
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA



Casa abierta al tiempo

**BIODEGRADACION ANAEROBIA EN DOS ETAPAS DE
ALQUILBENCEN SULFONATO DE SODIO
EN UN REACTOR UASB.**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en biotecnología

PRESENTA:

Ing. Jesús Terreros Mecalco

Director: Dr. Oscar Monroy Hermosillo.

Asesor: Dra. Florina Ramírez Vives.

La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y ademas cuenta con apoyo del mismo Consrejo, con el convenio 471-0.

Iztapalapa, D.F., México
Septiembre de 2003

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa **aprobó la tesis** que presento:

Ing. Jesús Terreros Mecalco

Comité tutorial:

Director: _____
Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Asesora: _____
Dra. Florina Ramírez Vives

Sinodal: _____
Dr. Ernesto Favela Torres

Sinodal: _____
Dr. Alejandro Olmos Dichara (UAMI)

Sinodal: _____
Dra. Patricia Olguín Lora (IMP)

Agradecimientos

Muy en especial, a mi director de tesis el Dr. Oscar Monroy Hermosillo que con mucha paciencia resolvió y aclaró mis dudas, y sobre todo por apoyarme en todo momento.

A la Dra. Florina Ramírez Vives, por sus observaciones, comentarios y sobre todo por el tiempo dedicado a la revisión de ésta tesis.

Al Dr. Alejandro Olmos Dichara, por brindarme un poco de su tiempo en la mejora de éste documento.

A la Dra. Patricia Olguín Lora, por brindarme su apoyo, por sus comentarios y observaciones y sobre todo por el tiempo dedicado a la revisión de ésta tesis.

Al Dr. Ernesto Favela Torres, por su valioso tiempo, por sus comentarios, sus observaciones y correcciones de ésta tesis.

A la Dra. Monica Meraz, por sus valiosos consejos y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Margarita Salazar, por brindarme ese espíritu de lucha en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, que hicieron en todo momento un ambiente agradable de trabajo.

A esta Casa de estudios, por brindarme la oportunidad de superarme académica y profesionalmente.

Dedicatorias

A mi madrecita, que de manera muy especial dedico esta tesis y doy gracias profundamente por darme la vida, la felicidad, por sus cuidados, consejos y motivaciones y que a pesar de no estar ya en este mundo la llevo siempre presente en todo momento en mi mente y mi corazón. A donde quieras que estes quiero que sepas que **TE AMO Y TE RECORDARE HASTA EL ULTIMO MOMENTO DE MI EXISTENCIA...**

A mi padre, que a pesar de ser una persona muy aislada, que con sus regaños y lecciones hizo de mí una persona con espíritu de lucha y de provecho.

A Lupita, mi esposa por brindarme todo su apoyo y comprensión en todo momento a quien agradezco de todo corazón el formar parte de mi vida.

A mis hijos: Ana maría, Jesús y Lupita, a quienes amo con todo mi amor y quienes son la razón de mi vida, gracias les doy por estar siempre conmigo en todo lugar y en todo momento.

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Justificación	12
1.2 Objetivos	14
1.2.1 Objetivos particulares	14
1.3 Antecedentes	15
1.3.1 Surfactantes	16
1.3.1.1 Definición	16
1.3.1.2 Propiedades de los alquilbencen sulfonatos	18
1.3.1.3 Toxicidad	19
1.3.1.4 Química y manufactura	21
1.3.2 Digestión anaerobia	23
1.3.2.1 Descripción de la digestión anaerobia.....	23
a) Primera etapa; hidrólisis y fermentación	25
b) Segunda etapa; acetogénesis	27
c) Tercera etapa; metanogénesis	30
1.3.2.2 Reactor UASB	32
1.3.3 Hipótesis	35
2. MATERIAL Y MÉTODOS	36
2.1 Diseño experimental	37
2.2 Reactores	37
2.2.1 Funcionamiento de los reactores	38
2.3 Inóculo	39
2.4 Medio basal	40
2.5 Condiciones de operación	41
2.6 Muestreo	41
2.6.1 Muestra líquida	41
2.6.2 Muestra gaseosa	41
2.7 Análisis químicos	42
2.8 Técnicas analíticas.....	42
2.8.1 Demanda química de oxígeno	42
2.8.2 Cuantificación de lactosa	42
2.8.3 Determinación de alquilbencen sulfonato de sodio.....	43
2.8.4 Ácidos grasos volátiles	43
2.8.5 Biogás (CH ₄ y CO ₂)	44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45

3.1 Puesta en marcha de los reactores UASB en serie.....	46
3.1.1 DQO en los reactores UASB operados en serie	47
3.2 DQO en el reactor acidogénico	48
3.3 DQO en el reactor metanogénico.....	49
3.4 Operación en serie de los reactores UASB para la biodegradación del surfactante.....	49
3.4.1 Balance de DQO en los reactores	52
3.5 Eficiencia de remoción de la DQO en presencia del surfactante.....	53
3.5.1 Reactor acidogénico	54
3.5.2 Reactor metanogénico	55
3.6 Conversión de lactosa a AGV en los reactores UASB.....	56
3.7 Acumulación teórica de surfactante en los reactores.....	57
3.8 pH en el reactor acidogénico y metanogénico.....	59
3.8.1 pH en el reactor acidogénico.....	60
3.8.2 pH en el reactor metanogénico.....	61
3.9 Producción de AGV y su conversión a biogás en el reactor acidogénico.....	61
3.9.1 Producción de AGV en el reactor acidogénico.....	63
3.9.2 Producción de metano en el reactor acidogénico.....	63
3.10 AGV y su conversión a biogás en el reactor metanogénico.....	64
3.10.1 AGV, no convertidos a metano en el reactor metanogénico.....	66
3.10.2 Producción de metano en el reactor metanogénico.....	66
4. CONCLUSIONES	67
5. RECOMENDACIONES	70
6. BIBLIOGRAFÍA	72
7. ANEXOS	79
7.1 Demanda química de oxígeno	80
7.2 Curva estándar para DQO	81
7.3 Curva estándar para lactosa	83
7.4 Curva estándar para surfactante	85
7.5 Curva estándar para AGV	85
7.6 Composición del biogas	88

LISTA DE TABLAS

	Página
1.1a Producción de alquilbencenos lineales por región	13
1.1b Producción de alquilbencen sulfonatos por región	14
1.3 Antecedentes bibliográficos sobre la biodegradación de LAS	16
1.3.1.1 Clasificación de los surfactantes	17
2.3 Características del inóculo	39
2.4 Medio mineral RAMM	40
2.5 Condiciones de operación de los reactores UASB	41
2.7 Análisis determinados en el sistema de reactores UASB.....	42
3.1 Alimentación del reactor acidogénico	46
3.1.1 Alimentación del reactor metanogénico	46
3.4.1.1 Balance de DQO en el reactor acidogénico.....	52
3.4.1.2 Balance de DQO en el reactor metanogénico.....	52
3.7.1 Balance del surfactante en el reactor acidogénico.....	57
3.7.2 Balance del surfactante en el reactor metanogénico.....	58
7.2 Curva estándar para DQO	81
7.2a Parámetros para obtener la curva estándar de DQO	82
7.3a Parámetros para la curva estándar de lactosa	83
7.3b Parámetros para la curva estándar de lactosa	84
7.5.1 Preparación de la curva estándar de AGV	85
7.5.1.1 Acetato	86
7.5.1.2 Propionato	86
7.5.1.3 Butirato	86
7.5.2 Parámetros para determinar la curva estándar para AGV	87
7.6 Relación peso del tubo con el % de C H ₄	88

LISTA DE FIGURAS

	Página
1.3.2.1 Descripción de la digestión anaerobia	23
1.3.2.2 Representación del reactor UASB	34
2.1 Sistema de reactores en serie de la digestión anaerobia en dos etapas.....	37
2.2.1 Cuantificador digital de flujo de biogás	39
3.1.1 Eficiencia de remoción de la DQO en los reactores UASB operados en serie.....	47
3.2 Efic. de rem. de la DQO en el reactor acidogénico alimentado con lactosa y LAS.	48
3.3 Efic. de remoción de la DQO en el reactor metanogénico alimentado con acetato.	49
3.4.1 Eficiencia de remoción de la DQO en los reactores UASB operados en serie empleando lactosa y LAS como fuentes de carbono.....	53
3.4.2 Eficiencia de biodegradación del surfactante en los reactores UASB.....	53
3.5.1 Eficiencia de rem. de DQO y de biodeg. del surfactante en el reactor acidogénico..	54
3.5.2 Efic. de rem. de DQO y de biodeg. del surfactante en el reactor metanogénico..	55
3.6 Conversión de lactosa a AGV en los reactores UASB	56
3.7.1 Tendencia sobre la acumulación del surfactante en el reactor acidogénico.....	58
3.7.2 Tendencia sobre la acumulación del surfactante en el reactor metanogénico.....	58
3.8.1 pH en el reactor acidogénico	60
3.8.2 pH en el reactor metanogénico	61
3.9.1 Producción de AGV en el reactor acidogénico.....	63
3.9.2 Producción de CH ₄ en el reactor acidogénico.....	63
3.10.1 AGV no convertidos a metano en el reactor metanogénico.....	66
3.10.2 Producción de CH ₄ en el reactor metanogénico.....	66
7.2 Curva estándar para DQO	83
7.3 Curva estándar de lactosa	84
7.4 Curva estándar para el surfactante	85
7.5.2 Curva estándar para AGV	87
7.6 Curva estándar para el CH ₄	88

RESUMEN

Las aguas residuales producto de descarga de las industrias, zonas habitacionales, comercios, etc., son un tema de gran relevancia en el ámbito mundial debido a la magnitud de la problemática que esto representa desde el punto de vista ecológico y cuyos efectos negativos para el medio ambiente no son deseables. En la actualidad, el empleo de tecnologías limpias e idóneas juegan un papel muy importante para su tratamiento. La aplicación de procesos biológicos (aerobios y anaerobios) resulta ser una de las alternativas para cumplir con este propósito, aunado a ello nace la inquietud por aplicar uno de estos procesos biológicos (digestión anaerobia) para el tratamiento de aguas residuales con alta concentración de surfactantes aniónicos.

El hecho de que la digestión anaerobia se lleve a cabo en varias etapas debido a que las bacterias que intervienen: las fermentativas y las metanogénicas tienen necesidades y velocidades de crecimiento diferentes, permite que el proceso al separarse en etapas: una de acidificación y una de metanización sea más fácil de controlar, es decir que al llevarse a cabo la hidrólisis y fermentación de sustratos fácilmente hidrolizables como la lactosa en la primer etapa, permite controlar la acidogénesis evitando la acidificación del reactor metanogénico (Guyot, 1992).

Dentro de las principales ventajas de separar las etapas reside en una mejor estabilidad y control más eficaz de la digestión anaerobia (Van den Berg, 1984), por lo que la etapa de metanización se puede operar con una carga superior a la aplicada en un sistema monofásico, es decir, trabajar en los límites de la carga máxima aceptada (Ghosh, 1991), además de que la remoción de la DQO es 20% más alto que la de una etapa (Schwitezuebel and Peringer, 1986). Siendo que en un reactor monofásico al coexistir sustratos fácilmente hidrolizables, la desestabilización entre la producción y consumo de ácidos inhibe las bacterias metanogénicas.

Durante la metanogénesis además de producir CH_4 , se da lugar a la eliminación de hidrógeno gaseoso por medio de las bacterias hidrogénotróficas, regulándose la producción de ácidos a partir de las bacterias formadoras de estos controlando así el potencial redox de la fermentación ya que las bacterias acetogénicas y fermentativas recuperan el NAD^+ , permitiendo la producción de ácido acético sin afectar la digestión anaerobia (Mosey, 1983).

En el presente trabajo experimental, se estudió la biodegradabilidad de un surfactante aniónico alquilbencen sulfonato de sodio (LAS), probando dos concentraciones (200 y 300 mg/L) a diferentes intervalos de tiempo en un sistema de reactores UASB en dos etapas operados en serie con un tiempo de residencia hidráulica de 6 horas para el reactor acidogénico y un tiempo de residencia hidráulica de 1 día para el reactor metanogénico. El pH del medio de alimentación se ajustó a 7 con NaOH 1N, el sistema de reactores se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada a 35°C durante el tiempo que duro el experimento de biodegradabilidad del surfactante.

Durante una primer etapa del experimento, ambos reactores fueron operados en serie, pero debido a una sobreproducción de AGV en el reactor acidogénico, el reactor metanogénico se acidificó.

Aunado a ello se decidió separar ambos reactores y alimentar a cada uno de ellos con un sustrato diferente, lactosa para el reactor acidogénico y acetato para el reactor metanogénico a fin de recuperar la actividad metanogénica de este reactor.

Una vez que la actividad de la biomasa se recuperó, nuevamente es alimentado con el agua residual del reactor acidogénico, sin embargo al operar el sistema de reactores nuevamente en serie, por segunda ocasión el reactor metanogénico se acidificó. Por lo tanto, se decidió recircular una fracción del efluente del reactor metanogénico que junto con el efluente del reactor acidogénico se colectaron en un matraz erlenmeyer ajustando el pH de este medio a 7 con bicarbonato de sodio lo que permitió tener un mejor control de la digestión anaerobia

Con los resultados obtenidos, quedó demostrado que se dio lugar a una mayor acumulación de LAS en el reactor acidogénico con relación al reactor metanogénico, y que a pesar de ello las bacterias acidogénicas no perdieron totalmente su actividad, mientras que en la biomasa del reactor metanogénico ocurrió lo contrario disminuyendo significativamente su eficiencia de remoción de DQO hasta llegar a ser nula.

