de *Methanosarcina* y las cavidades que forman estas *Methanosarcinas* son ocupadas por *Methanosaeta*, con lo cual se sugiere a estos dos microorganismos como los precursores de la granulación (Schmidt 1996).

Según Hulshoff-Pol *et al.* (1989), existen diversos factores que afectan el proceso de granulación, entre los que están:

- a) Factores ambientales como: la disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH (óptimo entre 6.5-7.8) y composición del agua residual.
- b) Inóculo: el lodo debe contar con buena actividad específica, sedimentabilidad y naturaleza de la fracción inerte.
- c) La carga orgánica suministrada a los granos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta tesis se estudió la práctica de producir lodos anaerobios a partir de lodos activados de purga. Se estudiaron dos lodos, uno procedente de la planta de tratamiento de aguas negras (UNAM) y otro de aguas industriales, de la planta de tratamiento del parque industrial en Toluca (EPCCA). La figura 4.1 muestra la organización e interacciones de la tesis.

	LODOS ACTIVADOS UNAM	LODOS ANAEROBIOS	LODOS ACTIVADOS EPCCA
↙	↓	↓	↓
5.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCION DE INOCULOS	5.2 EFECTO DE LA ALIMENTACION EN LA PRODUCCION DE INOCULOS	5.3 EFECTO DE LA AGITACION EN LA PRODUCCION DE INOCULOS	OPERACION DE UN REACTOR UASB CON EFLUENTE DE LEVADURAS
	↓	↓	
	5.4 ARRANQUE DE UN REACTOR UASB CON VINAZAS	OPERACION DE UN REACTOR UASB CON LACTOSA	

Figura 4.1 Diagrama de la organización de la tesis.

4.2 METODOS

Para caracterizar los lodos en sus diferentes etapas de adaptación se les hicieron los siguientes análisis:

FISICOQUÍMICOS

a) Índice Volumétrico de Lodos (IVL). Es una medida del grado de compactación y sedimentabilidad, en donde se determina el volumen ocupado por un gramo de lodo.

b) Sólidos sedimentables en todas sus formas.

Se emplea para determinar la fracción independiente de sedimentables.

c) pH de entrada y salida

d) Alcalinidad a 4.3 de entrada y salida

e) Demanda Química de Oxígeno de entrada y salida.

MICROBIOLÓGICOS

a) Actividades específicas con 10 mmol de acetato, propionato o butirato como fuente de carbono (Guyot, 1989) y el medio mineral reportado por Balch *et al.*, 1979. Para determinar la actividad de los diferentes tipos de bacterias metanogénicas y acetogénicas en el lodo.

b) Cuentas bacterianas por el método del número más probable (NMP) de acuerdo a García *et al.*, 1982; para cuantificar las bacterias presentes en el lodo.

Preparación de los medios de cultivo.

Procedimiento. Una vez preparado el medio de cultivo (Anexo 1) más un volumen adicional de agua destilada se puso a hervir bajo una corriente de nitrógeno, hasta el cambio de coloración de azul a rosa y al aforo deseado. Se dejó enfriar el medio bajo una corriente de nitrógeno en una cubeta de hielo, una vez frío se agregó la cisteína y se dejó reducir unos minutos más. Se colocó un tapón de hule y se selló con cinta adhesiva, se introdujo dentro de la cámara anaerobia Marca McCoy junto con las botellas serológicas de 57.37 ml y tubos de Hungate, tapones y sellos de aluminio para las botellas. Dentro de la cámara se adicionaron 16 ml de medio a cada botella serológica y 5 ml a cada tubo Hungate, se tapan y se sacan de la cámara. Fuera de la

cámara se procedió a cambiar la atmósfera a las botellas y tubos por N_2-CO_2 (80-20%) durante 2 minutos aproximadamente. Finalmente se esterilizaron las botellas y tubos

Determinación de la actividad específica.

Doce horas previas al inicio de la prueba, los lodos se colocaron dentro de la precámara de la cámara anaerobia bajo un vacío de 20 mm Hg, para que se agote el sustrato residual y liberar el metano del inóculo. El día que se inició el experimento se introdujo a la cámara las botellas con medio y una pipeta despuntada de 5 ml. Una vez adentro se destaparon las botellas y se les agregaron 4 ml de lodos a cada botella colocándoles su tapón y sello de aluminio. Fuera de la cámara y bajo una corriente de nitrógeno se les agregaron 0.2 ml de sulfuro de sodio y 0.4 ml de una solución del ácido a probar, inmediatamente se tomó una alícuota de 0.5 ml de cada botella y se colocaron en viales que contenían 50 μ l de ácido fosfórico, se centrifugaron y el sobrenadante se separa en otro vial. Estas muestras se conservaron en congelación para ser analizadas por cromatografía de gases. Las botellas fueron incubadas a 35°C de forma invertida y con agitación ligera.

La actividad metanogénica se midió mediante la producción de metano, tomando una muestra de gas al tiempo cero y e inyectandola inmediatamente al cromatógrafo de gases. Las muestras subsecuentes se tomaron a intervalos de 2 horas durante las primeras 12 horas.

Para las cuentas bacterianas previamente se maceró dentro de la cámara anaerobia el inóculo, con la ayuda de un mecerador de tejidos. Una vez macerado el inóculo se hicieron las diluciones en el rango de 10^{-1} a 10^{-10} . De cada dilución se inocularon 5 tubos con un volumen de 0.2 ml, empleando en ésta operación jeringas estériles de 1 ml. Los tubos se incubaron a 35°C de forma invertida durante un mes. Para el caso de las bacterias hidrogenótrofas se alimentaron cada tercer día cambiando la atmósfera con una mezcla de H_2-CO_2 durante 2 minutos. Al finalizar el periodo de incubación se determina la presencia de metano en las diferentes diluciones por cromatografía de gases.

b) Alimentación de reactores

-CAPITULO 5.1 agua residual de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria.

-CAPITULO 5.2 agua más 3g/l de acetato de sodio.

-CAPITULO 5.3 Medio mineral de Balch (1979) y como fuente de carbono una mezcla de acetato de sodio y glucosa en una relación 1:1.

-CAPITULO 5.4 Vinazas diluidas con agua y neutralizadas con bicarbonato de sodio

5 RESULTADOS

5.1

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TRANSFORMACION DE LODOS ACTIVADOS EN INOCULOS ANAEROBIOS

HIPOTESIS

LOS LODOS ACTIVADOS ESTAN FORMADOS POR UNA DIVERSIDAD DE FORMAS BIOLÓGICAS, ENTRE LAS CUALES DESTACAN LAS BACTERIAS. EN EL NUCLEO DE LOS FLOCULOS EXISTEN ALGUNAS BACTERIAS ANAEROBIAS QUE BAJO LAS CONDICIONES OPTIMAS DE TEMPERATURA PUEDEN DESARROLLARSE PREFERENTEMENTE Y MOJORAR SU ACTIVIDAD

OBJETIVO

CARACTERIZAR LOS CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS Y FISICOQUÍMICOS QUE OCURREN EN LA ADAPTACIÓN DE LODOS ACTIVADOS A LODOS ANAEROBIOS

INTRODUCCION

En el proceso de lodos activados, la materia orgánica coloidal y suspendida se adhiere a los flocúlos en donde es lentamente solubilizada y degradada. Los flocúlos están formados por aglomerados de microorganismos entre los que se encuentran principalmente hongos, levaduras y protozoarios. En el inóculo se encuentran también bacterias anaerobias que son responsables de una parte de la degradación de la materia orgánica.

METODOLOGIA

Inóculo: Lodos activados procedentes de un planta de tratamiento aerobio (Ciudad Universitaria). Se formaron dos lotes de 4 l cada uno, un lote fue incubado a 35°C, el otro lote fue incubado a temperatura ambiente; ambos lotes se mantuvieron en condiciones anóxicas y se les realizaron los siguientes análisis:

Al tiempo inicial (T=0) se determinaron los sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), actividad metanogénica y NMP.

A los 5, 15, 30, 45 días se tomaron muestras de lodos con objeto de seguir el aumento de la actividad metanogénica (Fig 5.1).

A los 30 días de incubación se analizaron los SST, el IVL, potencial de óxido-reducción y el NMP de bacterias anaerobias (Cuadro 5.1).

A partir de los 61 días ambos lotes fueron alimentados con acetato de sodio (3g/l), cada 10-12 días o hasta que el sustrato desapareciera. Se siguió el consumo del sustrato por comatografía de gases. En el momento que desaparece el sustrato se midieron los SST, SSF, SSV, IVL, y se alimentaron de nuevo los lotes. La misma metodología se siguió durante las cuatro alimentaciones. Al finalizar el experimento a los (93 días) se determinó el IVL y la cuenta bacteriana.

RESULTADOS

Las figuras 5.1.1 y 5.1.2 muestran las actividades de los lodos a diferentes tiempos de incubación y con las dos temperaturas probadas (25 y 35°C). Como se puede observar no hubo degradación de los ácidos probados a ninguna de las temperaturas estudiadas, por el contrario a los 45 días se observa una acumulación de acético, esto posiblemente debido a la actividad acetogénica y la ausencia de metanogénesis de los lodos.

Los conteos bacterianos (CUADRO 5.1.1) muestran un incremento de bacterias metanogénicas hidrogenofílicas, siendo mayor en el lote incubado a 35°C (de 2.3×10^4 a 7.1×10^6). Bajo las condiciones de adaptación, las poblaciones de bacterias utilizadoras de propionato no aumentaron en ninguna de las temperaturas probadas. Las utilizadoras de butirato sólo incrementan su número a 35°C Indicando con esto que no estaban presentes en los reactores debido a que no se generaron los ácidos propiónico ni butírico.

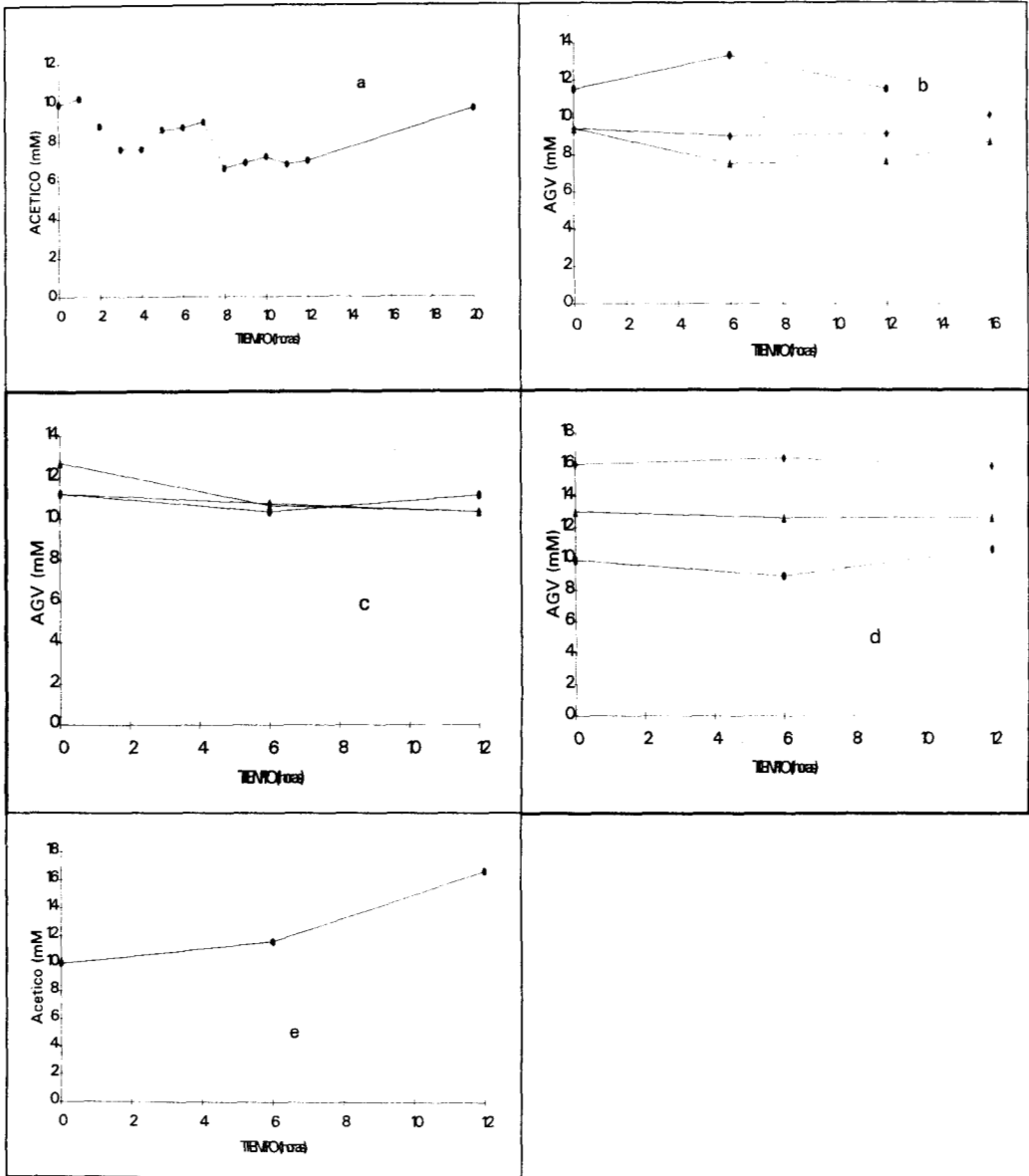


Figura. 5.1.1 Cinéticas realizadas durante los primeros 60 días de operación en el lote incubado a 25°C. a) Tiempo cero b) 5 días c) 15 días d) 30 días y e) 45 días. Acetato (○), Propionato (◇) y Butirato (Δ)