Al suspender el surfactante del medio de alimentación por un periodo aproximadamente de 70 días, se observó un fenómeno de desorción del surfactante acumulado en la biomasa de ambos reactores, recuperándose gradualmente la actividad bacteriana de los mismos conforme transcurrió el tiempo.

Así mismo, quedó demostrado que no es posible llevar a cabo la biodegradación del surfactante vía digestión anaerobia como se planteó en la hipótesis formulada en el experimento, es decir, que las bacterias acidogénicas serian capaces de transformar el surfactante y la lactosa dejando solamente AGV para el reactor metanogénico.

SUMMARY

The wastewater generated from industries, commercial and residential zones, etc., are a topic of great relevancy in the world due to the magnitude of the problems that they represents from the ecological and whose negative effects points of view undesirable on the environment.

In the present time, the clean and ideal technology employment plays a very important role in water treatment.

The application of biological processes (aerobic and anaerobic) along with anaerobic digestion especially to the residual waters with high concentration of anionic surfactants.

The fact of that the anaerobic digestion is carried out in several stages depending on the types of bacterias in the process: for example, the fermentative and the methanogenics have different growth speeds, permitting the process to be separated in stages: an of acidification and other of methanogenation wich will be easier to control.

Normally as the first stage the hydrolysis and fermentation of substrates easily hydrolysable such as lactose that permits to control the acidogenesis avoiding the acidification of the methanogenic reactor (Guyot, 1992).

The principal advantage of anaerobic reactor is stage separation for a better stability and more effective control of the anaerobic digestion (Van den Berg, 1984).

So it that the stage of metanization can be operated with a load high at the applied monophase system, to work efficiently with the accepted maximum load (Ghosh, 1991).

Furthermore with 20% more removal of the DQO of a particles stage (Schwitzeguebel and Peringer, 1986).

In a monophase reactor myth the easily hydrolysable substrates, the desestabilization between the production and consumption of acids inhibits the methanogenic bacterias.

During the methanogenesis other than producing methane, these given the elimination of gaseous hydrogen by hydrogenophilic bacterias that helps to regulated the production of acids by others forms and hence controls of the redox potential of the fermentation process so that the acetogenic and fermentative bacterias recover the NAD^+ , that permits to continue with the production of acetic acid without affecting the anaerobic digestion (Mosey, 1983).

In the present experimental work, was studied the biodegradability of a anionic surfactant alkylbenzene sodium sulphate (ASS) has been studied two different concentrations (200 and 300 mg/L) at different time intervals employing a reactor UASB in two stages operated in series with a hydraulic residence time of 6 hours for the acidogénic reactor and a hydraulic residence time of 1 day for the methanogenic reactor. The pH of the middle of alimentation was adjusted to 7 with NaOH 1N.

During this study of surfactant biodegradability, the reactors system were maintained in a room with temperature controlled at 35°C.

In a first stage of the experiment, both reactors were operated in series, but due to the excess production of AGV in the acidogenic reactor, the methanogenic reactor was acidified.

Therefore, it was decided to separate both reactors and to feed to each one with a different substrate.

Lactose for the acidogenic reactor and acetate for the methanogenic reactor in order to of recover the activity of the methanogenic reactor.

Once the activity of biomass has been recovered, again it was feed with the residual water of the acidogenic reactor, however upon operating the reactors system again in series, the methanogenic reactor was acidified for the second time, so it was decided to recycle a fraction of the effluent of the methanogenic reactor together with the effluent of the acidogenic reactor that were collected in a erlenmeyer flask adjusting the pH to 7 with sodium bicarbonate that permitted a better control of the anaerobic digestion.

The results obtained indicated that major accumulation of LAS in acidogenic reactor compared to methanogenic reactor.

However, the acidogenic bacteria did not totally loose their activity, mean while in the biomass of the methanogenic reactor significantly reduced the COD removed efficiency until it reached zero.

Upon suspension on the surfactant in the influent or alimentation for approximately 70 days period, was observed a phenomenon of desortion of the surfactant accumulated in biomass of both reactors recover gradually the bacterial activity accord in to time elapsed.

With this experimental study proved that it was not possible to biodegrade the surfactants by anaerobic digestion as formulated in the hypothesis of this experiment it is understood that acidogenic bacterial are capable and transforming the surfactant and lactose letting only AGV for the methanogenic reactor.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación.

Cuando se trata de aplicar el tratamiento anaerobio para la descontaminación de las diversas descargas de aguas residuales industriales, el objetivo fundamental es disminuir en condiciones de ausencia de oxígeno el poder contaminante de los compuestos recalcitrantes nocivos al medio ambiente, tales como subproductos químicos provenientes de la industria del petróleo, compuestos organoclorados, pesticidas, surfactantes, polímeros químicos, entre otros, y transformarlos en residuos no contaminantes.

Desde hace varias décadas, se han utilizado procesos biológicos tanto aerobios como anaerobios para el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, en los procesos aerobios es necesario el suministro de oxígeno para favorecer la degradación de la materia orgánica, lo que implica altos costos por los consumos energéticos además de que se da lugar a grandes cantidades de lodo, que deber ser tratado para su disposición final.

En cambio, los procesos anaerobios no requieren suministro de energía, por el contrario, generan un biogás con alto contenido de metano que puede ser utilizado como energético. Adicionalmente, la producción de lodo es baja lo que reduce notablemente el problema de la disposición final de los lodos de purga (Saval, 1993).

Los procesos anaerobios se han convertido en una de las biotecnologías más idóneas para el tratamiento de aguas residuales, especialmente aquellas con alta concentración de carga orgánica. Así, diversos efluentes residuales contemplan a ser tratados por esta biotecnología.

En el presente estudio, abordaremos el tratamiento biológico vía digestión anaerobia de un agua residual con alta concentración de un surfactante aniónico alquilbencen sulfonato de sodio.

Los detergentes utilizados cotidianamente dejan concentraciones en el agua residual de 1 a 20 mg/L (APHA, 1989). Sin embargo, en aguas residuales provenientes de industrias productoras de detergentes existen concentraciones de surfactante superiores a los 300 mg/L (Wagener and Schnik, 1987).

Se ha observado que durante los últimos años ha crecido notoriamente el consumo de los surfactantes aniónicos del tipo alquilbencen sulfonato de sodio (LAS), debido a que son los más ampliamente empleados en la síntesis de surfactantes aniónicos, que se utilizan como agentes activos en diversos limpiadores como detergentes, shampoos y pastas de dientes, etc.

El alto consumo de estos productos, ha creado conciencia sobre el problema que esto representa para llevar a cabo su biodegradación durante el tratamiento de las aguas residuales (Swisher, 1987). Ya que al desechar los productos consumidos al drenaje, provocan serios problemas para el medio ambiente entre los que cabe mencionar su toxicidad al descargar aguas residuales con elevadas concentraciones de surfactantes directamente al mar afectando a los peces debido a que dificultan la transferencia de oxígeno en el agua, así como la aceleración eutrofica en los cuerpos receptores (Hashim and Kulandia, 1989).

Los detergentes son considerados como recalcitrantes debido a su estructura molecular que les permite permanecer en el medio ambiente por un tiempo indefinidamente largo (Speece, 1990), sin embargo, estudios previos han demostrado que los LAS pueden ser degradados en plantas de tratamiento de aguas residuales cuando están presentes a concentraciones de 1 a 10 mg/L (Okpokwasili and Olisa, 1991).

El consumo *per cápita* sufre una gran variación de una área geográfica a otra, por ejemplo en el este de Europa, USA y Japón, el consumo varía de 3 a 5 g de LAS por habitante por día, mientras que en el sur de África y este de Asia es de 1 g (Berna *et al.*, 1990).

En las tablas 1.1a y 1.1b, se muestra la producción de surfactantes en USA, Europa Occidental y Japón, por lo que a escala mundial se consumen cerca de 1,800.000 toneladas (Berth and Jeschke, 1989).

Tabla 1.1a Producción de alquilbencenos lineales por región (Modler, et al., 1989).

	USA	Europa Occidental	Japón	Total
No. de productores	2	8	4	14
No. de plantas	4	9	4	17
Producción Total Ton/Año	780 X 10 ⁶	1,590 X 10 ⁶	320 X 10 ⁶	2,690 X 10 ⁶

Tabla 1.1b Producción de alquilbencen sulfonatos por región (Modler, et al., 1989)

	USA	Europa Occidental	Japón	Total
Número de productores	1	1	2	4
Producción Total Ton/Año	20 X 10 ⁶	132 X 10 ⁶	176 X 10 ⁶	328 X 10 ⁶

Por esta razón se estudió el proceso de biodegradación del surfactante aniónico alquilbencen sulfonato de sodio (LAS) en dos etapas en reactores (UASB) por sus siglas en inglés operados en serie, empleando también lactosa como fuente de carbono.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Estudiar la biodegradabilidad de un surfactante aniónico alquilbencen sulfonato de sodio (LAS) en dos etapas en un sistema de reactores (UASB) operados en serie.

1.2.2 Objetivos particulares

I. Estudiar si existe inhibición de cada una de las etapas del sistema anaerobio por la presencia del LAS y determinar las constantes cinéticas de la digestión anaerobia de lactosa.

II. Estudiar la biodegradabilidad del detergente (LAS) en los dos reactores UASB operados en serie.

1.3 ANTECEDENTES

El amplio uso de los detergentes genera problemas en el medio ambiente, tales como la toxicidad en el mar afectando a los peces debido a que dificultan la transferencia de oxígeno en el agua (Hashim and Kulandia, 1989).

Actualmente los mares y los estuarios se han convertido en los principales cuerpos receptores de estos. Bressan *et al.*, 1991 encontraron que a dosis de 30 ppm inducen la inhibición de organismos costeros.

En sistemas aerobios para el tratamiento de las aguas residuales, la presencia del LAS disminuye la eficiencia de remoción de la materia orgánica, ya que provoca una disminución del crecimiento de los microorganismos, reduce las propiedades de sedimentación de los flóculos y disminuye la transferencia de oxígeno, además al bajar la tensión superficial del agua inician un proceso de destrucción de la biomasa (Therien *et al.*, 1984).

Los efectos de los surfactantes en las células son muy complejos, estos penetran la membrana originando la solubilidad parcial de sus componentes estructurales (Wagener and Schink, 1987), provocando su ruptura, reducen tensión superficial y por lo tanto la miscibilidad de las moléculas intra y extracelulares, provocando reacciones indeseables.

Las aguas de descargas de las industrias de lavado de telas, metales y suelos contaminados, no pueden ser tratadas por ningún proceso biológico ya que contienen concentraciones de surfactantes de 300 mg/L (Wagener and Schink, 1988).

Pérez, 1994. Demostró que el dodecibencen sulfonato de sodio ejerce sobre los lodos una inhibición de la metanogénesis a una concentración de 500 mg/L acompañada de una disminución de la actividad metanogénica bacteriana en un 50% (LD₅₀) mientras que a una concentración de 250 mg/L, la degradación fue del 36%.

Se ha observado que la degradación del LAS, se favorece al incrementar la distancia del sulfonfenil con el grupo metil terminal de la cadena alquímica. (Swisher, 1963).

La tabla 1.3, muestra algunos antecedentes bibliográficos sobre la biodegradación de surfactantes.

Tabla 1.3 Antecedentes bibliográficos sobre biodegradación de “LAS”

Autor	Trabajo de investigación
Wagener and Schink, 1988	Encontraron una degradación parcial del dodecil bencen sulfonato de sodio (DBSS) a concentraciones menores de 100 mg/L con una reducción del grupo sulfato en cultivos enriquecidos con reactores de filtro anaerobio
Khalil <i>et al.</i> , 1989	Demostraron el efecto inhibitorio de detergentes aniónicos sobre una cepa pura de <i>Methanosarcina barkeri</i> a una concentración de 20 mg/L.
Tanaka <i>et al.</i> , 1981	Encontraron que a una concentración de 100 mg/L, los LAS reducen significativamente la producción de metano a partir de lactato, en cultivo en lote.
Federle and Schwab, 1992	Demostraron por vía anaerobia la degradación de surfactantes.
Kazuho <i>et al.</i> , 1992	Demostró que a $T > 10^{\circ}\text{C}$ se da lugar a la biodegradación de LAS, mientras que a $T < 5^{\circ}\text{C}$ no se lleva a cabo la biodegradación.
Hideshige <i>et al.</i> , 1993	Estudiaron la biodegradación de LAS, empleando una biopelícula con una concentración de 3.8×10^5 MNP por cm^2 de una población bacteriana.
Tanaka <i>et al.</i> , 1993	Demostraron que algunos surfactantes muestran baja biodegradabilidad comparada con la glucosa, bajo condiciones anaerobias.
Pérez, 1994	Demostró la biodegradación de dos surfactantes aniónicos: laurilbencen sulfonato de sodio y dodecilbencen sulfonato de sodio, así como uno catiónico: cloruro de trialquil metil amonio. Todos ellos a 0, 1, 50, 100, 250 y 500 mg/L respectivamente.

1.3.1 SURFACTANTES.

1.3.1.1 Definición. Son compuestos orgánicos empleados en la formulación de productos de limpieza y aseo personal; están caracterizados por una porción elongada de baja afinidad acuosa y otra de alta afinidad acuosa. Químicamente los detergentes se clasifican en dos grandes grupos: iónicos y no iónicos.

El grupo de los iónicos se divide en dos: aniónicos, si en la porción hidrofílica de la molécula esta incluido un anión, y catiónicos, si en la parte hidrofílica contiene un catión.

Los no iónicos tienen una cadena hidrofílica al final, que contiene grupos tales como el oxígeno, el nitrógeno y azufre. (tabla 1.3.1.1).

Tabla 1.3.1.1 Clasificación de los surfactantes.

Tipo	Derivados	Características
Aniónicos	<ul style="list-style-type: none"> • Carboxilatos • Sulfonatos • Sulfatos • Fosfatos 	Son polares, en presencia de grandes cantidades de sales metálicas, el grupo carboxilato presenta un mejor poder solubilizante. Entre los surfactantes comerciales se tiene el dodecil y tridecil bencen sulfonato y el alquil sulfato.
Catiónicos	<ul style="list-style-type: none"> • Sales de amonio • Componentes de amonio cuaternario • Bases nitrogenadas • Bases no nitrogenadas 	Se utilizan como agentes antiestáticos en la industria textil como ablandadores, agentes de fijación, inhibidores de corrosión y estabilizadores de espuma.
No Iónicos	<ul style="list-style-type: none"> • Amidas lineales • Misceláneas lineales • Múltiples lineales 	La solubilidad de estos detergentes está en función del oxígeno presente en la molécula, tal es el caso del óxido de etileno u óxido de propileno hidrofílico. Son más solubles en aceite que los catiónicos y aniónicos polares
Anfotéricos	<ul style="list-style-type: none"> • Contienen un grupo hidrofílico ácido y un básico. 	No irritan la piel ni los ojos, son compatibles con los surfactantes aniónicos y catiónicos, entre ellos están los derivados del imidazol, se preparan a partir del 2 <i>alkyl</i> , 1-2 <i>hidroxietil</i> , 2 <i>imidazol</i> y <i>cloroacetato de sodio</i> .

Los surfactantes en forma de sales de sodio son los más empleados en el ámbito industrial y en detergentes caseros. El surfactante en forma de sal de trietanolamina es usado en detergentes líquidos y cosméticos; en forma de sal de isopropilamina se utiliza para lavado en seco; en forma de sal de dietilamina se utiliza en emulsiones agrícolas y como solventes de colorantes.

Los alquilbencen sulfonatos de alto peso molecular son preparados con cadenas largas de oleofinas (C₁₃-C₁₅), son más solubles en aceite, y son empleados como lubricantes y aditivos de aceites (Rosen, 1978).

1.3.1.2 Propiedades de los alquilbencen sulfonatos.

- Las propiedades físicas y de superficie son influenciadas por el variado peso molecular y el número de carbonos en la cadena alquila. También los isómeros pueden influir en estas propiedades. La variación de la cadena alquila provoca que cada isómero tenga diferentes características de degradación y absorción (Tabor and Baber, 1996).
- Debido a la variabilidad en su estructura, la solubilidad de los LAS está en el intervalo de 0.2 a 160 mg/L. Los surfactantes ácidos son solubles en agua y solubles o dispersables en solventes orgánicos. Sin embargo, en diluciones con agua el surfactante puede formar líquidos altamente viscosos o un gel entre 30-80% de surfactante en agua. Para surfactantes en forma de sales de sodio no son solubles en solventes orgánicos, excepto en alcoholes.
- Los LAS son resistentes a la hidrólisis en ácidos o álcalis calientes.
- Presentan compatibilidad a ionizarse en soluciones acuosas. Completamente ionizados, y los surfactantes ácidos libres de ácido sulfúrico son solubles en agua de modo que la solubilidad no se afecta a pH bajos.
- La concentración micelar crítica (CMC) del dodecil bencen sulfonato de sodio (P.M.=348.4 gr/mol) es aproximadamente 500 mg/L. El coeficiente de adsorción de LAS (K) en sedimentos varía desde 22 hasta 105 mg_{LAS}/mg_{sedimento} (González-Mazo et al., 1998 and Fytianos et al., 1998).
- Es espumante en mezclas con surfactantes de éter sulfatos, generando una buena estabilidad espumante, por lo tanto presenta buena detergencia con C₁₃-C₁₄.
- Una de las desventajas es que al emplearlos en nuestro aseo personal causan problemas de irritación en la piel, por lo tanto para reducir estos efectos se les adiciona sulfosuccinatos, sarcosinatos o anfótericos.

1.3.1.3 Toxicidad

Algunos surfactantes a concentraciones superiores a 30 mg/L resultan ser tóxicos para la mayoría de los organismos acuáticos, otros son susceptibles a ser biodegradados rápidamente (Lewis, 1991).

La toxicidad de los surfactantes en el medio ambiente ha despertado un gran interés en el campo de estudio de aguas dulces y saladas. Sin embargo, dicha toxicidad se ha incrementado día a día debido al empleo de mezclas químicas que se utilizan como materias primas en la manufactura de surfactantes granulares y líquidos que contienen aromas, dispersantes de aceites, formulación de pesticidas, enzimas estabilizadoras, etc. (Lewis, 1992).

Además, se ha observado que la toxicidad provocada por los LAS, disminuye la eficiencia de remoción de la materia orgánica en sistemas aeróbios durante el tratamiento de aguas residuales.

Estos problemas son de menor importancia en plantas de tratamiento de aguas domésticas que tienen en promedio una concentración de surfactante de 1 a 10 mg/L. Pero, las aguas residuales generadas durante la limpieza de equipos de proceso en las diversas industrias, así como las que descargan las plantas que manufacturan los surfactantes, la concentración se eleva hasta 300 mg/L.

Debido a que los surfactantes aniónicos permanecen por mucho tiempo en el medio ambiente, la concentración de LAS resulta ser muy importante debido a que los compuestos intermediarios producidos durante su biodegradación, así como la acumulación del propio LAS en los lodos de los reactores empleados en el tratamiento de las aguas residuales, impide que se lleve a cabo su biodegradación vía digestión anaerobia. (Marcomini and Giger, 1988).

La comunidad microbiana que degrada los LAS puede ser capaz de transformarlo a dos diferentes estructuras:

& A un anillo aromático sulfonado, el cual puede ser atacado en cualquiera de los átomos de carbono del extremo terminal.

- A una cadena alifática con un número variado de átomos de carbono saturado.

Al igual que en los compuestos recalcitrantes, la toxicidad se debe fundamentalmente a la estructura molecular como:

- Dobles ligaduras.
- Posición de los grupos funcionales.
- Longitud de la cadena.
- Estado de oxidación.

Swisher, 1981. Bajo condiciones aerobias estudió la degradación de LAS (C_{12}) y de tres LAS comerciales, en un reactor de flujo continuo con un tiempo de residencia hidráulica de 6 horas durante 15 meses, encontrando que los cuatro tipos de LAS se degradan de un 80 a un 90%.

En la digestión anaerobia las bacterias más afectadas son las metanogénicas acetoclásticas afectando la producción de metano asociándose con una acumulación elevada de acetato.

Wagener and Schink, 1987, investigaron la degradación anaeróbica de tres surfactantes aniónicos (C_{12} alquilbencen sulfonato lineal (LAS), dodecil sulfonato de sodio (AS) y dodecil sulfato de sodio (SDS)) en experimentos de incubación y en escala a nivel laboratorio en un reactor de lecho fijo.

Estos surfactantes mostraron un efecto inhibitorio en la metanogénesis a concentraciones superiores a los 100 mg/L en un lodo de un reactor anóxico, así como también mostraron inhibición a concentraciones superiores de 50 mg/L en un lodo anóxico lagunar.

A bajas concentraciones no hubo inhibición sin embargo, la metanogénesis no se favoreció, es decir permaneció constante. Por lo tanto la biodegradación de estos surfactantes bajo condiciones anaeróbicas fue significativamente baja.

Jimenez et al., 1991. Demostraron que la degradación de LAS se lleva a cabo por consorcios bacterianos y que una sola cepa es incapaz de degradar al surfactante.

Sigoillot and Nguyen, 1992. Confirmaron estos resultados y sugirieron que el paso clave en la mineralización del LAS está en el rompimiento del anillo bencénico y que la completa mineralización se lleva a cabo por asociación entre bacterias costeras y aerobias estrictas.

Federle and Schwab, 1992. confirmaron estos resultados comparando la mineralización de LAS radiomarcado en sedimentos anaerobios de una laguna que recibe aguas residuales de lavanderías y sedimentos de lagunas no contaminadas como control.

El LAS no se mineralizó en los sedimentos anaerobios a pesar de que los microorganismos habían estado expuestos al surfactante por mas de 25 años.

Por lo que la aclimatación no desarrolla un mecanismo degradativo para el LAS, por lo que sugirieron la necesidad de oxígeno molecular para la degradación inicial.

1.3.1.4 Química y manufactura

Los detergentes alquilbencenos lineales mejor conocidos como LAB son producidos por reacción del benceno con grupos que contienen de 10 a 14 átomos de carbono derivados a partir de parafinas normales o α oleofinas lineales. Estos también son llamados álcalis, detergentes alcalinos o dodecibencenos.

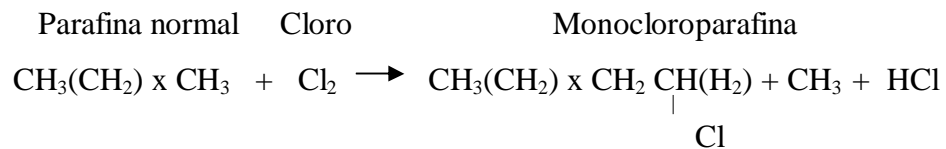
Los LAS son manufacturados por la reacción del alquilbenceno con ácido sulfúrico o trióxido de sulfuro para dar el ácido sulfónico, el cual es neutralizado hasta formar una sal de sodio (Rosen, 1978).

El precursor de LAS es el alquilbenceno lineal (LAB) y la producción comercial resulta de una mezcla homóloga de varias cadenas alquílicas largas.

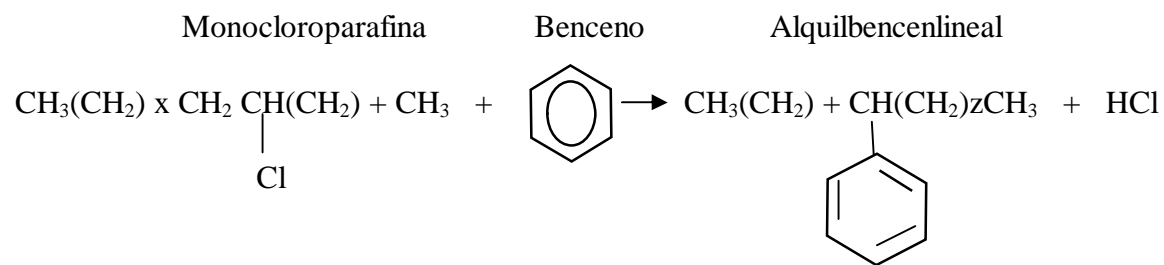
Durante el proceso de alquilación, cada homólogo alquílico consiste en una mezcla de isómeros, donde el grupo fenilo puede ser atacado en cualquier átomo de carbono a excepción del carbono terminal.

El LAB es convertido a alquilbencen sulfonatos lineales por sulfonación de LAS de acuerdo a la siguiente reacción química:

Reacción 1



Reacción 2



1.3.2 DIGESTION ANAEROBIA

1.3.2.1 Descripción de la digestión anaerobia

Es un proceso altamente complejo desde el punto de vista microbiológico, puede decirse que se trata de un proceso natural enmarcado en el ciclo anaerobio del carbono, que en ausencia de oxígeno, transforma las sustancias orgánicas en biomasa y compuestos inorgánicos en su mayoría volátiles: H_2S , CH_4 y CO_2 (Colleran and Wiljie, 1986) (Figura 1.3.2.1).