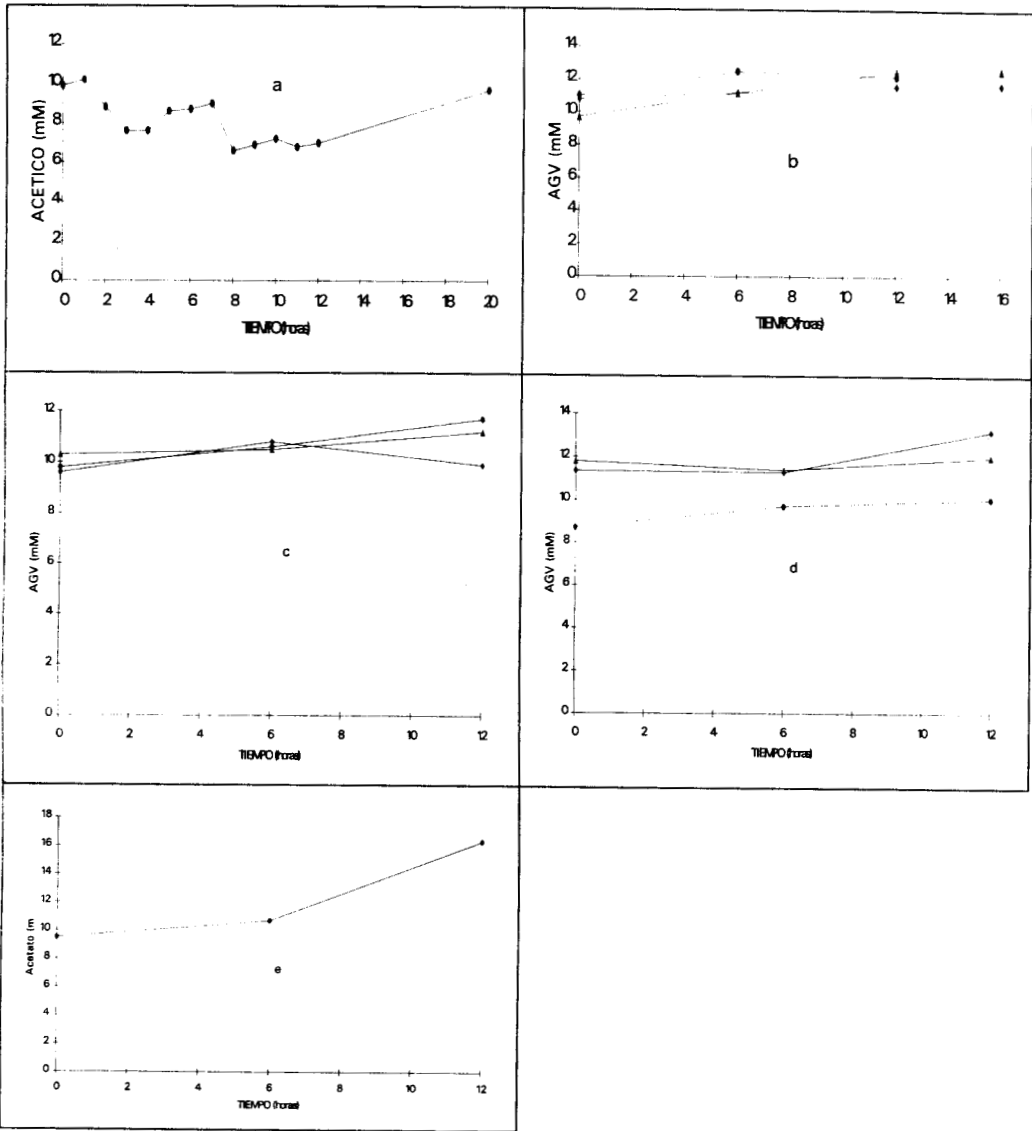


Figura. 5.1.2 Cinéticas realizadas durante los primeros 60 días de operación en el lote incubado a 35°C. a) Tiempo cero b) 5 días c) 15 días d) 30 días y e) 45 días. Acetato (o), Propionato (◊) y Butirato (Δ)

CUADRO 5.1.1 EVOLUCION DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS

TIEMPO (días)	TEMPERATURA (°C)	BACTERIAS (BMH)	BACTERIAS (BMA)	BACTERIAS (OHPA-P)	BACTERIAS (OHPA-B)
0	25	2.3*E4	0	0	0
30	25	1.06*E6	3.3*E6	7.7*E5	1.6*E6
30	35	7.2*E6	7.2*E5	2.3*E6	1.6*E5
90	25	4.8*E9	4.8*E6	2.5*E3	9.9*E5
90	35	4.6*E9	4.6*E6	2.3*E5	6.5*E6

Nota: A los 60 días se alimentaron ambos lotes, el análisis a los 90 días corresponde a la etapa final de la operación.

Con respecto a la evolución de SSV se observa que a 35⁰C se tiene un rápido incremento, pero a partir de los 25 días se pierde biomasa y se incrementa el IVL (Fig. 5.1.3).

A 25⁰C no hay aumento de SST y después de 81 días hay pérdida de biomasa. El IVL baja muy poco, todavía dentro del margen que debe tener el IVL de lodos activados (Fig. 5.1.3).

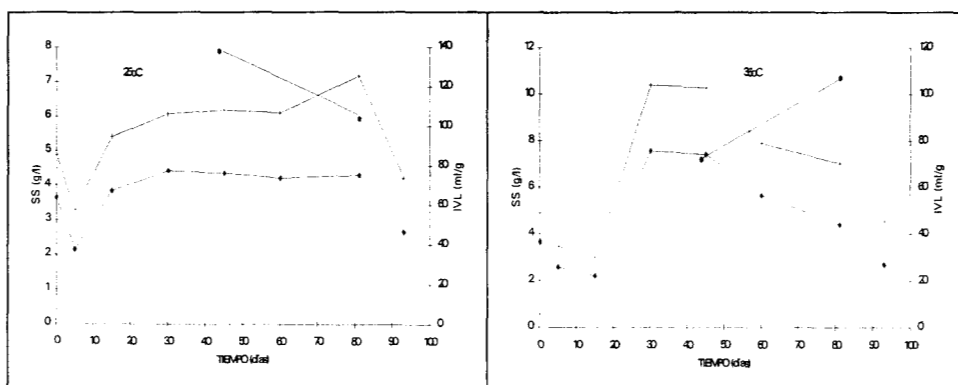


Fig. 5.1.3 Comparación de los sólidos e Índice Volumetrico de Lodos, a) Lote incubado a 25°C, b) Lote incubado a 35°C. SST (+), SSV (◇) e IVL (o).

En lodos activados frescos no fue posible determinar el IVL ya que los granos son muy esponjosos y con mala sedimentabilidad. A los 30 días en ambos lotes se mejoró el, siendo de 138 ml/g para el lote incubado a temperatura ambiente y de 72 ml/g para el incubado a 35°C.

A partir de los 61 días se agregó acetato, en la figura 5.1.4 se observa que la actividad específica con acetato, después de que fueron alimentados, el lote incubado a 35°C tiende a incrementarse con el tiempo a diferencia del lote incubado a 25°C el cual parece estabilizado en los dos últimos muestreos. Esto se explica ya que la temperatura de 35°C es la óptima para los procesos anaerobios.

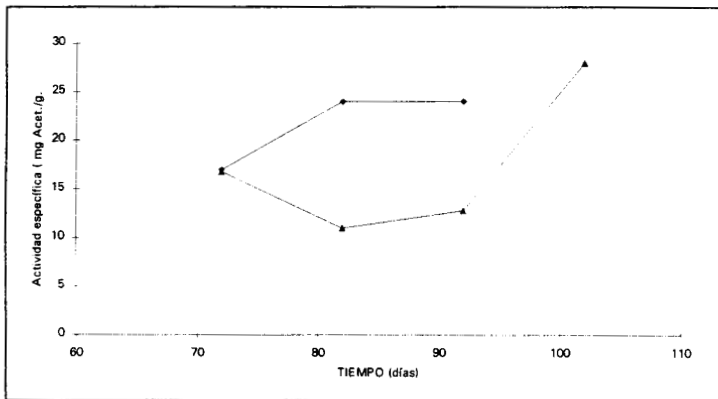


Fig. 5.1.4 Comportamiento de las actividades específicas de ambos lotes una vez que fueron alimentados, (◊) Lote incubado a 25°C y (Δ) Lote incubado a 35°C.

CONCLUSION

La temperatura de adaptación definitivamente es mejor a 35°C ya que se logra una duplicación de los sólidos de 5 a 17 g/l en 25 días.

Pero no se observó el mismo efecto en las cuentas bacterianas, ya que las cuentas bacterianas son iguales en ambas temperaturas. Sin embargo se debe decir que las actividades obtenidas son 30 veces mas bajas que las esperadas (0.02 a 0.2 gCH₄/DQO/gSSV.d), por lo que se concluye que se requiere mayor tiempo de incubación.

5.2

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ALIMENTACION DE LODOS ACTIVADOS CON ACETATO SOBRE SU TRANSFORMACION EN LODOS INOCULO.

HIPOTESIS

SE ESPERA QUE EL LOTE ALIMENTADO CON ACETATO TENGA MAYOR ACTIVIDAD METANOGENICA Y MEJOR SEDIMENTABILIDAD QUE EL LOTE QUE NO ES ALIMENTADO.

OBJETIVO

COMPARAR EL EFECTO DE LA ALIMENTACION EN LA PRODUCCION DE INOCULOS ANAEROBIOS A PARTIR DE LODOS ACTIVADOS.

METODOLOGIA

En este experimento se partió también de lodos activados procedentes de la planta piloto de Ciudad Universitaria de la UNAM y se formaron dos lotes de 4 l cada uno. Ambos lotes fueron incubados a 35°C durante 2 meses, con y sin alimentación (acetato de sodio 3g/l). En el lote alimentado se siguió el consumo de acetato por cromatografía de gases, en el momento que desaparece el sustrato se alimenta de nuevo el lote. A ambos lotes se les analizaron cada 15 días las actividades específicas, los SSV y el IVL. La composición microbiana se analizó al inicio y final del experimento.

RESULTADOS

Durante las cuatro alimentaciones se puede observar un consumo lento del acetato, con una actividad específica promedio de 0.040 mmol de acetato/gSSV·d, 2.55 mg DQO/gSSV·d y con una producción intermedia de acetato (1ª alimentación). Esta producción se puede deber a la fermentación de los productos de la lisis bacteriana (Figura 5.2.1).

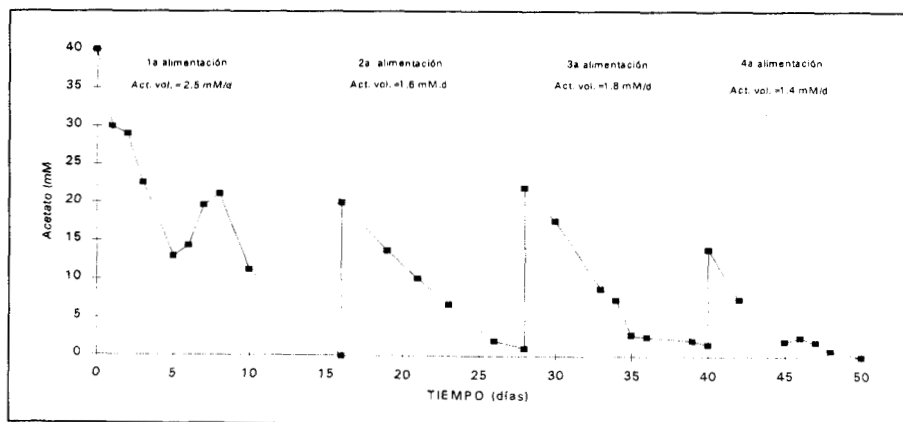


Figura 5.2.1 Comportamiento de lote durante las cuatro alimentaciones con una actividad específica promedio de 0.04 mmol Acet./gSSV·d ó 2.55 mg DQO/gSSV·d.