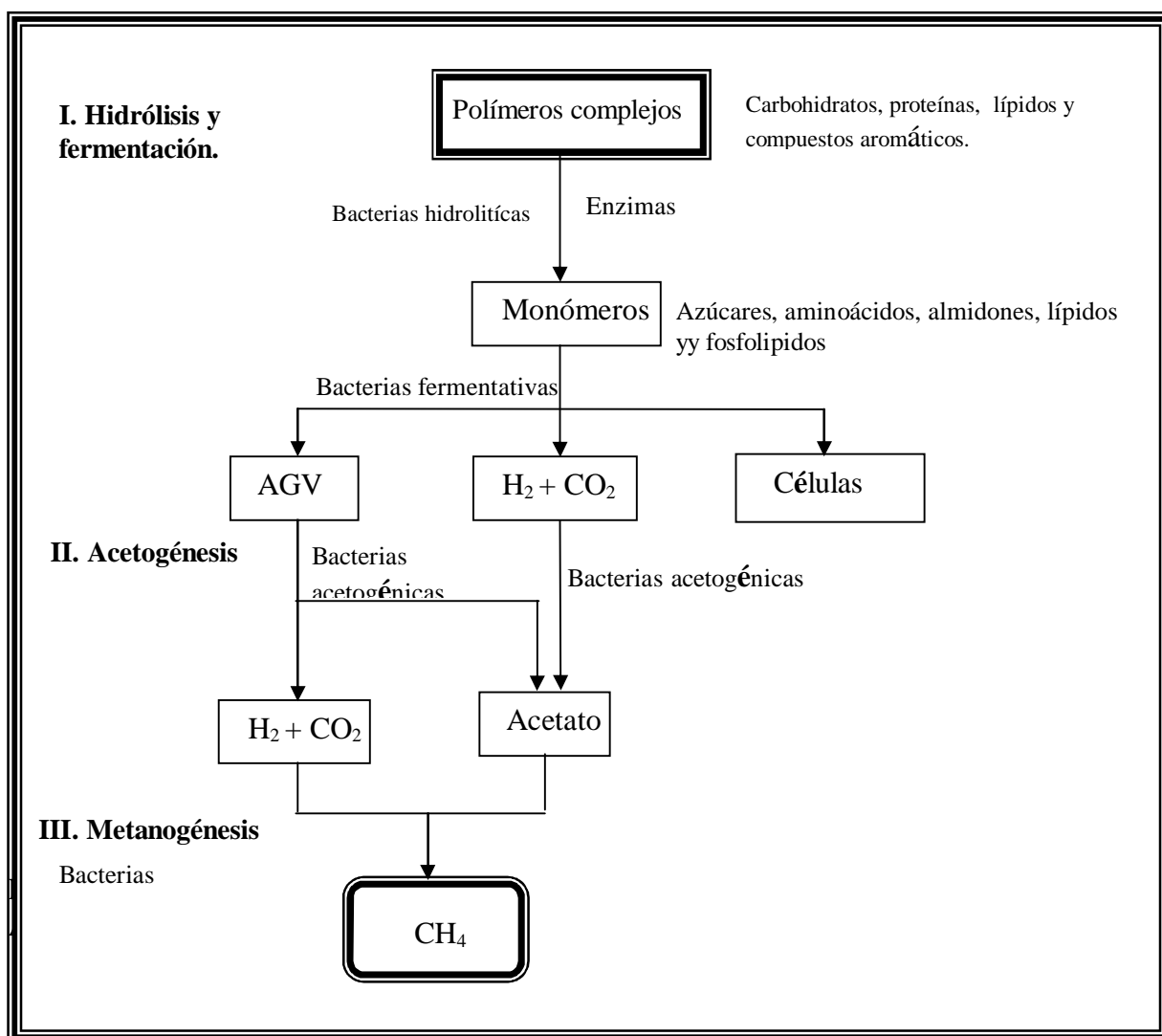


Fig. 1.3.2.1. Descripción de la digestión anaerobia: 1. Hidrólisis y fermentación, 2. Acetogénesis y 3. Metanogénesis.

El metano se encuentra en la atmósfera en un orden de 4×10^5 g, y aumenta a razón de un 20% anual. Del 80 al 90% es de origen biológico, producido por bacterias metanogénicas presentes en diferentes hábitats naturales, el resto proviene de fuentes fósiles (Ferry and James, 1993).

El metano que llega a la atmósfera es el que resiste la oxidación producida por microorganismos aerobios metilótrofos, que son abundantes en la naturaleza, y bacterias anaerobias sulfatorreductoras cuando existe sulfato disponible en aguas residuales industriales que contienen sulfatos, como es el caso de descargas de las industrias papelera, de fermentación y de aceites comestibles (Rinzema and Lettinga, 1988).

Entre los lugares naturales (ecosistemas naturales) donde se produce el metano se encuentran: el fondo de lagunas y pantanos, el fondo del mar donde hay sedimentos orgánicos, el tracto gastrointestinal del hombre y animales carnívoros, el rumen de los herbívoros, el estómago de las termitas, aguas termales y en el fondo del mar (Guyot, 1992).

También existen ecosistemas artificiales como son rellenos sanitarios, lodos, digestores rurales y reactores anaerobios de efluentes donde se produce metano.

El proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo por un conjunto de especies bacterianas que se ven influenciadas por las condiciones del medio en que se desarrollan, como son:

- Sustrato.
- Temperatura.
- Humedad.
- pH.
- Alcalinidad.
- Presencia de compuestos nutricionales o tóxicos (Calzada, 1990).

Por lo tanto, el principio básico de la degradación anaerobia consiste en la transformación bioquímica de la materia orgánica a través de diferentes grupos de microorganismos, señalando que la eficiencia de cada grupo de microorganismos depende directamente del sustrato y de los posibles agentes contaminantes presentes en el agua residual (Schobert, 1983).

En cada ecosistema anaerobio, coexisten bacterias, protozoarios y hongos, y cada digestor es diferente desde el punto de vista microbiológico. La población de un biodigestor al que llegan polímeros naturales orgánicos, es tan diversa como la del rumen, y se han identificado en un solo estudio más de 130 especies diferentes.

Si bien la subdivisión del proceso en etapas es muy conveniente, la realidad biológica es mucho más compleja.

Entre los microorganismos se producen interacciones tan estrechas, que por ejemplo, la actividad de los microorganismos metanogénicos influye decididamente sobre los productos de la etapa de fermentación e incluso sobre la hidrólisis. Por lo tanto, se ordenan los distintos grupos de bacterias según el siguiente criterio:

a) Productoras de hidrógeno

Bacterias hidrolíticas y fermentativas.

Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno

b) Sintróficas

Bacterias sulfatorreductoras (sintróficas facultativas)

c) Consumidoras de hidrógeno

Bacterias homoacetogénicas.

Bacterias metanogénicas.

Bacterias metanogénicas acetoclásticas.

Bacterias metanogénicas hidrogenofílicas.

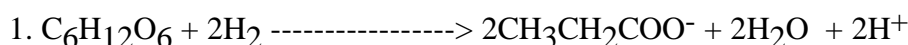
a) Primera etapa: hidrólisis y fermentación.

En esta primera etapa se inicia el fenómeno de digestión anaerobia. Las bacterias responsables de esta etapa pertenecen a diferentes grupos y pueden ser anaerobias facultativas o estrictas (Guyot, 1990).

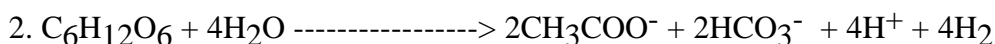
Bacterias hidrolíticas y fermentadoras. Las bacterias hidrolíticas producen las enzimas que se encargan de degradar los polímeros presentes en el agua residual (carbohidratos, proteínas y lípidos) convirtiéndolos a compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, hemicelulosas, xilanos, pectinas, almidones, lípidos y fosfolípidos.

Por otra parte, las bacterias fermentadoras transforman los azúcares y aminoácidos en ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato, valerato), CO₂, H₂ y células, mientras que los lípidos y los ácidos grasos de cadena larga son convertidos en AGV, CO₂ e H₂ a través de un mecanismo de β-oxidación (Saval and Noyola, 1992).

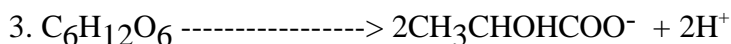
Las reacciones llevadas a cabo son las siguientes (Thauer *et al.*, 1977).



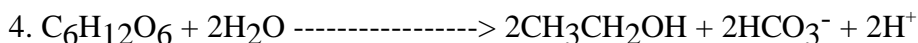
$$\Delta G^{0'} = -358.1 \text{ KJ/reacción}$$



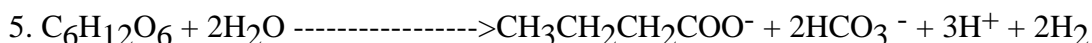
$$\Delta G^{0'} = -206 \text{ KJ/reacción}$$



$$\Delta G^{0'} = -198 \text{ KJ/reacción}$$



$$\Delta G^{0'} = -226 \text{ KJ/reacción}$$



$$\Delta G^{0'} = -254.6 \text{ KJ/reacción}$$

Esta etapa se realiza mediante microorganismos anaerobios facultativos, bacterias y hongos de crecimiento rápido. Los tiempos de duplicación van de media hora a algunas horas (García, 1989).

Durante la acidogénesis, la velocidad específica de crecimiento obtenida con glucosa se encuentra entre 0.05 a 0.3 h⁻¹. En esta etapa, el piruvato ocupa una posición clave y controla la orientación de las fermentaciones.

Cuando la concentración del H₂ producido durante la degradación es baja, es decir de 5 a 50 ppm, existe una preferencia para la formación de ácido acético (Mosey, 1983). En cambio, cuando aumenta la concentración de H₂ evita la proporción de ácido acético formado y aumentan las proporciones de ácidos de cadena mayor a dos átomos de carbono. Además de ácidos grasos volátiles (AGV), se forman alcoholes y ácidos dicarboxílicos.

Los productos intermedios como el lactato o el etanol no se acumulan en los reactores anaerobios, debido a que la microflora metanogénica consume activamente el hidrógeno, desplazando el metabolismo hacia el acetato, lo que hace que las bacterias fermentativas produzcan más hidrógeno y acetato y en menores cantidades, los demás metabolitos como el lactato, etanol, propionato y butirato (García, 1991).

Sí el reactor no es controlado durante esta etapa, se puede dar lugar a una desestabilización del proceso, en el caso de una sobrecarga la hidrólisis de la materia orgánica provocará una sobreproducción de AGV, reduciendo el pH, hasta valores donde la actividad metanogénica es inhibida.

b) Segunda etapa: acetogénesis

En esta etapa los alcoholes, ácidos grasos y compuestos aromáticos generados en la etapa anterior se degradan produciendo ácido acético, CO₂ e hidrógeno, que son los sustratos de las bacterias metanogénicas (figura 1.3.2.1).

La degradación se lleva a cabo por β -oxidación de los ácidos, con liberación de acetyl coenzima A, disminuyendo de esta manera la longitud de la cadena en dos carbonos (Mathies and Schink, 1993).

En este proceso de reducción de la longitud de la cadena, se genera energía por fosforilación al nivel de sustrato.

Los ácidos grasos de cadena larga de más de 4 átomos de carbono, son metabolizados lentamente y debido a su baja solubilidad en determinadas condiciones pueden ser tóxicos. Desde el punto de vista termodinámico y en condiciones estándar, el ΔG de las reacciones es positivo.

La presencia de una baja concentración de hidrógeno desplaza el equilibrio de la reacción de modo que el ΔG se hace negativo.

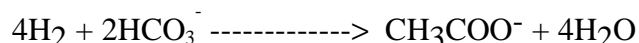
Durante la acetogénesis, los productos de fermentación son convertidos en acetato, hidrógeno y bióxido de carbono por un grupo de bacterias denominadas bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno. (OPHA por sus siglas en inglés) (Boone and Bryant, 1983; Thiele *et al*, 1988).

Una particularidad de estas bacterias, consiste en que las reacciones que se realizan son inhibidas por el hidrógeno que producen, por lo que es muy importante que no se acumule en el medio.

Debido a esto, las bacterias OHPA tienen una estrecha relación con las bacterias que remueven el hidrógeno como son las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas. Sí el medio contiene sulfatos, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) sustituyen a las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas.

Bacterias homoacetogénicas

Son bacterias fermentativas generalmente del género *Clostridium* que se caracterizan por la producción exclusiva de acetato a partir de H_2 y CO_2 , a partir de un sustrato carbonado como glucosa y la fructosa (Andreesen *et al*, 1970).



$$\Delta G^{0'} = - 104.6 \text{ KJ/reacción}$$

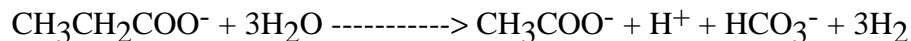
Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA)

Estas bacterias son las más representativas de la segunda etapa en los digestores o reactores anaerobios que producen hidrógeno y acetato, tienen tiempos de duplicación muy largos, de 90 a 160 horas (Boone and Bryant, 1983).

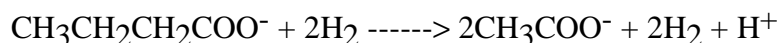
Esta relación de simbiosis, basada sobre el hidrógeno se conoce como transferencia de hidrógeno entre especies. Por lo general estas bacterias son metanogénicas, pero sí el medio contiene sulfatos, las BSR sustituyen a las metanogénicas.

Sin embargo, cabe mencionar que cuando el medio no tiene sulfatos, ciertos grupos de BSR son capaces de establecer también una relación simbiótica con las metanogénicas, de la misma manera que las bacterias OHPA, efectuando una reacción de acetogénesis a partir de los compuestos de la primera etapa, los ácidos grasos volátiles.

Entre las bacterias OHPA, algunas utilizan el butirato, otras el propionato como sustrato. Así que la hidrólisis de propionato a acetato se detiene cuando existen concentraciones de H_2 en el biogas del orden de 500 a 50,000 ppm (Boone and Bryant, 1983).

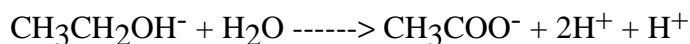


$$\Delta G^{0'} = 76.1 \text{ KJ/reacción}$$



$$\Delta G^{0'} = 48.1 \text{ KJ/reacción}$$

Bryant *et al.*, 1967. Descubrieron el proceso de transferencia de hidrógeno entre especies y demostraron que la bacteria *Methanobacillus omelianski* (Barker, 1941), era un bicultivo en la cual una bacteria OHPA realizaba la primera reacción y la metanogénica la segunda reacción. La reacción efectuada por las bacterias OHPA es la siguiente:



$$\Delta G^{\circ} = 19.2 \text{ KJ/reacción}$$

Reacción efectuada por las bacterias metanogénicas



$$\Delta G^{\circ} = -36.1 \text{ KJ/reacción}$$

c) Tercera etapa: metanogénesis

Es la última etapa del proceso de digestión anaerobia de la materia orgánica, y es llevada a cabo por un consorcio de bacterias anaerobias estrictas productoras de metano (figura 1.3.2.1). Son las únicas capaces de producir metano a partir de acetato, CO_2 e H_2 , de cualquier compuesto metilado como el metanol y las metilaminas, y de ciertos alcoholes en presencia de CO_2 (Balch *et al.*, 1979) y son inhibidas por pequeñas cantidades de oxígeno cerca de 5 ppm ya que exigen un potencial oxido-reducción inferior a - 200 mV (Mah *et al.*, 1977).