Se puede concluir que en el sistema de lote alimentado para producir lodos inóculo a partir de lodos activados, la actividad del lodo se muestra constante y baja (2.5 mM/d o 39 mgDQO/gSSV·d).

Las mediciones de actividad específicas realizadas en el lote alimentado muestran que a los tiempos 0 y 15 días de incubación hay un aumento en la concentración de acetato (que es un comportamiento parecido al del reactor durante el primer lote alimentado) mientras que el propionato y butirato no son consumidos (Fig 5.2.2) En la tercera medición se observa una baja tendencia hacia el consumo de acetato pero no sucede lo mismo con el propionato y butirato. Después de 50 días de adaptación se midió la actividad y se observó que en 6 horas el lodo no se ha adaptado por completo, ya que el inóculo no es capaz de consumir el sustrato en 6 horas

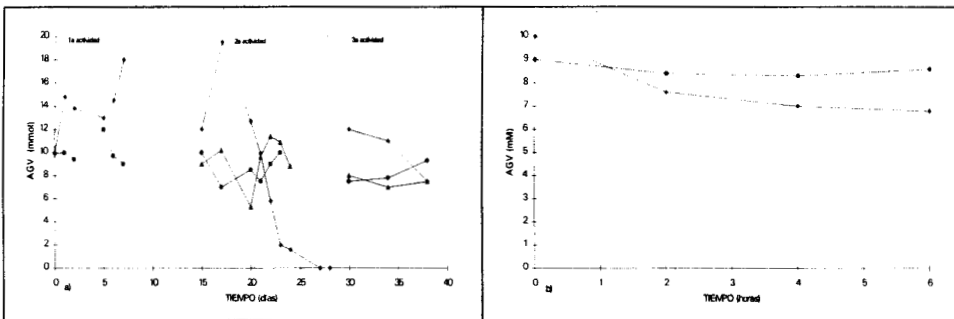


Figura 5.2.2 Actividades en el lote alimentado, a) Tres primeras actividades y b) Cuarta medición de actividad a los 50 días. (◊) Acetato, (o) Propionato y (Δ) Butirato.

La figura 5.2.3 muestra el segundo proceso para producir lodos inóculos, que consiste en un cultivo por lote sin alimentación. Las actividades metanogénicas del lodo a los 0, 15 y 30 días de incubación, muestran un comportamiento parecido al lote alimentado (Figura. 5.2.2a), indicando que existe una producción de acetato durante los primeros días de incubación. Este aumento en la concentración de acetato que aparece repetidamente en el experimento de lote alimentado, podría deberse, como ya se mencionó, a una lisis celular (Figura. 5.2.3a).

La figura 5.2.3b muestra la actividad metanogénica a los 50 días. Se observó que no hubo degradación de acetato en las 6 horas de prueba.

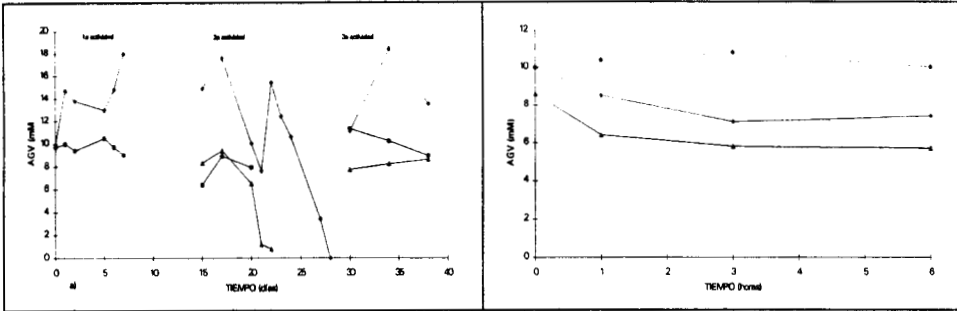


Figura 5.2.3. Actividades en el lote sin alimentar a) Tres primeras actividades y b) Cuarta medición a los 50 días. (◊) Acetato, (○) Propionato y (Δ) Butirato.

El lote alimentado muestra un aumento constante en el contenido de SSV, mientras que el lote sin alimentar presenta variaciones tanto en el contenido de SST como de SSV, observándose al final que en el lote alimentado el contenido de SSV es mayor con respecto al lote sin alimentar (Figura 5.2.4a,b). Conforme pasa el tiempo de incubación el IVL en estos lotes disminuyen hasta 92 ml/g para el lote alimentado y de 109 ml/g para el lote sin alimentar (Figura 5.2.4a,b).

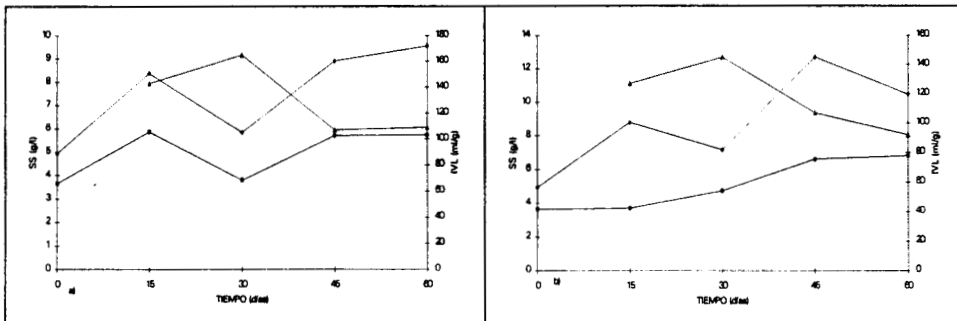


Figura 5.2.4 Contenido de sólidos e Índice Volumétrico durante la experimentación, a) Lote sin alimentar y b) Lote alimentado. SST(◊),SSV(○) eIVL(Δ).

En la figura 5.2.5 se puede observar que en el lote alimentado predominan las bacterias utilizadoras de hidrógeno mientras que los otros grupos bacterianos apenas contribuyen con un 1.5% del total de la población cuantificada. En el lote sin alimentar la mayor parte de la población cuantificada está constituida de bacterias BMH y BMA, mientras que las OHPA-P y OHPA-B apenas contribuyen con un 3.6% del total de la población.

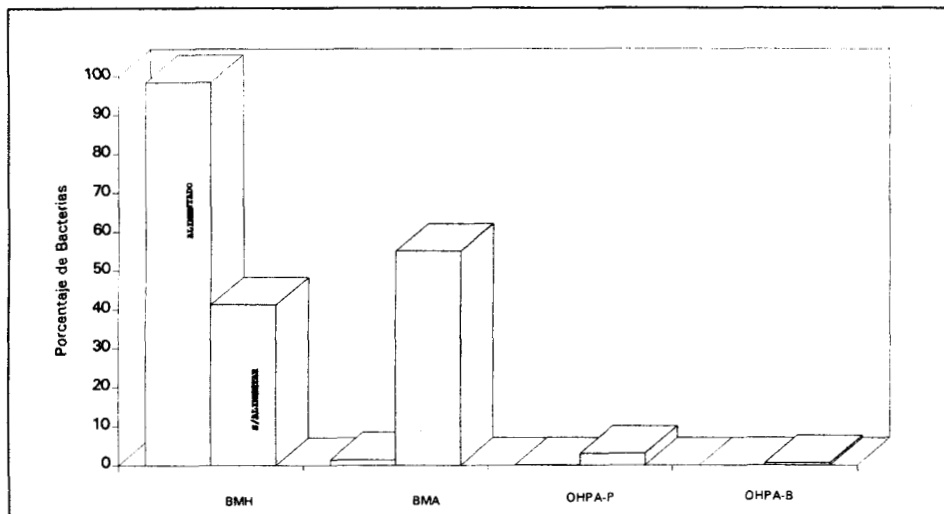


Figura 5.2.5 Evolución de las poblaciones microbianas en ambos lotes estudiados.

CONCLUSIONES

Con la metodología probada se consigue mejorar las características microbiológicas y físicas de los lodos activados, aunque faltaria buscar otras alternativas, para mejorar los resultados obtenidos en estos experimentos, así como probar estos inóculos en reactores UASB y evaluar si se mejora el tiempo de arranque.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que un lodo activado fresco requiere de por lo menos 15 días para consumir el sustrato, ya que la cantidad y actividad de los microorganismos anaerobios presentes son muy bajas.

5.3

PRODUCCION DE INOCULOS ANAEROBIOS EN REACTORES UASB AGITADOS

HIPOTESIS

AL ADAPTAR LODOS EN UN REACTOR UASB CON AGITACIÓN Y COMO SUSTRATO UNA MEZCLA DE ACETATO:GLUCOSA, SE ESPERA QUE LA ACTIVIDAD Y SEDIMENTABILIDAD SE MEJOREN

OBJETIVO

OBTENCION DE UN INÓCULO ANAEROBIO CON BUENAS CARACTERISTICAS DE SEDIMENTABILIDAD Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA A PARTIR DE UN LODO CON BAJAS ACTIVIDADES METANOGENICAS

INTRODUCCION

Para un buen funcionamiento del sistema UASB se debe contar con un inóculo con buena sedimentabilidad (1m/h), compactación (IVL) y actividad metanogénica (k). Las fuentes de inóculo pueden seleccionarse mediante pruebas de actividad así como por el contenido de SSV. En la tabla 5.3.1 muestra diversas fuentes de inóculo en donde se puede ver que los lodos activados digeridos y los lodos anaerobios de lagunas de baja CARGA tienen valores bajos de SSV y de k . El lodo que presenta las mejores características como inóculo es el lodo granular, ya que cuentan con una buena actividad específica así como un alto contenido de SSV.

Cuando no se cuenta con un lodo granular es posible adaptar lodos activados a condiciones anaerobias, ya que en él se encuentran pequeños microambientes anaerobios (Guyot, 1993, Wu *et al.*, 1987) que pueden desarrollarse hasta convertirse en lodos anaerobios de alta actividad metanogénica específica (1gDQO/gSSV d) con alta sedimentabilidad (1m/h) y compactación (IVL) menor de 40 ml/g.

TABLA 5.3.1 Actividad metanogénica específica y concentración de diversos tipos de lodos (Field, 1986)

TIPO DE LODO	ACTIVIDAD METANOGENICA ESPECIFICA k (gCH ₄ DQO/g SSV·d)	CONCENTRACION TIPICA DE SSV EN EL LODO (g/l)
Lodo granular	0.5 a 1.5	70 a 120
Biopelícula de Filtro anaerobio	0.4 a 1.2	ND
Lodos activados digeridos	0.02 a 0.2	15 a 40
Estiércol digerido	0.02 a 0.08	20 a 80
Lodo fosa séptica	0.01 a 0.07	10 a 50
Laguna anaerobia	0.03	30
Estiércol fresco de puerco	0.001 a 0.02	30 a 140
Sedimento de laguna	0.002 a 0.02	20 a 50

Para lograr este tipo de lodo es necesario suministrar una fuente de carbono que permita que se desarrollen todas las poblaciones implicadas en la digestión anaerobia (bacterias acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas) y que a la vez permita un amplio desarrollo de las bacterias filamentosas (*Metanosaeta sp*) responsables de dar estructura a los conglomerados anaerobios.

Por otro lado se debe crecer el inóculo bajo una presión selectiva para obligar a las bacterias a que resistan el arrastre de las velocidades ascendentes del medio, de esta manera aquellas poblaciones que no desarrollen características de adhesión y sedimentabilidad serán arrastradas fuera del reactor.

METODOLOGIA.

Se montaron dos reactores UASB 4.5 l de volumen de trabajo, con un agitador de impulsores girando a 1 RPM para mantener a los lodos en suspensión dado que la baja producción de gas que se espera de ellos en el periodo de operación, no será suficiente para suspenderlos (Figura. 5.3.1).

Los reactores se inocularon con 3.25 l (R1) y 3.52 l (R2) de lodos procedentes de un reactor UASB tratando aguas residuales de la UAM-I con una actividad específica de 0.05 gDQO/gSSV.d. La alimentación se realizó con un medio sintético formado por el medio mineral de Balch *et al.* (1979) y una mezcla de glucosa-acetato de sodio (1:1) como fuente de carbono. La temperatura de operación fue de 35°C en cuarto oscuro.

Este reactor operó a un TRH de 2 días, la carga inicial de ambos reactores fue de 0.47 Kg DQO/m³/d (Bv), que fue modificada cada vez que los reactores llegaron a una estabilidad en el porcentaje de eliminación de la DQO, tales cargas volumétricas fueron 0.64, 1.44, 2.66, 4.77 y 7.39 Kg DQO/m³.d.

Los análisis realizados fueron los siguientes:

a) Cada vez que hubo cambio de carga se analizaron los SST, SSF, SSV, IVL, actividad metanogénica acetoclástica y se hicieron observaciones en microscopía de epifluorescencia a 420 nm. A los 187 y 213 días de operación se realizaron las actividades a dos niveles del lecho de lodos (capa superior y capa inferior).

b) Análisis de los reactores: DQO total y soluble (entrada y salida), pH (entrada, salida) y lodos, potencial redox.

Etapa 2. Después de 185 días de operación el lodo del reactor 2 se usó como inóculo para un nuevo reactor que operó con lactosa (DQO 2g/l), a partir de este día se usó solamente un reactor.

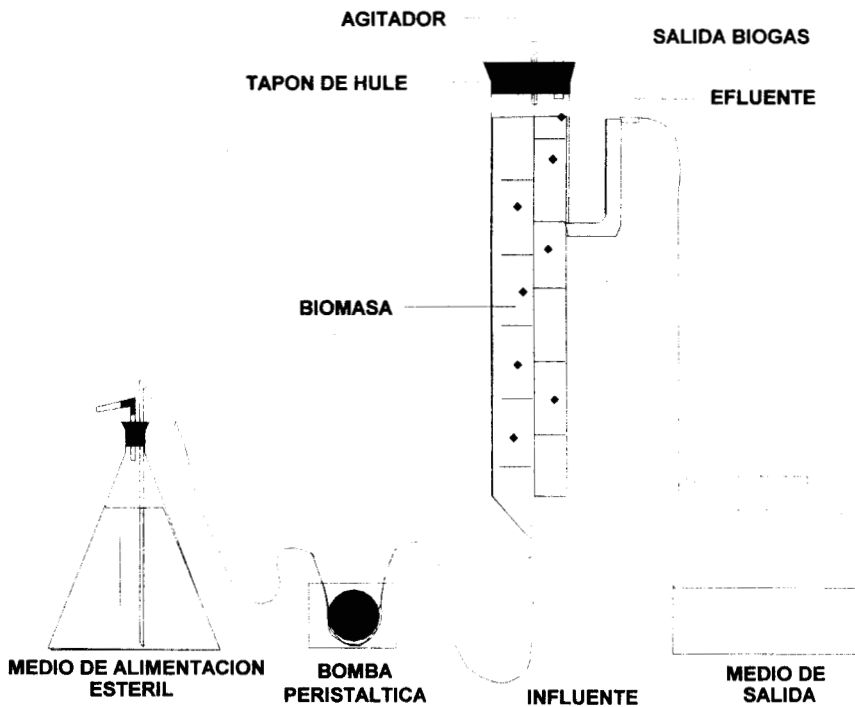


Figura 5.3.1. Reactor UASB, con sistema de agitación para sólidos en suspensión.

Se probó otra metodología para producir inoculos, que consistió en adaptar lodos activados de una planta de tratamiento de una zona industrial en Toluca (EPCCA), con un contenido de SSV de 21.08 g/l, IVL de 54.6 ml/g y una actividad específica acetoclástica de 0.038gDQO/gSSV·d y agua residual de una fábrica de levaduras con una DQO de 6 g/l, SST de 16 g/l, SSF de 9 g/l y SSV de 7 g/l, un pH promedio de 5.59. Se procedió a adaptar los lodos aumentando paulatinamente la concentración de DQO.

RESULTADOS

En la Fig. 5.3.2. se muestra el comportamiento de los digestores a lo largo del tiempo. Se aprecia el aumento paulatino en la concentración de DQO alimentada y las eficiencias obtenidas. Se puede observar el comportamiento idéntico de los dos reactores.

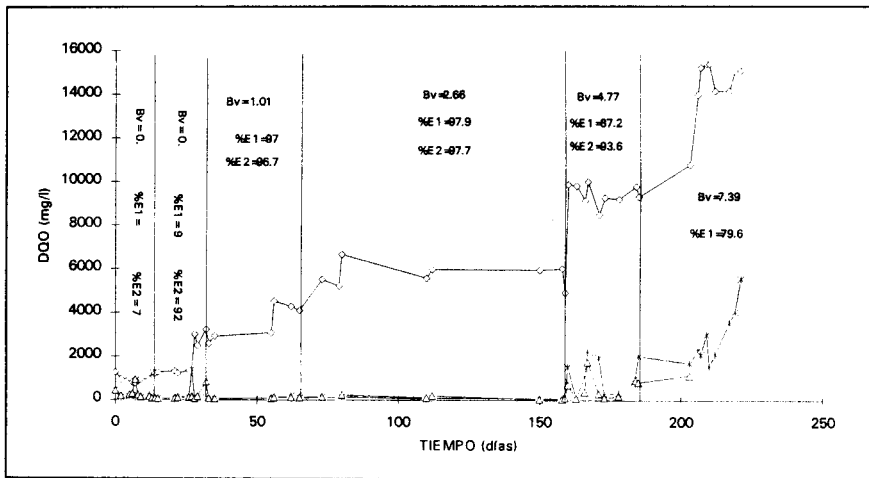


Fig.5.2 Comportamiento de la eficiencia de remoción de la DQO a diferentes cargas volumétricas. DQO_E (◇), DQO_S Reactor 1 (Δ) DQO_S Reactor 2(-)

En la Fig. 5.3.3 se muestran los resultados obtenidos durante el tiempo de operación. Como se puede observar la eficiencia de remoción es inherente con la carga

volumétrica, obteniéndose una máxima eficiencia a una carga de 2.66 KgDQO/m³·d (R1= 97.9%, R2= 97.7%).

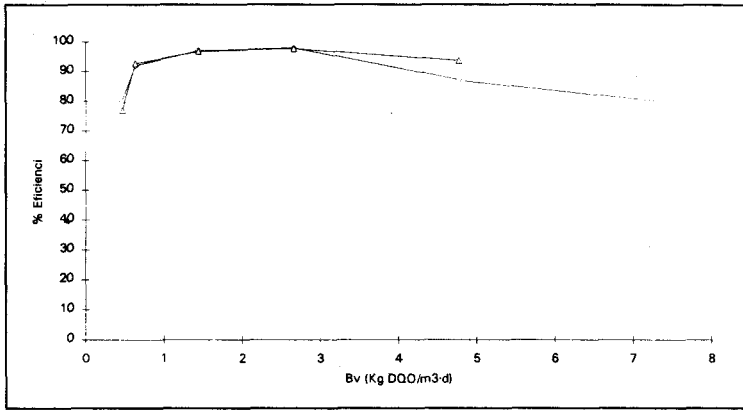


Fig. 5.3.3 Comportamiento de la eficiencia de remoción de la DQO a diferentes cargas volumetricas. Reactor 1 (◊), Reactor 2(Δ).

El análisis de los lodos nos muestra que a medida que se consume sustrato la biomasa se incrementa en ambos reactores (Fig. 5.3.4).

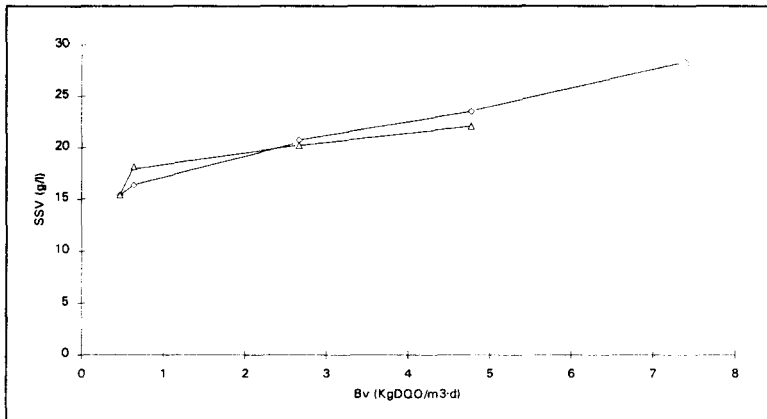


Fig. 5.3.4. Evolución de los SSV con las diferentes cargas volumétricas probadas. Reactor 1 (◊), Reactor 2 (Δ).

La Fig. 5.3.5 muestra la actividad específica de los lodos, la cual se incrementa en función de la Bv. Si el lodo que se encuentra en la capa inferior recibe el efluente con mayor concentración de materia orgánica que la capa superior, se esperaría una mayor actividad en la capa superior con respecto a la capa inferior. Los resultados obtenidos muestran que esto no ocurre, ya que las actividades específicas en ambas capas presentarán un comportamiento irregular, sin embargo se consiguió la máxima actividad con una Bv de 4.7 Kg DQO/m³d (0.399 gDQO Ac./gSSV·d en la capa superior, 0.307 gDQO Ac./gSSV en la capa inferior para el reactor 1 y 0.419 gDQO Ac./gSSV·d en la capa superior, 0.537 gDQO Ac./gSSV en la capa inferior del reactor 2).

Mientras que en el momento que se incrementa la Bv a 7.39 Kg DQO/m³d se observa una caída en la actividad del lodo en ambas capas 0.260 gDQO Ac./gSSV·d en la capa superior y 0.184 gDQO Ac./gSSV·d en la capa inferior.

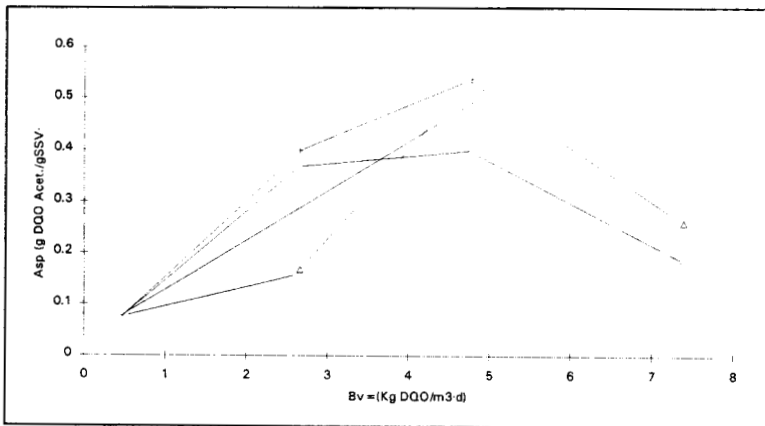


Fig 5.3.5 Evolución de las actividades específicas con las diferentes cargas volumétricas probadas. Reactor 1 capa superior (◇), Reactor 1 capa inferior (Δ), Reactor 2 capa superior (X), Reactor 2 capa inferior (+).

El Índice Volumétrico de Lodos (IVL) se encuentra en el intervalo reportado por Lettinga et al. (1980) 20-40 ml/g para un lodo flocculento. La figura 5.3.6 muestra que después de una mejoría del IVL con $B_v=0.5 \text{ Kg DQO/m}^3\text{d}$ a medida que se aumenta la carga se pierde la compactación, aunque queda dentro del intervalo mencionado.

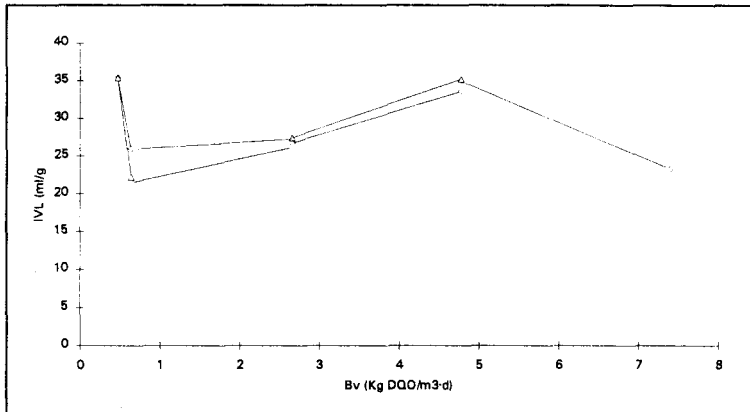


Fig. 5.6 Comportamiento del Índice volumétrico de lodos a las diferentes cargas volumétricas probadas. Reactor 1 (◊), Reactor 2 (Δ).