Sobre la base del análisis de la secuencia del ARN ribosomal 16S estas bacterias han sido clasificadas dentro de un subreino diferente de las Eubacterias: el de las Arqueobacterias (Woese, 1982; Balch *et al.*, 1979). Ya que presentan una serie de características fisiológicas, bioquímicas y genéticas diferentes al de las Eubacterias tales como:

- Su pared celular no contiene mureína que es un peptido glucano de las eubacterias, miembros de las Methanobacteriaceae contienen en su pared celular pseudomureína (Demain, 1985).
- Poseen seis coenzimas únicas en la metanogénesis (Rouviere and Wolfe, 1988). La coenzima M ó HS-COM, el cofactor F 420, la metanopterina ó factor F 432, el factor F 430, el componente B ó 7 mercaptoetanoiltreonina fosfato (HS 30 HTP) (Balch *et al*, 1979).

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

Las bacterias metanogénicas tienen necesidades específicas de oligoelementos como el fierro, el níquel, el cobalto, el molibdeno, el tungsteno, sulfuro de fierro y selenio (Speece, 1983).

Se han descrito 65 especies, el 67% son hidrogenotrofas que utilizan el H₂ para reducir el CO₂, 13% son acetoclásticas o acetotrófas las cuales producen el metano a partir del acetato, 27% son metilotrofas que utilizan compuestos metilados como metanol, metilaminas y metildisulfuro y finalmente el 14% son metilotrofas obligadas (Garcia, 1990). La mayor parte de estas bacterias se desarrollan dentro de un intervalo de pH entre 6 y 8 con un óptimo de 7 (Madigan, 1988).

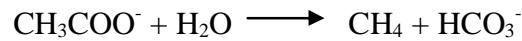
Entre las bacterias metanogénicas, el 20% son termofílicas, ya que se desarrollan a intervalos de temperatura de 50 a 60°C, siendo mas activas que las mesofílicas que se desarrollan entre los 30 y 40°C (Madigan, 1988).

Bacterias metanogénicas acetoclásticas

Estas bacterias utilizan el acetato, metanol y metilaminas. La conversión de acetato a CH₄, suele ser un paso crítico en la digestión anaerobia, en donde la concentración adecuada de nutrientes (N, P, S, Ca, Mg, Fe, Co y Ni), juega un papel importante para el desarrollo de las bacterias metanogénicas que utilizan concentraciones elevadas de acetato de 30 a 40 mmol/L a tiempos de retención bajos (Takashima and Speece, 1989). Normalmente controlan el pH del medio a travez de la eliminación de ácido acético con la producción de CO₂ que al estar

disuelto forma una solución amortiguadora de bicarbonato (Fiestas, 1988) de acuerdo a la siguiente reacción:

1. Introducción

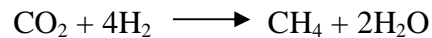


$$\Delta G^{\circ'} = -31 \text{ KJ/reacción}$$

Bacterias metanogénicas hidrogenotrofas

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

obtienen su energía a partir de la oxidación del hidrógeno en presencia de CO_2 como aceptor de electrones (Balch, 1977).



$$\Delta G^{\circ'} = -135.85 \text{ KJ/reacción}$$

La primera reacción tiene una doble función en el proceso de digestión anaerobia, por una parte se produce metano y por otra se elimina hidrógeno gaseoso, con esta eliminación de hidrógeno se controla el potencial redox de la fermentación dado a que las bacterias acetogénicas y fermentativas recuperan el NAD^+ , permitiéndolo la producción de ácido acético (Baresi *et al*, 1978; Ferguson and Mah, 1983; Mosey, 1983).

Los cambios en la población microbiana durante las dos etapas de la digestión anaerobia, se dan en términos de las condiciones de operación de los reactores, como son el número de microorganismos presentes, así como los cambios morfológicos.

Tal es el caso del número de *Methanosarcina* y *Methanosaeta*, que decrecen considerablemente cuando el reactor sufre un ataque en la biopelícula (Anderson and Kasapgil, 1994).

1.3.2.2 Reactor UASB.

Lettinga y colaboradores desarrollaron a finales de 1970 un reactor sin empaque alimentado con flujo ascendente, la parte superior posee un sistema de separación gas-líquido-sólido que permite la salida del biogás y limita la salida del material en suspensión (Lettinga *et al.*, 1980) (figura 1.3.2.2).

1. Introducción

Objetivos del separador gas-sólido-líquido son las siguientes:

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

• Descarga el biogás del reactor.
• Evita el posible lavado de flóculos o granos mediante su decantación.

32

- Previene el lavado del lodo granular flotante.
- Provoca un efecto de pulimento mediante una sedimentación secundaria.
- Sirve como una barrera para detener las expansiones excesivas de la cama de lodo, la cual está principalmente constituida por el lodo floculento.

Este tipo de reactor permite que los microorganismos anaerobios floquen para formar un lecho de lodo de forma granular, con buenas características de sedimentabilidad y actividad metanogénica excelente.

De esta forma, los microorganismos son retenidos dentro del reactor por lo que se puede diferenciar el tiempo de retención de sólidos (TRS) que se refiere al tiempo en que los sólidos suspendidos volátiles o biomasa permanece en el interior del reactor y el tiempo de retención hidráulica (TRH), que se refiere al tiempo que permanece el fluido en el interior del reactor, con esto se logra tener un tiempo de retención celular mucho mayor que el tiempo de residencia hidráulica (Visser *et al.*, 1991; Viñas *et al.*, 1994).

Además, posee parámetros muy definidos que tienen la ventaja de no requerir materiales de relleno o equipo electromecánico complicado, según las condiciones hidráulicas y el sustrato utilizado, se puede formar un lodo granulado con muy buenas características de sedimentación y alta actividad metanogénica, lo cual favorece la retención de altas concentraciones de biomasa y la subsecuente producción de biogás.

Consecuentemente, el reactor puede operar a tiempos de retención hidráulicos cortos, por lo tanto con este tipo de reactor se puede retener la biomasa en forma de agregados formados por la inmovilización natural de las bacterias.

La formación y estabilidad de los gránulos es esencial para la operación del mismo.

1. Introducción

Este tipo de reactor permite manejar concentraciones de sólidos suspendidos del orden de 1 kg/m³ o SS menores al 10% del DQO total.

Típicamente el reactor UASB esta dividido en 4 zonas (figura 1.3.2.2):

(1) Zona de lodo granulado.

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

la.

33

(3) Zona de separación gas-sólido-líquido.

(4) Zona de sedimentación (Jens and Birgitte, 1994).

A cargas bajas, es decir de 1 a 4 Kg de DQO/m³d, es posible manejar concentraciones de hasta 50% del DQO total, y una concentración de biomasa hasta de 100 Kg de SSV/m³, pero lo mas común es manejar concentraciones de 40 Kg de SSV/m³ (Viñas *et al.*, 1994).



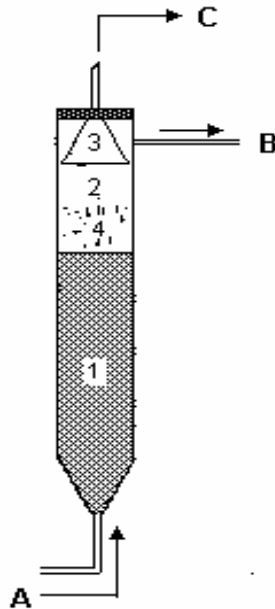


Figura 1.3.2.2. Representación del reactor UASB:

- (1) Zona de lodo granulado.
- (2) Zona líquida.
- (3) Zona de separación gas-sólido-líquido.
- (4) Zona de sedimentación
- (A) influente;
- (B) efluente
- (C) salida de gas.

1. Introducción

1.3.3 HIPÓTESIS

I.- Las bacterias acidogénicas serían capaces de transformar el surfactante y

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

o solamente AGV para el reactor metanogénico.

34

II.- Que el reactor acidogénico al consumir la lactosa por ser más fácilmente biodegradable dejaría AGV y LAS para el reactor metanogénico que se especializaría en el surfactante.

Lo anterior se planteó basándose en los trabajos de investigación que se han realizado. (Wagner and Schink, 1988). Encontraron una degradación parcial del dodecil benceno

sulfonato de sodio (DBSS) a concentraciones menores de 100 mg/L con una reducción del grupo sulfato en cultivos enriquecidos con reactores de filtro anaerobio.

Tanaka *et al.*, 1993. Demostraron que algunos surfactantes muestran baja biodegradabilidad comparada con la glucosa, bajo condiciones anaerobias.

La degradación del LAS, se favorece al incrementar la distancia del sulfonilo con el grupo metil terminal de la cadena alquímica. (Swisher, 1963).

Para comprobar el argumento planteado, se utilizó un reactor UASB en dos etapas para favorecer la metanogénesis. En la primer etapa las bacterias fermentadoras transforman la lactosa en ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato, valerato), CO₂, H₂ y células (Saval and Noyola, 1992).

Durante la acetogénesis, los productos de esta fermentación son convertidos en acetato, hidrógeno y bióxido de carbono por un grupo de bacterias denominadas bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno. (OPHA) por sus siglas en inglés) (Boone and Bryant, 1983; Thiele *et al.*, 1988).

En la última etapa de la digestión anaerobia se produce metano por medio de un consorcio de bacterias anaerobias estrictas.

2. MATERIAL Y METODOS

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 Diseño experimental.

En los experimentos de biodegradación de LAS, se trabajó con dos reactores anaerobios tipo UASB de lecho de lodo de flujo ascendente conectados en serie con la finalidad de separar la digestión anaerobia en dos etapas: una primer etapa acidogénica y una segunda etapa metanogénica (figura 2.1).

El volumen total del reactor acidogénico fue de 0.5 L y del reactor metanogénico fue de 1.5 L, el volumen de operación fue de 0.360 L para el reactor acidogénico y de 1.440 L para el reactor metanogénico.

2.2 Reactores.

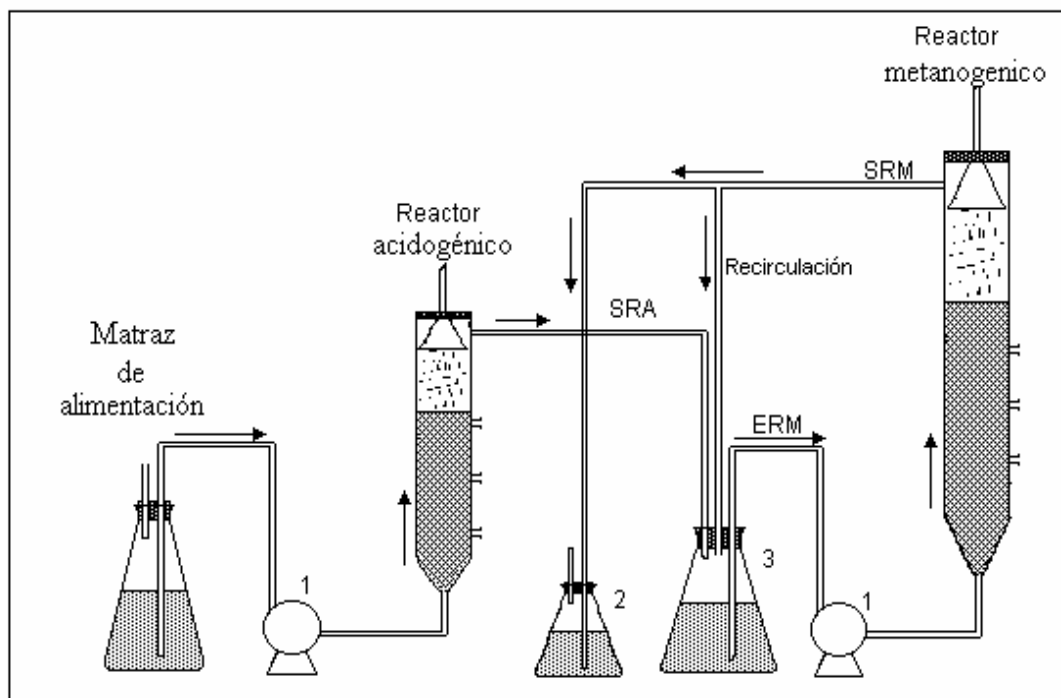


Figura 2.1 Sistema de reactores en serie de la digestión anaerobia en dos etapas. 1. Bombas peristálticas, 2. Recipiente para la salida del reactor metanogénico, 3. Matraz de reflujo. Salida del reactor acidogénico (SRA), Entrada al reactor metanogénico (ERM), Salida del reactor metanogénico (SRM).

2.2.1 Funcionamiento de los reactores.

El medio de alimentación de los reactores fue el medio mineral RAAM (Shelton and Tiedje, 1984), adicionando 1 g/L de lactosa y LAS como fuentes de carbono simulando una agua residual con las características deseadas, probando dos concentraciones distintas de surfactante de 200 y 300 mg/L a diferentes intervalos de tiempo a fin de estudiar su biodegradación por esta biotecnología.

El medio, se alimentó al reactor acidogénico por medio de una bomba peristáltica (1), Cole-Palmer de 1-100 rpm con controlador MasterFlex, el efluente de este reactor se colectó en un matraz de recirculación además de la fracción de efluente que se recirculó del reactor metanogénico. En dicho matraz se adicionó NaHCO_3 para ajustar el pH a 7.