En la Figura 5.7 se muestra el comportamiento del pH de los lodos el cual se mantuvo en el intervalo reportado para que se lleve a cabo la metanogénesis (6.5-7.2). La figura 5.8 muestra el comportamiento del potencial redox. Aunque la literatura reporta un Eh de -300 mV dentro del gránulo (Kennedy, 1983), el valor que se obtiene fue medido en el seno del líquido y es posible que dentro del grano se tengan valores más bajos.

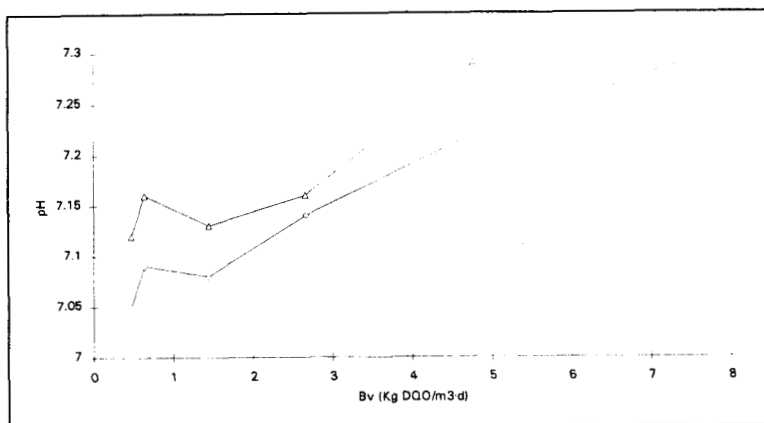


Fig. 5.3.7 Comportamiento del pH con las diferentes cargas volumétricas probadas. Reactor 1(◇), Reactor 2 (Δ).

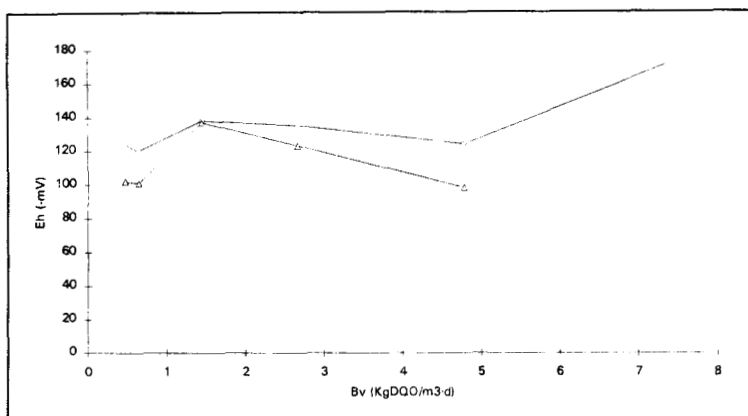


Fig. 5.3.8 Comportamiento del potencial redox con las diferentes cargas volumétricas probadas. Reactor 1(◇), Reactor 2 (Δ).

Con este lodo se procedió a inocular un reactor UASB el cual fue alimentado con lactosa con una DQO de 2g/l. Como muestra la figura (5.3.9) este reactor presentó una rápida estabilización al agua residual a partir del primer día de operación, lo que nos indica que las características del inóculo producido en este experimento son satisfactorias para disminuir el tiempo de arranque de este tipo de reactores.

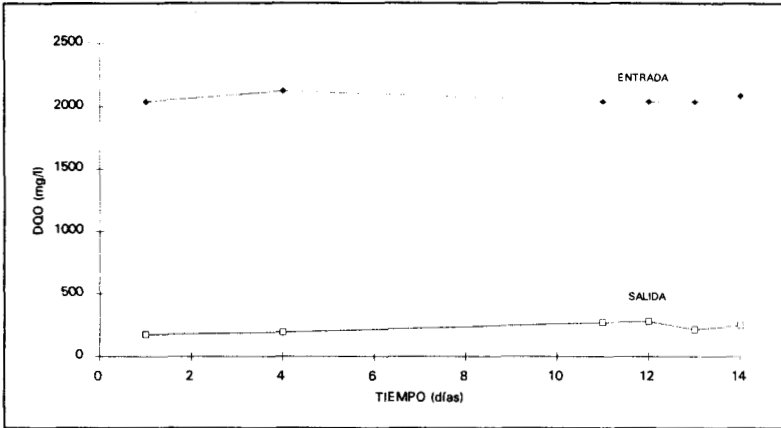


Fig. 5.3.9 Arranque de un reactor UASB alimentado con lactosa.

La figura 5.3.10 muestra los resultados obtenidos durante el arranque de un reactor UASB inoculado con lodo adaptado con agua residual de una fabrica de levaduras y alimentado con agua residual de la misma levadura. Como se puede observar el lodo se va adaptando paulatinamente logrando eficiencias del 71.1 % al final del tiempo de operación.

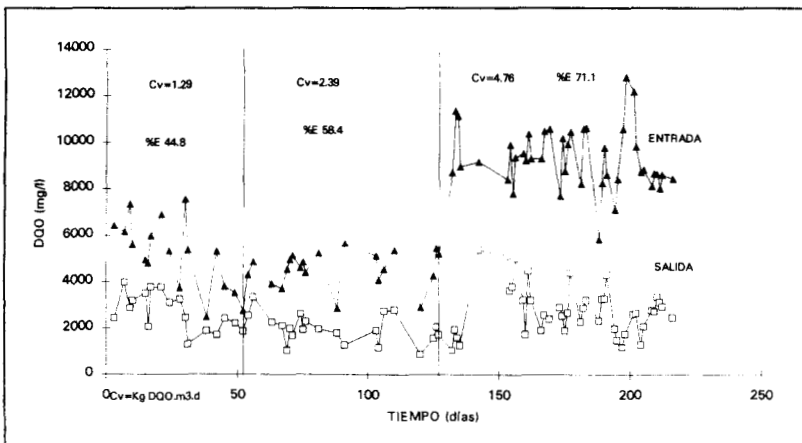


Fig. 5.3.10 Arranque y operación de un reactor UASB alimentado con agua residual de una fabrica de levaduras

CONCLUSIONES

El inóculo producido mediante este proceso presentó gránulos de aproximadamente 1 mm de diámetro, de forma irregular y de color negro. La presencia de gránulos tan pequeños puede ser debida a la erosión producida por la agitación mecánica así como a la alta producción de biogas, el cual arrastraba las partículas desgastandolas.

Una observación al microscópio de los lodos nos indicó una gran presencia de bacterias del tipo *Methanosaeta spp*, las cuales juegan un papel impotante en el proceso de granulación, formando centros de agregación o colonizando las cavidades formadas por *Methanosarcinas* (Schmith. 1996).

El cuadro 5.3.2. muestra las características del lodo producido en este estudio comparado con los valores de otros lodos reportados en la literatura. Como se puede observar el lodo producido presenta una cantidad de SSV (28g/l) y una actividad metanogénica comparable con la reportada por Noyola (1994).

CUADRO 5.3.2. Comparación de inóculos.

	SSV (g/l)	Act. gDQO/gSSV-d
Lettinga (1980) gránulos		0.8-1.0
De Zeeuw (1981)	40	0.15
Hulshoff Pol (1983) gránulos	20	2.2
Noyola (1994) gránulos	70-120	0.5-1.5
Ramírez (1996) L.A.	35.4	0.19
En este estudio	28	0.537

Los inóculos producidos con las diferentes metodologías requieren del mismo tiempo para lograr una buena eficiencia de remoción de la DQO requerida (150 días) para una carga volumétrica de 4.77 KgDQO/m³d.

5.4

ARRANQUE DE UN REACTOR UASB ALIMENTADO CON VINAZAS DE CAÑA

HIPOTESIS

EL ARRANQUE Y ESTABILIZACION DE LOS REACTORES UASB DEPENDE ENTRE OTRAS COSAS DEL INOCULO, EL CUAL DEBE CONTAR CON BUENAS CARACTERISTICAS DE SEDIMENTACION Y ACTIVIDAD POR LO QUE SE ESPERA QUE LOS LODOS INOCULO PRODUCIDOS EN EL LABORATORIO REDUZCAN EL TIEMPO DE ARRANQUE Y ESTABILIZACION DE LOS REACTORES UASB

OBJETIVO

DETERMINAR EL TIEMPO DE ARRANQUE DE UN REACTOR UASB ALIMENTADO CON VINAZAS E INOCULADO CON LODOS PRODUCIDOS EN UN SISTEMA POR LOTES

INTRODUCCION

Las vinazas son la fracción pesada obtenida en el proceso de destilación de alcohol (Durán *et al.* 1991). Tienen un contenido elevado de materia orgánica altamente caramelizada de sólidos suspendidos y de sales, especialmente K^+ y SO_4^- como se puede ver en la tabla 5.4.1.

CUADRO 5.4.1. CARACTERISTICAS DE VINAZAS
(Noyola, A. 1996)

Parámetro	Intervalo	Promedio
pH	3.5-5.7	4.2
Temperatura °C	80-105	94
Acidos grasos volátiles	0.7-5.5	2.18
Azúcares reductores	14-45	26.50
Nitrógeno total	0.6-8.9	1.78
Nitrógeno orgánico	0.06-8.7	1.94
Nitrógeno amoniacal	0.04-0.89	0.26
Sodio	0.13-2.51	1.04
Potasio	4.80-22.59	10.73
Calcio	1.26-6.70	3.52
Magnesio	0.66-2.35	1.63
Fósforo	0.026-0.326	0.168
Cloruros	0.68-7.39	3.79
Sulfatos	1.56-6.60	4.36
Hierro	0.001-0.120	0.090
Cobre	0.004-0.030	0.014
Zinc	0.027-0.225	0.115
DQO	15-176	77.7

Todos los valores estan en g/l, excepto pH y temperatura

Dadas las características de las vinazas, su tratamiento por vía biológica y fisicoquímica ha sido impracticable, por lo que tradicionalmente estos efluentes se descargan en los cuerpos receptores después de un proceso de enfriamiento (de 90°C a 35°C) causando un impacto ecológico muy negativo (Vibhash, 1989 y Durán *et al.*, 1991).

Las vinazas pueden ser tratadas por medio de digestión anaerobia, disminuyendo así el impacto al ambiente. En Brasil, las vinazas producen $1.3 \times 10^9 \text{ m}^3$ de CH_4 por año, que se usa junto con el bagazo para lograr la autonomía energética que tienen los ingenios azucareros y alcoholeros (Souza, 1991).

Los filtros anaerobios pueden ser considerados como una buena opción de pretratamiento, se han obtenido eficiencias del 58-78% (Carrondo *et al.*, 1983). También se han tratado estos efluentes con reactores UASB en condiciones mesofílicas (Craveiro *et al.*, 1986).

Se sugiere un efecto inhibitorio en el tratamiento de estos tipos de efluentes, por la presencia de altas concentraciones de potasio (Rodríguez y Monroy, 1990) McCarty (1964) reporta un efecto altamente inhibitorio a concentraciones mayores de 12 g/l de potasio; así como la presencia de sulfatos, los cuales son utilizados por las bacterias sulfatoreductoras que compiten por los sustratos de las bacterias metanogénicas y producen sulfuro de hidrógeno que es inhibitorio de la digestión anaerobia.

METODOLOGIA

En este trabajo se empleó un reactor UASB con un volumen útil de 2.3 litros. El reactor fue inoculado con 500 ml de lodos anaerobios adaptados mediante un procedimiento reportado por Guyot (1990) a partir de lodos activados de purga, con un contenido de SSV de 9 g/l lo cual nos dió una concentración dentro del reactor de 3.9 g/l, con un tiempo de retención de 48 horas.

La alimentación se realizó con vinazas del ingenio azucarero de Tambaca., San Luis Potosí, cuya caracterización se muestra en la tabla 5.4.2, diluida con el fin de disminuir la cantidad de potasio y neutralizar hasta valores cercanos a pH 7 con bicarbonato.

CUADRO 5.4.2. CARACTERIZACION DE VINAZAS

DQOt 127.7	DQOs 122.8	STT 89.9	STF 24.5	STV 65.0	SST 3.57	SSF 1.0	SSV 2.56	N-NH ³ 0.18	NTKt 1.23	SO ₄ ⁼ 5.76
S ⁼ 1.20	Na ⁺ 0.14	K ⁺ 8.12	Li 0.04	P-PO ₄ 0.64	Pb [*] 0.60	Zn [*] 2.80	Mn [*] 6.16	Ni [*] 0.80	Cu [*] 1.40	pH 4.23

Unidades= g/l, *mg/l

Los análisis realizados durante la operación del reactor fueron los siguientes: Sólidos (SST,SSF,SSV), DQO (entrada y salida), IVL, pH, potencial redox, alcalinidad (entrada y salida), conteos de los grupos bacterianos por el método del número más probable (NMP), azúcares de los lodos por el método de Dubois (1956), proteínas de los lodos por el método de Sedmarck (1976), actividad específica según Guyot (1989) y producción de metano por cromatografía de gases.

RESULTADOS

La tabla 5.4.3 y figuras 5.4.1 y 5.4.2. muestran los resultados obtenidos durante el tiempo de operación.

El reactor se operó 103 días durante los cuales se observaron diversos eventos que influyeron en la operación y en los resultados, se obtuvo una estabilidad del reactor a partir del día 69. Esta estabilización se caracterizó por una serie de etapas que influyeron en el comportamiento de los parámetros medidos.

ETAPA 0. PUESTA EN MARCHA DEL REACTOR.

En esta etapa se diluye la vinaza hasta una DQO total de 3 g/l con la que se alimenta a una carga volumétrica = 1.5 Kg DQO/m³.d. El medio es complementado con 100 mg/l de bicarbonato para dar un pH de 6.3. Se alcanzó una eficiencia promedio de 64.7% (Fig 6.1). El pH de los lodos se mantiene en 6.8 y el de salida es 8.5 (figura 5.4.2). El potencial redox se encuentra lejos del reportado para la metanogénesis alcanzando al final de esta etapa un valor de -45 mV . La eficiencia promedio para la remoción de DQO, sólidos totales y volátiles es de 64.7, 73.46% y 83.64% respectivamente y la producción de metano es de 2.5 l/l.d.

**CUADRO 5.3 RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LA OPERACION DEL
REACTOR UASB ALIMENTADO CON VINAZAS DE CAÑA**

	ETAPA 0	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	ETAPA 4
DQO _E (mg/l)	3041	3021	4761	5023	5071
DQO _S (mg/l)	1063	2028	1691	2994	2400
Bv (KgDQO/m ³ ·d)	1.5	1.5	2.4	2.5	2.5
N%	65	31	64	40.7	53
I CH ₄ /gDQO	0.25	0.46	0.47	0.50	0.64
I CH ₄ /gDQOr	0.25	0.46	0.11	0.14	
T °C	35	35	35	25	35
Bo (mg/l)	100	0	100	100	200
pH _E	6.3	5.8	6.1	5.9	6.3
pH _s	8.3	8.3	8.1	7.3	8.0
pH _i	6.8	6.7	6.9	6.2	7.0
Alcalinidad Ent (mgNaHCO ₃ /l)	29.48	30.34	31.69	36.67	32.13
Alcalinidad Sal. (mgNaHCO ₃ /l)	84.43	85.75	103.52	85.31	121
%rem SST	73.46	25.57	35.20	37.65	8.84
%rem SSV	83.64	19.57	42.78	51.07	11.5

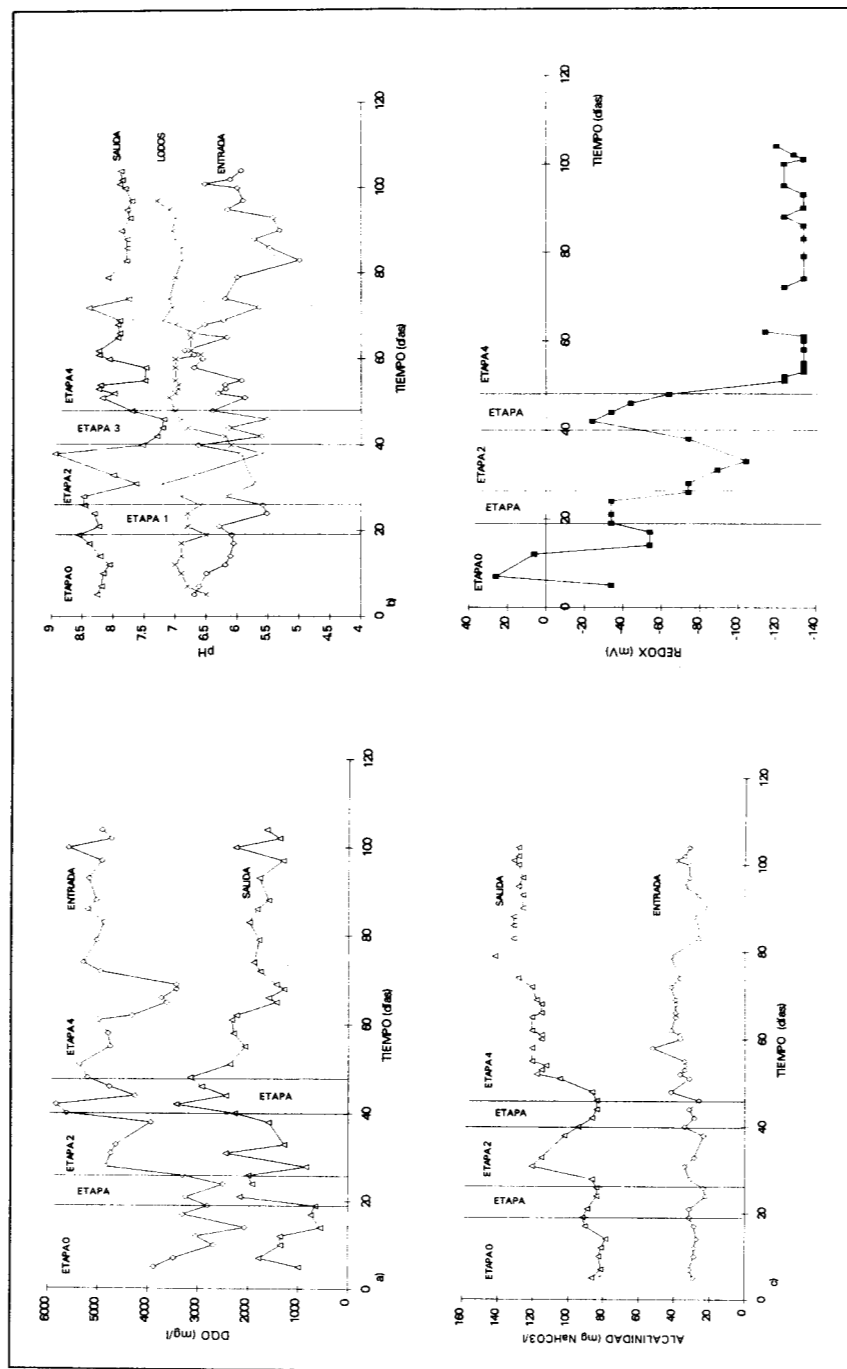


Figura 5.4.1 Parámetros analizados durante el tiempo de operación del reactor a) DQO b) pH c) Alcalinidad d) Potencial redox

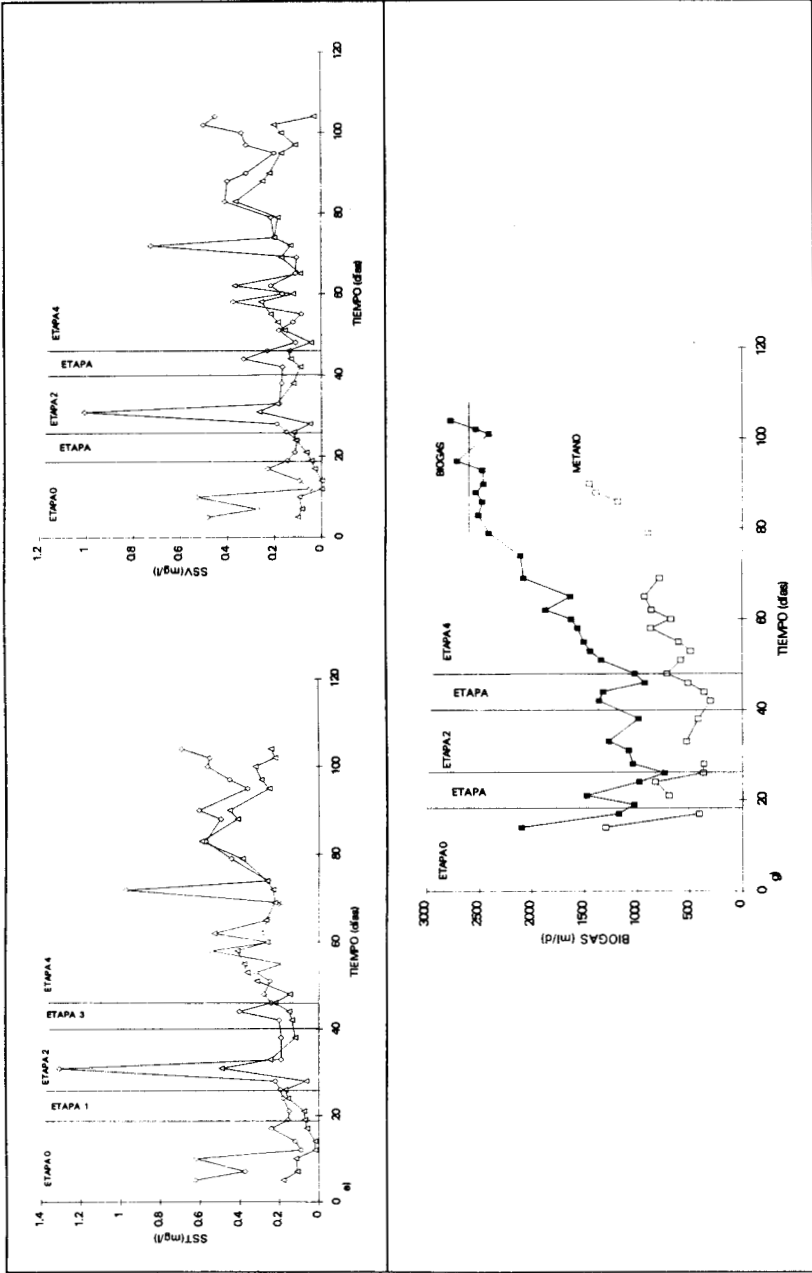


Figura 5.4.2. Parámetros analizados durante el tiempo de operación del reactor e) SST f) SSV g) Biogas

ETAPA 1.

En esta etapa se suspendió la adición de bicarbonato a la alimentación a partir del día 19 de operación, a pesar de que la eficiencia decayó hasta un 31.7%, no se observó una variación en la alcalinidad. Aunque el pH del medio bajó a 5.5, mientras que el de los lodos se mantiene en 6.7. El potencial redox bajó a -90 mV pero aún se encuentra lejos del óptimo. La remoción de sólidos se ve muy afectada durante esta etapa, disminuyendo a 25.57% los ST y 19.57% los SV.

ETAPA 2.

En esta etapa se aumentó la S_0 a 4.8 g DQO/l lo que corresponde a una $C_v = 2.4$ g DQO/m³·d y se reanudó la adición de 100 mg/l de NaHCO₃. Durante esta etapa se obtuvo una remoción de DQO del 64.1. El potencial redox presenta fluctuaciones en las lecturas obteniendo un valor promedio de -85 mV al finalizar esta etapa. La producción de gas no se incrementa con la nueva carga obteniéndose en promedio un litro de biogás con un contenido de metano de 47.38% (516 ml CH₄). La capacidad de remoción de sólidos no recupera los valores obtenidos durante la etapa 0.

ETAPA 3.

Se disminuyó la temperatura de 35°C a 25°C durante 8 días y se observa un efecto negativo en la eficiencia de remoción que disminuye hasta 40.7 %. El pH también se ve afectado pues decae hasta 6.2 en el lecho de lodos. La alcalinidad se mejora a la salida y aumenta hasta 103.52 mg NaHCO₃/l. El potencial redox que en la etapa anterior había registrado un valor de -85 mV, se eleva bruscamente a -22 mV al inicio de esta etapa para registrar un valor de -58 mV al finalizar la misma. La capacidad de remoción de sólidos se mejora ligeramente de 35.65% a 37.65% para sólidos totales y de 42.78% a 51.07% para sólidos

volátiles. El biogas al igual que las etapas anteriores presenta grandes fluctuaciones en las lecturas, registrándose en promedio 1.16 l/d de biogas con un bajo contenido de metano (37.65%).

ETAPA 4.

Durante esta etapa se operó a 35°C y se aumentó la cantidad de NaHCO₃ en la alimentación a 200 mg/l, esta etapa marcó la estabilidad del proceso, ya que los valores de remoción se mantuvieron estables durante toda esta etapa, obteniéndose una remoción promedio de 53 %. El pH de los lodos se mantiene en 6.9, mientras que la alcalinidad también se ve beneficiada ya que mejora sus valores en la salida a 121 mg de NaHCO₃, así como el potencial redox el cual registra un valor de -123 mV al finalizar esta etapa. La producción de biogás va en incremento obteniéndose al final 2.53 l/d. Aquí podemos constatar la influencia importante de la temperatura y la necesidad de controlar este parámetro.