El agua residual colectada en el matraz de recirculación se bombeó con otra bomba peristáltica del mismo modelo hacia el reactor metanogénico.

En la parte superior de cada reactor como lo muestra la figura 2.1, se colocó una campana de vidrio para permitir la separación de las fases sólido-líquido-gas, evitando la salida de biomasa suspendida.

El biogás que salió por este conducto se condujo a un medidor de volumen, el cual se midió con un cuantificador digital de flujo DENE B CDF-402 (figura 2.1.1), que funcionó de la siguiente manera:

El biogás producido por el reactor paso primero por una trampa de humedad, a continuación, mediante una válvula solenoide de tres pasos el gas se condujo a un sistema de vasos comunicantes, los cuales contenían una solución salina saturada y tres electrodos colocados a diferente altura.

La distancia entre los dos electrodos superiores representó un volumen definido de 5 mL.

Al entrar el biogás al primer vaso, este ejerció una presión tal que desplazo el líquido al segundo recipiente. Al subir el nivel del segundo al tercer electrodo mando una señal eléctrica a la válvula solenoide liberando así el biogás acumulado en el primer recipiente, y cada vez que el agua regresaba a su nivel original se registraba un ciclo.

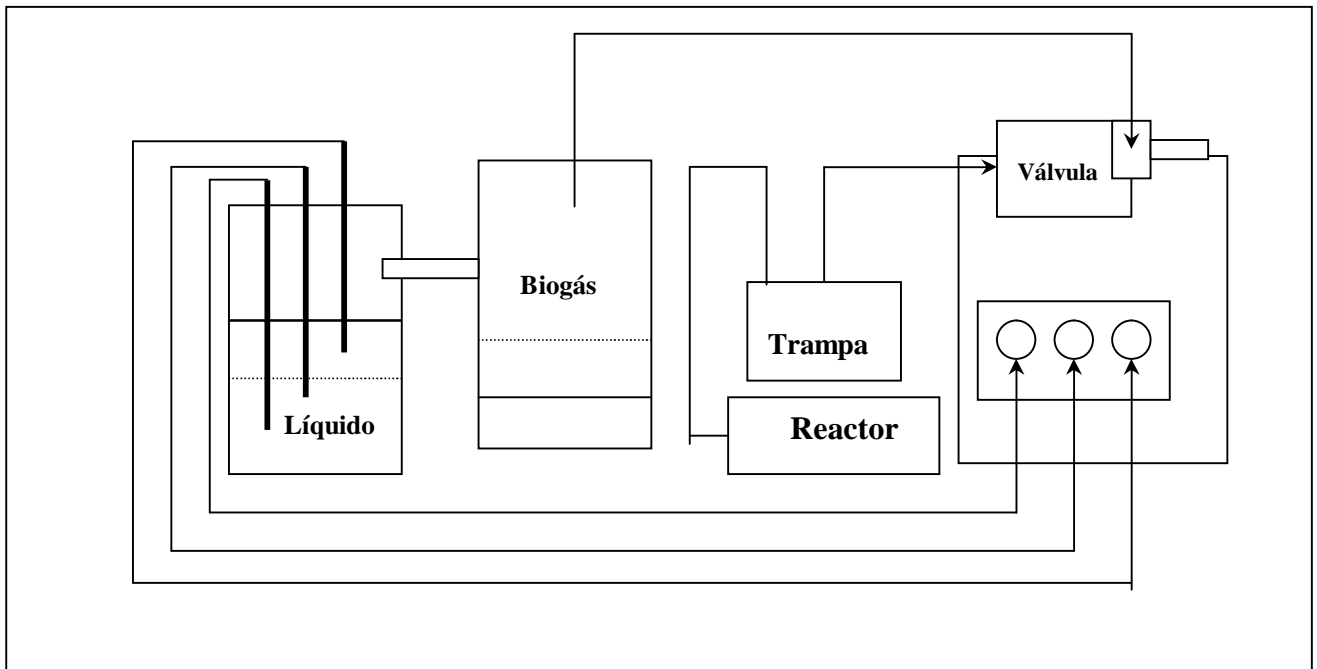


Figura 2.1.1 Cuantificador digital de flujo de biogás

2.3 INOCULO

Los reactores se inocularon con lodos anaerobios provenientes del reactor UASB de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de la UAMI de 50 m³.

El volumen de inóculo fue 1/3 del volumen total de cada reactor, es decir 150 mL de lodo en el reactor acidogénico y 500 mL de lodo en el reactor metanogénico, las características del inóculo se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2.3 Características del inóculo de los reactores UASB.

Concentración de solidos (g/L)	
SST	36.5
SSV	23.6
SSF	13.0

* Lodo del reactor UASB de la PTAR de la UAMI.

2.4 MEDIO BASAL

El reactor acidogénico, se alimentó con medio mineral RAMM (Shelton and Tiedje, 1984).

Este se preparó de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 2.4. Medio mineral RAMM (Shelton and Tiedje, 1984)

Composición		Concentración	
Solución mineral	Reactivo	g/L (*)	ml/L (**)
1	K ₂ HPO ₄	7.0	50
2	KH ₂ PO ₄	5.4	50
	NH ₄ Cl	10.6	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.5	
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.0	
3	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5	1
	ZnCl ₂	0.05	
	H ₃ BO ₃	0.05	
	CuCl ₂	0.03	
	Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O	0.01	
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.05	
	Na ₂ SeO ₃	0.05	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.05	
4	FeCl ₂ ·4H ₂ O	2.0	10

(*) Concentración de reactivo en la elaboración la solución mineral.

(**) Volumen de solución mineral empleada para preparar el medio mineral RAMM.

Una vez preparado el medio basal, su pH se ajustó a 7, después de vertirlo al matraz se colocó un tapón que contaba con 2 tubos, uno de ellos hizo la función de un respirador, mientras que el otro permitió la conexión de una manguera flexible conectada a la succión de la bomba peristáltica a fin de bombear el medio basal al reactor acidogénico.

Eventualmente, al perder actividad las bacterias metanogénicas lo que repercutía sobre la eficiencia de remoción de la DQO, se decidió que ambos reactores fueran alimentados por separado. Por lo tanto, la preparación del medio basal para cada reactor fue:

- Medio basal para el reactor acidogénico, además de las soluciones 1, 2, 3 y 4 se incluyó lactosa como única fuente de carbono.

- Medio basal para el reactor metanogénico, además de las soluciones 1, 2, 3 y 4 se incluyó acetato como única fuente de carbono.

Al recuperarse la actividad metanogénica, el medio basal continuo preparándose con medio mineral RAMM (Shelton and Tiedje, 1984), lactosa y acetato como fuentes de carbono.

2.5 Condiciones de operación.

Tabla 2.5 Condiciones de operación de los reactores UASB.

Condición	reactor acidogénico	reactor metanogénico
Volumen	360 mL	1440 mL
Flujo	1.44 L/d	1.44 L/d
TRH	6 horas	1 día
pH _E	7	*
pH _S	4.5 promedio	7.5 promedio
Temperatura	35°C	35°C

* Al bajar el pH del reactor metanogénico como consecuencia de la acidificación del reactor acidogénico, el pH del agua residual colectada en el matraz de recirculación se ajusto a 7 con NaHCO₃, manteniendo de esta manera el pH a la entrada del reactor metanogénico a un pH de 7.

2.6 MUESTREO

2.6.1 Muestras líquidas. Se tomó un volumen de muestra líquida de 50 mL del influente y efluente del reactor acidogénico y del efluente del reactor metanogénico, así como del matraz de recirculación. Se midió diariamente la DQO, la producción de AGV, el consumo de lactosa, el pH y el LAS residual.

2.6.2 Muestra gaseosa. Diariamente se tomó una muestra de biogás acumulado en el recipiente tipo vaso comunicante de cada reactor, la cual se inyectó al cromatógrafo de gases equipado con un detector de conductividad térmica y una columna empacada de Carbosphere (80/100), y así determinar que proporción de metano y que proporción de CO₂ estaba presente en el biogás.

2.7 Análisis químicos.

Tabla 2.7 Análisis determinados en el sistema de reactores UASB.

Parámetro	Reactor acidogénico		Reactor metanogénico	
	Influyente	Efluente	Influyente	Efluente
DQO				
Lactosa				
SAAM				
pH				
AGV				
CH ₄ y CO ₂				

2.8 Técnicas analíticas

2.8.1 Demanda química de oxígeno (DQO).

La materia orgánica expresada como DQO, se analizó mediante la técnica de reflujo cerrado (Standard Methods, 1985), modificado por (Wilson and Jarbas, 1989). Anexo 7.1. A la muestra tomada a la entrada y salida de cada reactor, se adicionaron 2.5 mL de cada muestra en tubos de ensaye, 1.5 mL de solución digestora de dicromato de potasio y 3.5 mL de una solución de ácido sulfhídrico con sulfato de plata. Se homogenizó perfectamente mediante un vortex y se colocaron en una parrilla digestora a 150 °C por dos horas, luego se dejaron enfriar por 20 minutos y finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic 20 Bausch & Lomb a una longitud de onda de 620 nm. Y haciendo uso de la curva estándar (anexo 7.2), se determinaron los mg/L de DQO.

2.8.2 Cuantificación de lactosa.

Se determinó mediante la técnica de fenol sulfúrico modificado por Wilson and Jarbas (1989) para cuantificar azúcares totales. Se tomó 1 mL llevándose a un volumen final de 50 mL en un matraz aforado. Del cual se tomó 2 mL a los que se les adicionó 1 mL de solución de fenol al

5% y 5 mL de H₂SO₄ concentrado, se mezcló perfectamente, posteriormente los tubos se dejaron reposar durante 10 minutos y finalmente se leyó la absorbancia de cada tubo a 480 nm. Haciendo uso de la curva estándar (anexo 7.3), se determinaron los mg/L de lactosa.

2.8.3 Determinación de alquilbencen sulfonato de sodio (LAS).

Se realizó mediante la técnica de sustancias activas al azul de metileno SAAM (APHA, 1989). Las muestras se tomaron de la alimentación y efluente de cada reactor. De esa muestra, 1 mL se aforó a 100 mL con agua destilada, después el contenido del matraz aforado se vertió al embudo de separación de fases al cual se le adicionó unas gotas de fenoftaleína como indicador alcalinizándose con NaOH 1N hasta adquirir una coloración ligeramente rosa, posteriormente se acidificó con H₂SO₄ 1 N, hasta decoloración completa, añadiendo 25 mL de azul de metileno y 10 mL de cloroformo, este se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó reposar por 5 minutos para dar lugar a la separación de fases, una vez separadas, la fase formada en el fondo del embudo de separación, se colectó en un matraz erlenmeyer. Posteriormente al embudo de separación nuevamente se le adicionaron 10 mL de cloroformo repitiendo el mismo procedimiento por dos ocasiones más. El residuo del embudo de separación se eliminó y el extracto colectado en el matraz fue vertido nuevamente al embudo, adicionando 50 mL de la solución limpiadora de detergentes y 10 mL de cloroformo, repitiendo el procedimiento anterior y colectando nuevamente el extracto. Por 2 ocasiones más se adicionó 10 mL de cloroformo repitiendo el procedimiento descrito anteriormente. Una vez colectado todo el extracto, este se filtró y se procedió a leer su absorbancia a 652 nm. Para conocer la concentración de surfactante en las muestras, se elaboró una curva de calibración de surfactante a concentración conocida contra la absorbancia (anexo 7.4).

2.8.4 Ácidos grasos volátiles (AGV).

La determinación se realizó por cromatografía de gases, utilizando un gradiente de temperatura. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 serie II, equipado con un

detector de ionización de flama y una columna megaboro AT 1000, las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura de columna = 120°C.
- Temperatura del inyector = 130°C.
- Temperatura del detector = 150°C .
- Columna capilar superox FA de 10 metros, fase AT 1000. Altech N° 955110
- N₂ = 3 mL/min, H₂ = 30 mL/min y Aire 300 ml/min.
- Volumen de inyección, 0.2 μ L.
- Tiempo de inicio, 1 minuto.
- Rango de temperatura, 10°C/min.
- Tiempo final, 3 min.

Del efluente de cada reactor, se tomó un volumen de 950 μ L de muestra que se colocó en un tubo eppendorf y a las que se les adicionó 50 μ L de HCl al 50%, se centrifugó a 15,000 r.p.m. durante 20 minutos en una microcentrífuga. Del sobrenadante se tomó 0.2 μ L que fue inyectado al cromatógrafo. Se hizo una curva de calibración para AGV (anexo 7.5).

2.8.5 Biogás (CH₄ y CO₂).

El metano y el bióxido de carbono se determinaron por cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo Gow-Mac serie 550, con un detector de conductividad, equipado con una columna de carbosphere. Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura de la columna, 140°C.
- Temperatura del detector, 190°C.
- Temperatura del inyector, 170°C.
- Corriente de los filamentos, 120 mA.
- Gas acarreador: Helio a 30 mL/min y una presión de 50 psi.

Para conocer la fracción de CH_4 en el biogás producido/día se empleo una curva estándar (anexo 7.6), mediante la cual se determinó la producción de CH_4 (litros /día) de cada reactor.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Resultados en marcha de los reactores UASB.

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

45

El experimento duró 390 días, en las tablas 3.1 y 3.1.1 se muestra las etapas que operó el sistema de ambos reactores UASB de flujo ascendente.