ANALISIS DE LODOS

CONTEOS BACTERIANOS.

En aguas residuales que contienen altas concentraciones de sulfatos es posible que las bacterias metanogénicas sean desplazadas por las bacterias sulfatoreductoras, por lo que es indispensable conocer las proporciones de ambos grupos en nuestro reactor.

La figura 5.4.3 muestra las proporciones de bacterias metanogénicas con respecto a las sulfatoreductoras, como se puede observar las bacterias metanogénicas en el inóculo representan el 60% de las poblaciones cuantificadas, mientras que al final del experimento estas son más del 90% del total de las poblaciones cuantificadas.

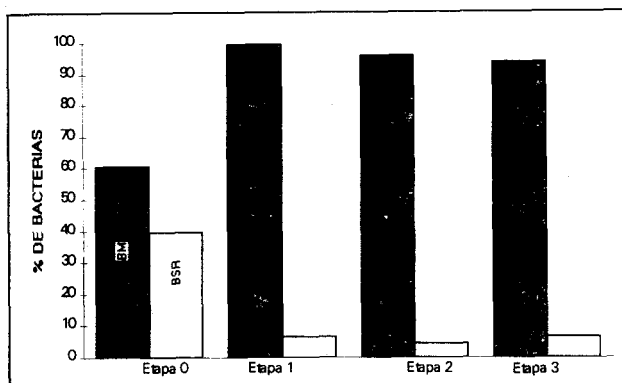


Fig.5.4.3. Porcentajes de las poblaciones cuantificadas en el reactor.

TABLA 5.4.3 CONTEOS BACTERIANOS
(No. DE BACTERIAS/g SSV)

METANOGENICAS

	Etapa 0	Etapa 1	Etapa 3	Etapa 4
ACETATO	2.64×10^8	9.9×10^7	1.86×10^{11}	1.33×10^{10}
HIDROGENO	4.87×10^8	1.99×10^{10}	1.33×10^{12}	1.33×10^{11}
PROPIONICO	9.74×10^7	ND	ND	ND

SULFATOREDUCTORAS

ACETATO	4.72×10^8	5.7×10^5	6.92×10^{10}	4.23×10^8
HIDROGENO	1.95×10^7	ND	8.0×10^8	ND
LACTATO	1.39×10^9	1.28×10^8	4.25×10^{10}	5.9×10^9
PROPIONICO	4.72×10^8	ND	ND	ND

AZUCARES Y PROTEINAS.

Los análisis de azúcares y proteínas en los lodos muestran un incremento durante el período de operación, siendo mayor la cantidad de azúcares (750 mg/gSSV) que de proteínas (175 mg/gSSV) posiblemente debido a la naturaleza del agua residual (figura. 5.4.4).

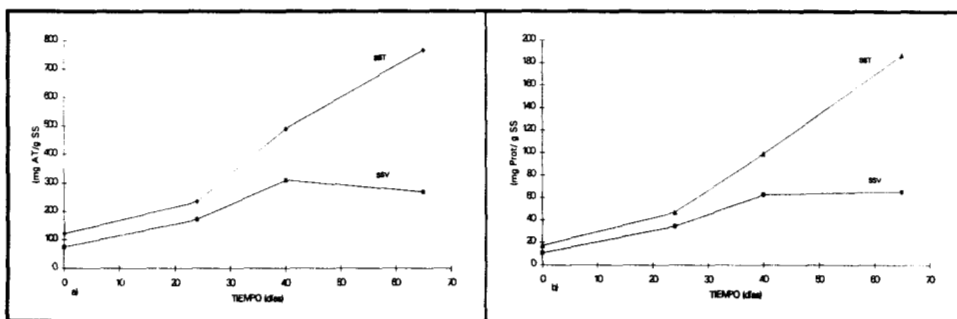


Figura 5.4.4 Contenido de azúcares y proteínas en los lodos

ACTIVIDADES ESPECIFICAS.

La actividad específica de la microflora presenta una pérdida durante la etapa 1 para los sustratos probados (acetato de 92.1 a 61.4; propionato de 90 a 67.5 y butirato de 189.3 a 94.6 gDQO/gSSV·d). A partir de la etapa 2 se observa un incremento de las actividades, obteniéndose al final una actividad de 2026.2 gDQO/gSSV·d para acético, 631.3 gDQO/gSSV·d para propiónico y 3106.9 gDQO/gSSV·d para butírico (figura 5.4.5).

Observamos en la figura 5.4.3 que la cantidad de bacterias metanogénicas es constante a partir de la etapa 1; entonces la actividad específica no está relacionada con el perfil de evolución de la cantidad de estas. Esto parece indicar que hay un aumento de las actividades microbianas, sin implicar necesariamente un incremento en el número de individuos.

Este fenómeno de desacoplamiento entre el metabolismo energético de las bacterias y su crecimiento celular, fue observado anteriormente por Guyot et. al. (1988), al estudiar los lodos granulares alimentados con ácidos grasos volátiles. También observamos que la actividad específica de las bacterias que degradan el propionato es inferior a la actividad de las bacterias acetoclásticas y de las utilizadoras de butirato, lo que concuerda con las observaciones previas de Guyot et. al (1988). Sin embargo la cinética de degradación del butirato parece similar a la del acetato, lo que nos hace pensar que una acumulación de ácidos grasos volátiles en el digestor será la etapa limitante para la degradación del propionato.

TABLA 5.4.4 ACTIVIDADES ESPECIFICAS
(mg DQO/gSSV.d)

SUSTRATO	Etapa 0	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Acético	92.1	61.4	222.3	2026.2
Butírico	90.0	67.5	180.1	3106.9
Propiónico	189.3	94.6	246.1	631.3

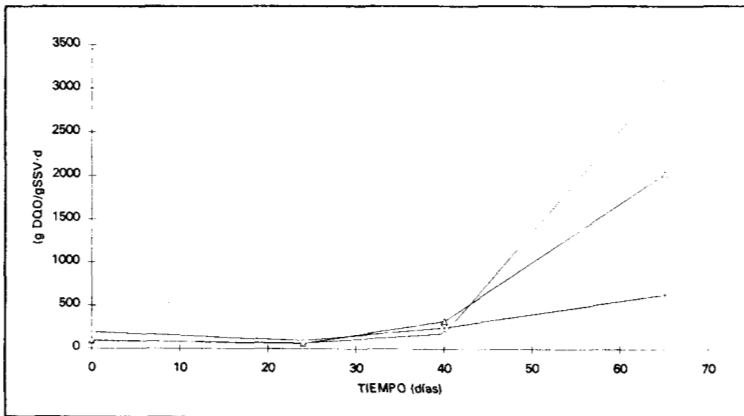


Figura. 5.4.5 Actividades específicas realizadas a diferentes tiempos de la operación del reactor. Acético (Δ), Propiónico (x) Butírico (◊)

SSV.

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se mantienen en un intervalo de 61-73%, durante todo el periodo de operación; aunque en la etapa 3 se observa un decremento de SSV a 35.08%, en la siguiente etapa (la 4) los SSV presentan un porcentaje parecido a la etapa 2 (figura 5.4.6).

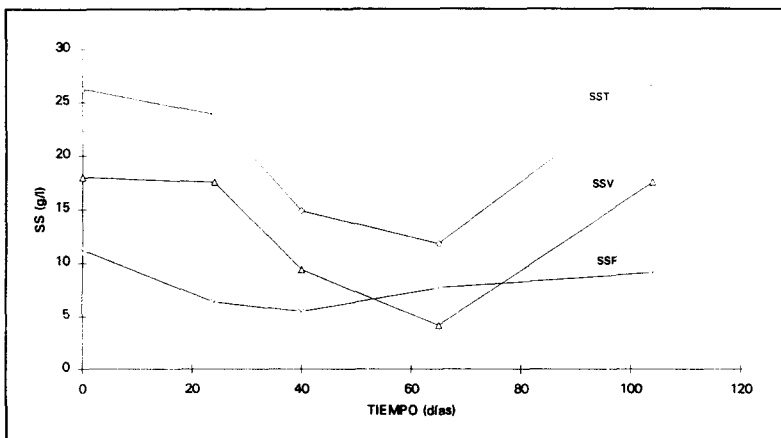


Figura 5.4.6 Evolución de los sólidos durante el tiempo de operación

IVL

El IVL empieza en 40 ml/g, en la etapa 2 y 3 cuando los SSV bajan a 5 g/l el IVL se incrementa a 80 ml/g. Al final del experimento se observa un incremento en el contenido de SSV (30g/l) obteniéndose un IVL de 40.47 ml/g el cual es un valor característico de un lodo flocculento (figura 5.4.7)

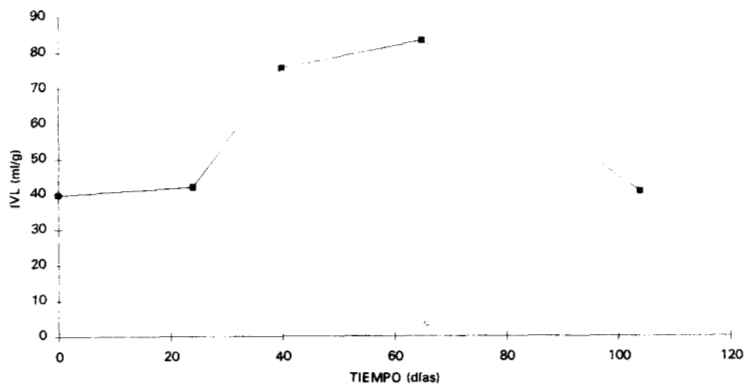


Figura 5.4.7 Evolución del Índice Volumetrico de Lodos

CONCLUSIONES

Con sistemas UASB se obtuvo una eficiencia del 52% con una carga orgánica de 5.7 Kg DQO/ m³ d (Moreno.1990). En nuestro experimento se logró alcanzar una eficiencia del 53%, pero a una carga volumétrica inferior Cv 2.54 Kg DQO/ m³ d .

Debido a la concentración de sulfatos presentes en las vinazas se sugiere que hay un efecto competitivo por la utilización de sustratos entre las bacterias metanogénicas y las sulfatorreductoras, pero los resultados obtenidos en este experimento nos muestran que la cantidad de sulfatorreductoras es inferior a las metanogénicas (figura 5.4.3) (93.5% de BM y 6.5% de BSR), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Durán *et al* 1991 (96% de BM y 4% de BSR). Con lo que podemos concluir que la concentración de sulfatos involucrados en la DQO utilizada en el proceso (<1g) no favoreció de manera significativa el crecimiento de bacterias sulfatorreductoras; presentandose una coexistencia entre ambos grupos.

Por otro lado la actividad acetoclástica obtenida al final del experimento, es semejante a la reportada por Guyot *et al.* (1988) (2148 mgDQO/gSSV·d) para efluentes sintéticos sin sulfato. La actividad que se obtuvo con acetato es de 2026 y para el butirato es de 3106 mgDQO/gSSV·d. En el caso del ácido propiónico, la actividad obtenida al final es

de 631 mgDQO/gSSV·d, la cual es inferior a la reportada por Guyot *et al.* (1988) 1035 mgDQO/gSSV·d.

Los parámetros temperatura de operación y bicarbonatos presentes en el efluente tienen un efecto importante sobre la eficiencia del proceso, ya que en el momento que se modifica cualquiera de ellos la eficiencia se ve afectada de manera importante (Cuadro 5.4.2).

5. CONCLUSIONES GENERALES

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se logro comprobar o rechazar algunas de las hipótesis planteadas. A continuación se concluye sobre dichas hipótesis:

La temperatura permite una rápida duplicación de los SSV sin observarse una diferencia significativa en las poblaciones bacterianas metanogénicas y acetogénicas, 4.8×10^9 para el lote incubado a 25°C y 4.6×10^9 para el lote incubado a 35°C , así como en su actividad la cual se encuentra lejos de lo reportado por Field (1986) para lodos activados digeridos ($0.02-0.2 \text{ gCH}_4\text{DQO/gSSV.d}$). La diferencia en el aumento de los SSV se puede deber al crecimiento de las bacterias fermentativas, las cuales no fueron cuantificadas.

La conclusión que se obtiene de este experimento es que la temperatura por si sola no mejora las características microbiológicas y físicas de los lodos activados.

Así mismo al momento en que se controla la temperatura a 35°C y se alimentan los lodos activados se observa que en el lote alimentado se obtuvo un mayor número de bacterias 1.82×10^{12} con respecto a un lote sin alimentar 7.2×10^9 . Se observó que la alimentación también favorece el índice volumétrico de lodos de 120 a 92 ml/g para el lote alimentado y 109 ml/g para el lote sin alimentar, pero sin llegar a obtener los valores reportados por Lettinga, 20-40 ml/g para lodos floculentos (1980).

Se puede concluir entonces que la temperatura y alimentación en conjunto juegan un papel importante en el acondicionamiento de lodos activados para la obtención de inoculos anaerobios, mejorandose así sus características microbiológicas y fisicoquímicas.

Bajo condiciones de agitación y cambio paulatino de carga volumétrica se consiguió mejorar las actividad específica del inóculo de 0.08 a $0.537 \text{ gDQO/gSSV.d}$, valor que se encuentra dentro del reportado por Noyola (1994) para gránulos. Con respecto al contenido de sólidos e índice volumétrico de lodos, el inóculo presentaba ya buenas características, 15.39 g/l de SSV y un IVL de 35.43 ml/g. El inóculo producido con esta metodología permitió reducir el tiempo de arranque de un reactor UASB alimentado con

lactosa (Fig. 5.9), ya que presentó buenas eficiencias desde el primer día de operación (Cuervo 1995) Otra forma de adaptar lodos se hizo mediante un proceso por lote recirculando el efluente de levaduras, a los 30 días se pudo iniciar la operación en continuo.

Al comparar las estrategias de producción de inoculos, en reactores agitados con un efluente sintético y en sistema en lote con un efluente industrial (agua residual de la fabricación de levaduras) se llega a la conclusión de que los inoculos obtenidos con ambas estrategias requieren del mismo tiempo para alcanzar las eficiencias de remoción de la DQO, 150 días, con una carga volumétrica de 4.77 KgDQO/m³.d.

En el reactor UASB alimentado con vinazas se consiguió una eficiencia de remoción de la DQO del 53% con una carga volumétrica de 2.54 KgDQO/m³.d. Con este tipo de efluentes se sugiere un efecto inhibitorio de las bacterias metanogénicas por el H₂S producido por las sulfatoreductoras. Sin embargo los resultados obtenidos nos muestran que la cantidad de bacterias sulfatoreductoras es mucho menor que las metanogénicas (Fig 6.3) con lo cual podemos concluir que no se presentó competencia por los sustratos entre ambos grupos bacterianos sino mas bien una coexistencia.

Así podemos concluir que el inóculo utilizado en el reactor UASB alimentado con efluentes de levaduras permitió alcanzar un tiempo corto de estabilización, parecido al reportado por Mendoza y García (1992). Además presentó una mayor proporción de bacterias metanogénicas con respecto a las sulfatoreductoras, lo cual concuerda con los datos reportados por Moreno (1990).

6. BIBLIOGRAFIA

- Adebowale O. 1991. Effect of seed type on UASB reactor start-up. Sixth International Symposium on anaerobic digestion. Posters Abstract Sao Paulo Brasil 12-16 Mayo.
- Alibhai K.R.K and Foster C.F. 1986. Physicochemical and biological characteristics of sludge produced in anaerobic upflow sludge blanket reactors. *Enzyme Microb. Technol.* 8:601-606.
- APHA. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. Edited by. Clesceri. L.S., Greenberg A.E. and Trussell R.R. 1985.
- Balch W.E., Fox G.E. Magrum L.J. Woese C.R. and Wolfe R.S. 1979. Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Review* 43:260-296.
- Carvalho J.L., Souza M.E and Vieira S.M.M. 1991. Studies for reducing the start-up time of UASB reactors. Sixth International Symposium on anaerobic digestion. Posters Abstract Sao Paulo Brasil 12-16 Mayo.
- Carrondo, M.J., J.C. Silva., M.I.I. Figueira., R.M.B. Ganho and J.F.S. Oliveira. 1983. Anaerobic filter treatment of molasses fermentation wastewater. *Water Science Technology*. Vol 15:117-126.
- Craveiro, A.M., H.M. Soares and W. Schimidell. 1986. Technical Aspects and Cost estimations for Anaerobic Systems Treating Vinasse and Brewery/soft drink wastewater. *Water Science and Technology*. 18(12):123-134.
- Cuervo F. 1995. Digestión anaerobia de lactosa: Efecto del potencial de amortiguamiento y comparación con un modelo cinético. Tesis de M. en Biotecnología. Pp. 109.
- Dubois, M. *et al*, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. pp 350-356.
- Durán C., Noyola A., Poggi H. and Zedillo L.E. 1991. Biodegradation of process industry wastewater. Case problem: Sugarcane industry. In *Biological Degradation of wastes*. Elsevier Applied Science. pp 363-388.
- Ehlinger, F., Gueler I., Ball F.X. and Prevot C. (). Treatment of less vinasses of red wine by methanogenic fermentation in presence of tannins and sulphides.
- García J.L. 1990. Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 87: 297-308.
- García J.L. 1991. Ecología de inóculos anaerobios específicos en el tratamiento de aguas residuales. En *Memorias del II Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria cafetalera*. Manizales, Colombia.
- Gorris, L.G.M., and Van der Drift C. 1986. Methanogenic cofactors in pure culture of Methanogens in relation to substrate utilization. in *Biology of Anaerobic Bacteria*. Edited by H.C. Dubourguier *et. al*. Elsevier Science Publisher. B.V., Amsterdam. Printed in The Netherlands.
- Guiot S., Pauss A. and Costerton W. 1991. A structured model of the anaerobic granule consortium. Sixth International Symposium on anaerobic digestion. Posters Abstract Sao Paulo Brasil 12-16 Mayo.

- Guyot, J.P., A. Noyola, F. Ramirez y O Monroy. 1988. Actividades Metanogénicas de Lodos Granulares de un Digestor de Lecho de Lodos. Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia. Medellín Colombia. Año VIII. No.1:23-32.
- Guyot, J.P. 1988. Microbiología de la digestión anaerobia. Apuntes del curso sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales . Microbiología y Bioquímica. Medellín Colombia. pp 1-87.
- Guyot J.P., Fajardo C., Noyola A., Barrena C. 1989. Study of the transformation to an adapted anaerobic inoculum for anaerobic digestion. In: Microbiology and biotechnology of strict anaerobies involved in interspecies nitrogen transfer. pp 385-386.
- Guyot, J.P. 1990. Introducción a la Microbiología de los Digestores Anaerobios . Memorias de las Conferencias Sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en América Latina. Noviembre 8 y 9 de 1990. pp 1-13.
- Guyot, J.P. *et al.* 1990. Evolution of microbial activities and population in granular sludge from an UASB reactor. Biotechnology Letters. Vol 12(2) 155-160.
- Guyot J.P., Gutierrez G., Rojas M.G. 1993. Anaerobic microbial counts of different potential anaerobic inocula. Appl Microbiol Biotechnol. 40: 139-142.
- Hilton, M.G. and D.B. Archer. 1988. Anaerobic Digestion of Sulfate-Rich Molasses Wastewater: Inhibition of Hydrogen Sulfide Production. Biotechnology and Bioengineering. Vol 31:885-888.
- Hulshoff Pol. L.W., Zeeuw W.J. Velzeboer C.T.M. and Lettinga G. 1983. Granulation in UASB reactors. Wat. Sci. Tech. 15:291-304.
- Jones W.S., Nagle. D.P. and Whitman W.B 1987. Methanogens and the diversity of archaeobacteria. Microb. Rev. 51:135-177.
- Lettinga G., Van Valsen A.F.M., Hobma S., De Zeeuw W.J., and Klapwijk A. 1980. Use of The Upflow Sludge Blanket (USB) Reactor concept for Biological Wastewater treatment, Especially for Anaerobic Treatment. Biotech. and Bioeng. (XXII) 699-734.
- Lettinga G., Zeeuw W.J., Hulshoff L.H. Hobma S.W., Grin P.C., Wiegant W.M., Van Valsen A.F.M., Koster I.W. 1982. Anaerobic wastewater treatment using the UESB treatment. Process. Memorias del Segundo simposio: Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por fermentación UAM/ICAITI Guatemala.
- Lettinga G., Roersma B. and Grin P. 1983. Anaerobic treatment of raw domestic sewerage at ambient temperature using a granular bed UASB reactor. Biotech. and Bioeng. 25:1701-1723.
- Lettinga G. and Hulshoff-Pol. W. 1991. UASB-Process Design for Various types of Wastewaters. Wat. Sci. Tech. 4(24)87-107.
- Macarie H., Noyola A. 1990. Anaerobic digestion of a Petrochemical wastewater using the UASB process. Appl Biochem and Biotech 24/25: 579-589.
- Mahoney. E.M., Varangu. L.K., Cairns. W.L., Kosaric N. and Murray R.G.E. 1987. The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. Wat. Sci. Tech. 19:249-260.
- Moreno, G., A. Noyola. 1990. Tratamiento de Vinazas de Alcohol de Caña con Reactores UASB: Arranque del Proceso y Reducción de su Inhibición. Memorias del VII Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Oaxaca Oax. pp 172-178.

- Noyola A. 1990. Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Una experiencia de adaptación de tecnología en México. Conferencia sobre tratamiento de aguas residuales en América Latina. UAM México. pp 337-358.
- Noyola A. 1994. diseño, Inoculación y arranque de reactores UASB. En III Taller y seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo Uruguay pp 133-143.
- Porres, C. y J.F. Calzada. 1990. Planta Piloto para el Tratamiento de Vinazas de Destileria. En Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en América Latina. Ciudad de México. 247-256.
- Sedmark, S.S. 1976. Análisis para Proteínas con Coomassie: Usando el Azul Brillante de Coomassie G-250 con Acido Perclórico. Analytical Biochemistry Academic Press, Inc 79.
- Schmidt J.E. and Ahring B.K. 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering* **49**:29-246.
- Souza, M.E., G. Fuzaro and A.R. Polegato. 1991. Thermofilic Anaerobic Digestion of Vinasse in Pilot Plant UASB. Sixth International Symposium on anaerobic digestion. Posters Abstrac Sao Paulo Brasil 12-16 Mayo.
- Vibhash, K. Y. and D.B. Archer. 1989. Sodium Molybdate Inhibits Sulphate Reduction in Anaerobic treatment of high-sulphate the molasses wastewater *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:103-106.
- Visser A. 1995. The anaerobic treatment of sulphate containing wastewater. Doctoral Thesis. Wageningen Agricultural University. Wagwningen The Netherlands Cap. I.
- Woese C. 1977. Archaeobacterias. *Ciencia.* **44**:48-61.
- Wu W., Hu J., Gu X., Khao H., Gu G. 1987. Cultivation of anaerobic granular sludge in UASB reactor with aerobic activated sludge as seed. *Wat. Res.* **21**:789-799.

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

a) Medio de cultivo para actividades y cuentas bacterianas (Balch *et al.* 1979).

	para 1 litro de medio
Solución mineral 1	40 ml
Solución mineral 2	40 ml
Solución de vitaminas	10 ml
Solución de oligoelementos	10 ml
Solución NiCl ₂ (5mg/l)	10 ml
Solución FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 ml
Resazurina (0.1%)	1 ml
NaHCO ₃	2 g
Extracto de levadura	1 g
Peptona de caseína	1 g
Cisteína	0.5 g
Aforar a un litro con agua	

SOLUCIONES

a) Solución mineral 1

	g/l
K ₂ HPO ₄	6

b) Solución mineral 2

	g/l
KH ₂ PO ₄	6
(NH ₄) ₂ SO ₄	6
NaCl	12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.16

c) Solución de vitaminas

	mg/l
Biotina	2
Acido fólico	2
Piridoxina HCl	10
Tiamina HCl	5
Riboflavina	5
Acido nicotínico	5

DL-ácido pantoténico	5
Vitamina B12	0.1
Acido p-aminobenzoico	5
Acido lipóico	5

d) Solución de oligoelementos

Disolver 1.5 g de ácido nitrilotriácetico en agua destilada, ajustar el pH con KOH a 6.5, después agregar los siguientes minerales.

	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5
NaCl	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
CoSO ₄ o CoCl ₂	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
ZnSO ₄	0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
AlK(SO ₄) ₂	0.01
H ₃ BO ₃	0.01
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01

Conservar en refrigeración

e) Soluciones madre de AGV.

Se preparan soluciones madre 0.5 M de cada ácido a probar.

f) Solución de sulfuro de sodio.

Se pesaron 2.5 g de sulfuro de sodio y se disolvieron en 100 ml de agua reducida. Dentro de la cámara anaerobia se vació esta solución en botellas serológicas, posteriormente se sacaron las botellas de la cámara y se esterilizaron por 15 minutos a 120°C.