Tabla 3.1 Alimentación del reactor acidogénico

Etapa	Duración (días)	Fuente de carbono		Concentración (mg/L)	
		Lactosa	*LAS	Lactosa	LAS
I	0 al 62		-	1,000	-
IIa	63 al 120			1,000	200
IIb	121 al 174			1,000	200
III	175 al 244		-	1,000	-
IV	245 al 290			1,000	200
V	291 al 343			1,000	300
VI	344 al 374		-	1,000	-
VII	375 al 390		-	1,000	-

*LAS: Alquil bencensulfonato de sodio (Surfactante).

Tabla 3.1.1 Alimentación del reactor metanogénico

Etapa	Duración (días)	Fuente de carbono presente en:		Concentración (mg/L)
		*Agua residual del reactor acidogénico	Acetato	
I	0 al 62			
IIa	63 al 120			1,000
IIb	121 al 174			
III	175 al 244			
IV	245 al 290			
V	291 al 343			
VI	344 al 374			
VII	375 al 390			1,000

* Operación en serie del reactor metanogénico, alimentado con el agua residual del reactor acidogénico.

3.1.1 DQO en los reactores UASB operados en serie.

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

Etapa I. A partir del día 0 y hasta el día 62 de operación ambos reactores UASB fueron operados en serie para estabilizarse (tabla 3.1), durante esta primer etapa el reactor acidogénico ⁴⁶

se alimentó con 1 g/L de lactosa generando una carga orgánica de 1.066 g/L·d de DQO, se trabajó a un TRH de 6 hrs, trabajando al reactor metanogénico a un TRH de 1 día.

La figura 3.1.1, muestra la eficiencia de remoción de la DQO de ambos reactores, en esta primer etapa, en la que el reactor acidogénico alcanzó un 29.41% y un 52.84% en el reactor metanogénico debido a la acidificación del primer reactor a consecuencia de la lactosa que por ser un sustrato fácilmente hidrolizable provocó una sobrecarga de los ácidos grasos volátiles producidos.

En efecto, cuando existe una elevada concentración de AGV que bicarbonato en el medio, la metanogénesis es inhibida, en teoría cuando el sustrato se transforma a metano y CO₂, el primero pasa totalmente a la fase gaseosa mientras que parte del segundo se queda en la fase líquida como bicarbonato y carbonato, lo que resulta favorable para la metanogénesis, para lograr esto, es importante que haya un equilibrio entre el CO₂ y el bicarbonato en el sistema lo que permite controlar el pH del reactor metanogénico (McCarty, 1964).

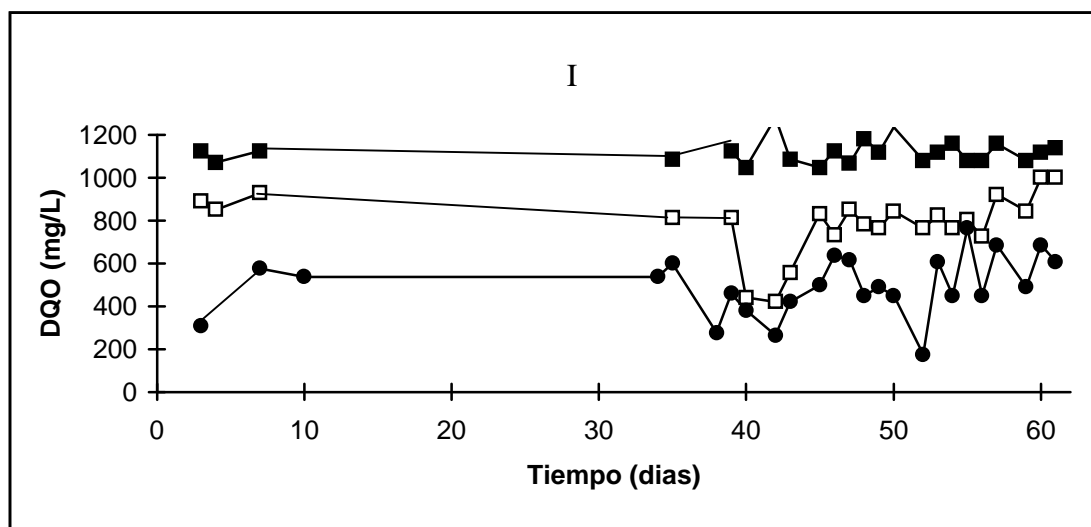


Figura 3.1.1 Eficiencia de remoción de la DQO en los reactores UASB operados en serie (□ Entrada

R.A., ○ Salida del R.A. y Entrada R.M., ● Salida del R.M).

3.2 DQO en el reactor acidogénico.

Etapa IIa La figura 3.2, muestra el comportamiento del reactor acidogénico a partir del día 63 de operación, durante esta etapa se alimentó con 1 g/L de lactosa y 200 mg de surfactante aniónico alquilbencen sulfonato de sodio, lo que produjo una carga orgánica de 1.446 g/L.d de DQO.

Al transcurrir el tiempo, este reactor presentó un comportamiento variable en cuanto a la eficiencia de remoción de la DQO alcanzando un promedio del 50% hasta el día 90 de operación, luego se estabilizó y en los siguientes 14 días alcanzó una eficiencia promedio del 54% sobre la remoción de DQO.

Del día 105 al 116 se mejoró siendo del 80%, sin embargo a partir del día 117 al 120 se dio lugar a una pérdida gradual sobre la eficiencia de remoción hasta ser del 51.54%, que probablemente se debió a la velocidad de producción de AGV con la consecuente disminución de CO₂ excediendo la producción de AGVH, provocando que la acumulación de LAS se favoreciera en los lodos del reactor (figura 3.7.1).

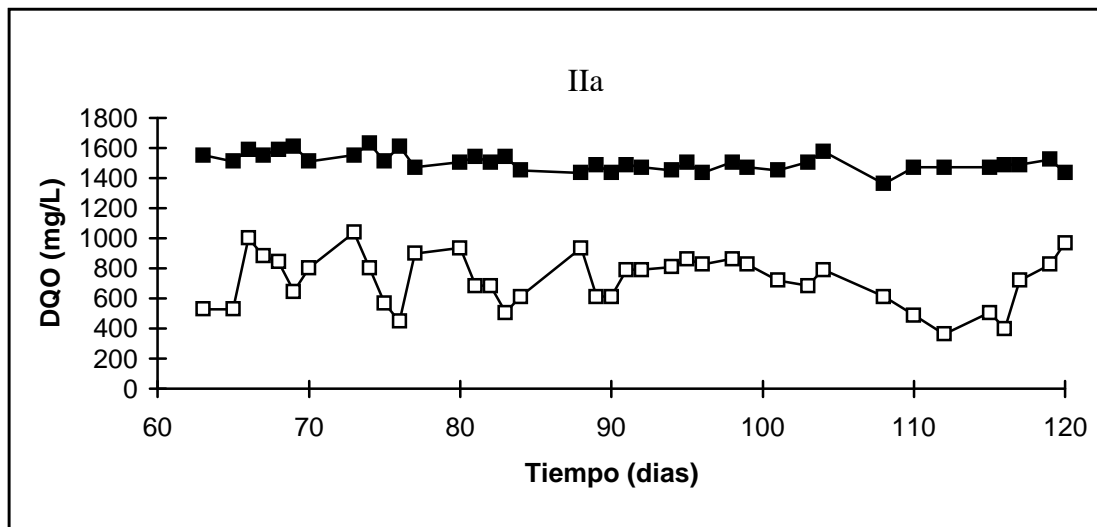


Figura 3.2 Eficiencia de remoción de la DQO en el reactor acidogénico alimentado con lactosa y LAS como fuentes de carbono (● Entrada, ○ Salida)

3.3 DQO en el reactor metanogénico.

Jesús Terreros Mecalco
Maestría en Biotecnología

La figura 3.3 (Etapa IIa), muestra el comportamiento del reactor metanogénico que debido a acidificación del acidogénico, se decidió separarlo del efluente de este reactor 48 incluyendo en el medio basal (Apartado 2.4) 1 g/L de acetato de sodio como única fuente de carbono, el pH se ajustó a 7 para recuperar la actividad de las bacterias metanogénicas. En los primeros 20 días de operación, la eficiencia de remoción de DQO fue variable, a partir del día 73 al 80 mejoró hasta alcanzar un 83%. Durante los siguientes 40 días, el reactor se estabilizó logrando en promedio un 69.26% de remoción de la DQO.

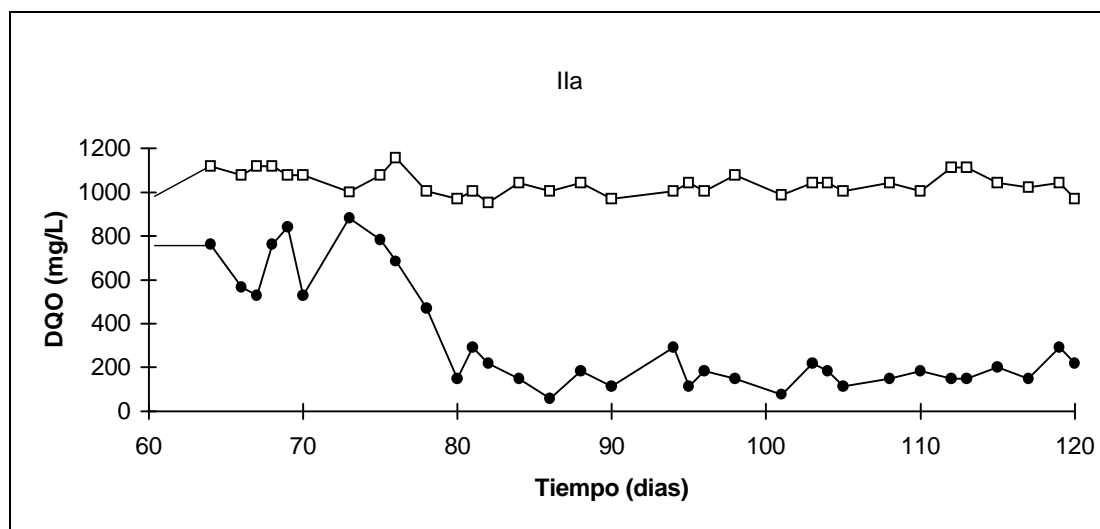


Figura 3.3 Eficiencia de remoción de la DQO en el reactor metanogénico alimentado con acetato como única fuente de carbono (○ Entrada, | Salida)

3.4 Operación en serie de los reactores UASB para la biodegradación del surfactante LAS.

Al recuperar la actividad de los lodos en el reactor metanogénico se favoreció la eficiencia de remoción de la DQO, y con base a esto, se decidió alimentar nuevamente este reactor con el agua residual del reactor acidogénico. Y para evitar que el reactor metanogénico fuera inhibido

debido a la presencia de altas concentraciones de AGV en acidogénico, se recirculo una fracción del efluente del reactor metanogénico que junto con el efluente del reactor acidogénico colectados en un matraz se adicionó bicarbonato de sodio para ajustar a 7 el pH del influente del reactor metanogénico controlando de esta forma el proceso de metanogénesis.

La figura 3.4.1 (etapa IIb), muestra la eficiencia de remoción de DQO de cada reactor a lo largo de 254 días en que se operaron en serie.

Durante esta etapa que inicio a partir del día 120 y finalizó el 174, el medio basal con el que se alimentó al reactor acidogénico incluyó 1 g/L de lactosa y 200 mg/L de LAS como fuentes de carbono.

Con el tiempo el reactor acidogénico gradualmente perdió eficiencia de remoción de la DQO pasando de un 30% de eficiencia hasta ser casi nula el día 174, a consecuencia de la variación de pH por la producción de propionato que acetato (figura 3.8.1), lo que inhibió a las bacterias metanogénicas reflejándose en su eficiencia de remoción de la DQO pasando del 70% a 0%, así mismo se efecto la biodegradación de LAS dado a que se apreció la misma concentración a la entrada y salida del reactor (Figura 3.4.2), favoreciéndose al mismo tiempo la acumulación de éste (figura 3.7.1).

A partir del día 175 y hasta el día 244 (etapa III), se suspendió la alimentación de LAS como segunda fuente de carbono, quedando solamente lactosa como única fuente de carbono en el medio basal con la finalidad de recuperar la actividad acidogénica y metanogénica de los reactores y mejorar la eficiencia de remoción de la DQO de ellos.

La diferencia de DQO a la entrada y salida fue indicativa de la eliminación de la materia orgánica (Figura 3.4.1), por lo tanto; a medida que transcurrió el tiempo se observó una mejora en la remoción de la DQO de ambos reactores alcanzando en promedio un 34.19% en el acidogénico y de un 73.72% en el metanogénico.

A pesar de que el sistema no fue alimentado con LAS, se continuo apreciando un remanente de LAS en el efluente de éstos, lo que hizo suponer la existencia de un fenómeno de desorción de LAS acumulado en los lodos de los reactores.

Al recuperarse la actividad de los lodos de los reactores, a partir del día 245 y hasta el día 290 de operación (etapa IV), nuevamente se incluyeron 200 mg/L de LAS en el medio de

alimentación del reactor acidogénico para notar por segunda ocasión la acumulación creciente de LAS en los lodos de ambos reactores (figura 3.7.1 y 3.7.2) repercutiendo en la actividad bacteriana de estos, afectando nuevamente las eficiencias de remoción de la DQO, así como la biodegradación del LAS, siendo del 42.24% y 47% respectivamente, mientras que en el reactor metanogénico fueron del 83.10% y del 47.65% respectivamente, el último día del periodo (figura 3.4.2) el reactor acidogénico biodegradó el LAS en un 58%, mientras que el reactor metanogénico lo biodegradó en un 29.41%.

A partir del día 291 y hasta el día 343 (Etapa V), se incrementó la concentración de LAS de 200 a 300 mg/L generando una carga orgánica de 1.636 g/L·d de DQO.

Durante los primeros 40 días, el reactor acidogénico presentó una disminución en la eficiencia de remoción de DQO hasta llegar al 39.6%, biodegradando el LAS en un 65.86%. A partir del día 331, disminuyó gradualmente su eficiencia de remoción de DQO hasta llegar al 36.57%, biodegradando el LAS en un 68.77%.

Debido a la presencia del LAS residual del primer reactor, las bacterias metanogénicas fueron inhibidas disminuyendo su eficiencia de remoción de DQO, hasta el 20 % durante los primeros 40 días, biodegradando en promedio solo un 14% del LAS, por lo tanto, el LAS residual del efluente del reactor acidogénico repercutió a un más sobre la actividad de las bacterias metanogénicas ya que a partir del día 331 (figura 3.4.1) gradualmente perdió eficiencia tanto de remoción de la DQO como de biodegradación del LAS hasta ser nulas.

A consecuencia de la disminución de la actividad de las bacterias acidogénicas e inhibición de las metanogénicas, a partir del día 344 y hasta el 374 (etapa VI), se decidió suspender el LAS del medio de alimentación del reactor acidogénico, alimentándolo solo con 1 g/L de lactosa para recuperar la actividad bacteriana de ambos reactores (Figura 3.4.1), alcanzando una eficiencia de remoción de la DQO en el reactor acidogénico del 33.24%, mientras que en el metanogénico en promedio fue del 42.53% hasta el día 372 para llegar a ser nula el día 374, a pesar de no estar presente el LAS nuevamente se presentó un remanente de surfactante en el efluente de ambos reactores (figura 3.4.2).

Etapa VII. Finalmente, a partir del día 375 de operación se separaron los reactores, el reactor acidogénico continuo alimentándose con lactosa mientras que el metanogénico se alimentó con acetato de sodio, alcanzando una eficiencia de remoción de la DQO del 19.92% en el primer reactor y un 50.73% en el segundo, observándose todavía la presencia de surfactante en los efluentes de los reactores (figura 3.4.2), reafirmando la acumulación de LAS en el lodo tanto del reactor acidogénico como en el lodo del reactor metanogénico (Figuras 3.7.1 y 3.7.2).

3.4.1 Balance de la DQO en los reactores.

Tabla 3.4.1.1 Balance de DQO en el reactor acidogénico.

	I	IIa	*IIb	III	IV	V	VI	VII
DQO _E	1,118.62	1,499	1,479	1,123	1,503	1,709	1,074	1,065
DQO _S	789.54	726.34	1,032	739	868	1,084	717	852.78
% de eficiencia de remoción de DQO	29.41	51.54	30.22	34.19	42.24	36.57	33.24	19.92

* Hasta el día 170, posteriormente la eficiencia de remoción de la DQO llega a 0%.

Tabla 3.4.1.2 Balance de DQO en el reactor metanogénico.

	I	IIa	*IIb	III	IV	*V	***VI	VII
DQO _E	1,052.69	1,066	1,372	982.87	1,154	1,441	953.61	1,134
DQO _S	496.37	327.68	405.36	258.29	195.06	658.69	547.97	558.74
% de eficiencia de remoción de DQO	52.84	69.26	70.46	73.72	83.10	54.31	42.53	50.73

* Hasta el día 170, posteriormente la eficiencia de remoción de la DQO llega a 0%.

** Hasta el día 314, posteriormente la eficiencia de remoción de la DQO llega a 0%.

*** Hasta el día 372, posteriormente la eficiencia de remoción de la DQO llega a 0%.

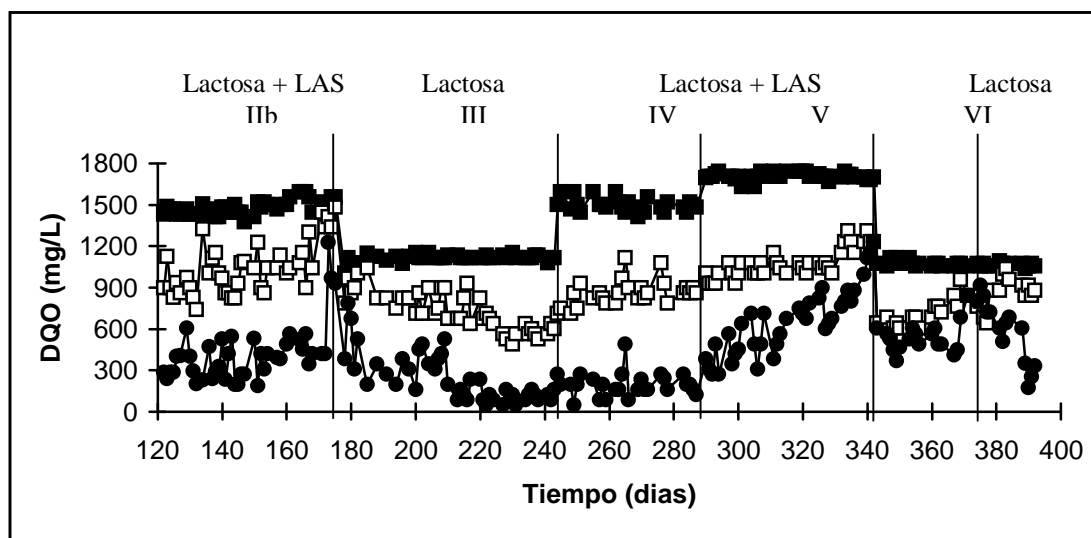


Figura 3.4.1 Eficiencia de remoción de la DQO en los reactores UASB en serie, alimentados con lactosa y LAS (□ Entrada R.A., ○ Salida del R.A. y ● Entrada R.M, | Salida del R.M).

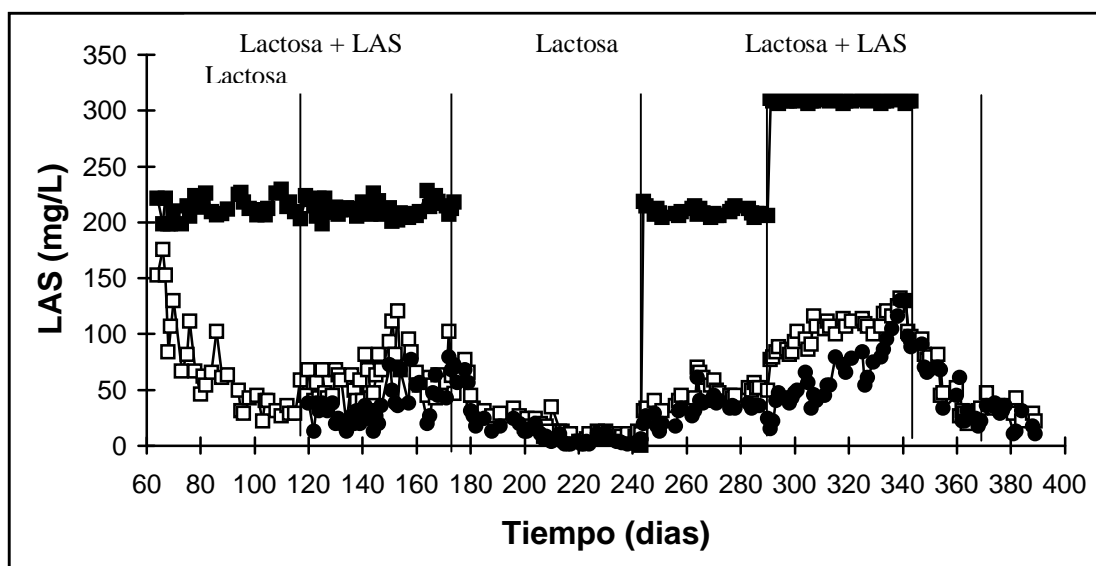


Figura 3.4.2 Eficiencia de biodegradación del surfactante en los reactores UASB (□ Entrada R.A., ○ Salida R.A. y ● Entrada R.M, | Salida R.M).

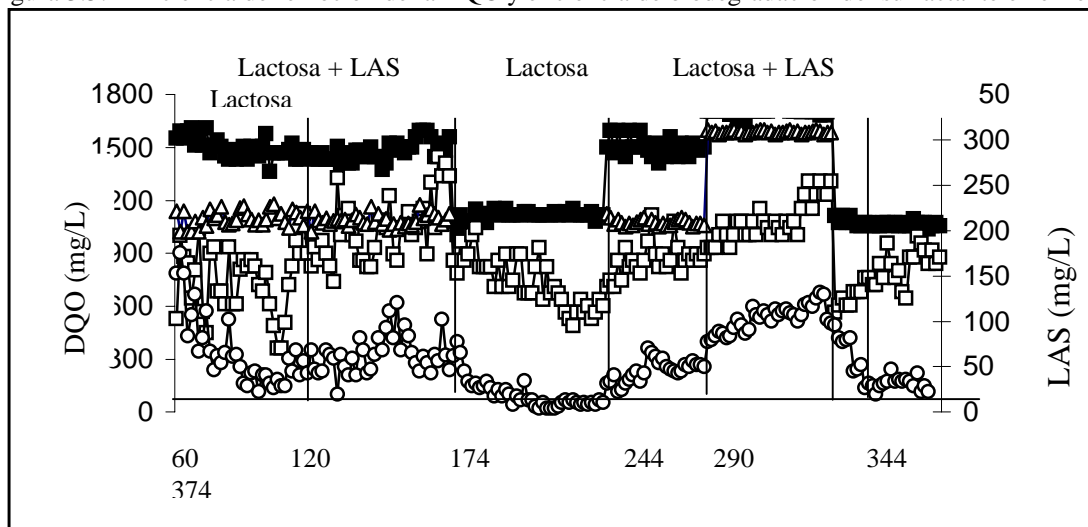
3.5 Eficiencia de remoción de la DQO en presencia del surfactante.

El LAS se degradó solo en el reactor acidogénico, aunque parte del surfactante de entrada se absorbió en los lodos de los reactores, ya que es altamente absorbido por los gránulos y algunas

veces puede representar hasta un 60% de la cantidad total (González-Mazo et al., 1998). La figura 3.5.1 muestra la eficiencia de remoción de la DQO en el reactor acidogénico a partir del día 64 y hasta el día 390 de operación. A partir del día 64 y hasta el día 174 se dio lugar a una pérdida gradual sobre la eficiencia de remoción de DQO hasta llegar a ser nula, sin embargo al suspender el LAS a partir del día 174 y hasta el día 244, la eficiencia mejoró gradualmente hasta alcanzar un 34.19% de remoción de la DQO, observándose un remanente de surfactante en el efluente del reactor.

Del día 244 y hasta el día 290 en que se adicionó LAS al medio de alimentación, la eficiencia de remoción de la DQO alcanzó un 42.24%, observándose una acumulación de surfactante en los lodos. Al incrementar la concentración de LAS de 200 a 300 mg/L a partir del día 290 y hasta el día 344 de operación, la eficiencia de remoción de la DQO disminuyó hasta un 36.57% debido a la acumulación del surfactante en los lodos (figura 3.7.1). Del día 344 y hasta el día 374 decidió suspenderse el LAS de la alimentación del reactor, y a pesar de esto continuo la presencia de un remanente de LAS en el efluente del reactor (figura 3.5.1), con dicha acumulación de LAS, la actividad de las bacterias acidogénicas disminuyo hasta alcanzar un 33.24% de eficiencia de remoción de la DQO, a partir del día 375 decidió alimentarse solamente con lactosa como única fuente de carbono para recuperar la actividad de las bacterias acidogénicas y por lo tanto mejorar la eficiencia de remoción de la DQO siendo esta del 19.92%.

Figura 3.5.1 Eficiencia de remoción de la DQO y eficiencia de biodegradación del surfactante en el reactor



△

○

La figura 3.5.2, muestra el comportamiento del reactor metanogénico durante 270 días de operación, a partir del día 120 y hasta el día 174 perdió eficiencia tanto de remoción de la DQO como de biodegradación de LAS hasta ser nulas. Del día 175 y hasta el 244, al suspender el LAS e incluir solo lactosa en el medio de alimentación del primer reactor, se recuperó la actividad metanogénica alcanzando una eficiencia de remoción del 73.72%, detectando un remanente de LAS en el efluente del reactor al analizarlo mediante la técnica del SAAM.

A partir del día 245 y hasta el día 290, el reactor metanogénico se expuso al LAS residual del acidogénico observándose una ligera acumulación de LAS en los lodos del metanogénico alcanzando una eficiencia de remoción del 83.10%, luego del día 291 y hasta el día 343 al incrementar la concentración de surfactante de 200 a 300 mg/L en el medio de alimentación del reactor acidogénico, el reactor metanogénico perdió eficiencia de remoción de la DQO pasando del 54.3% (día 372), hasta ser nula debido a una mayor concentración de LAS en el agua residual del reactor acidogénico lo que afectó a las bacterias metanogénicas (figura 3.7.2). A partir del día 344 y hasta el día 374 de operación, nuevamente se suspendió el LAS de la alimentación del primer reactor, mejorando la eficiencia de remoción en un 42.53%, a partir del día 375 el reactor metanogénico se separó del efluente del reactor acidogénico y se alimentó con acetato de sodio para recuperar la actividad de las bacterias metanogénicas y mejorar su eficiencia de remoción de la DQO llegando a ser en promedio del 50.73%.

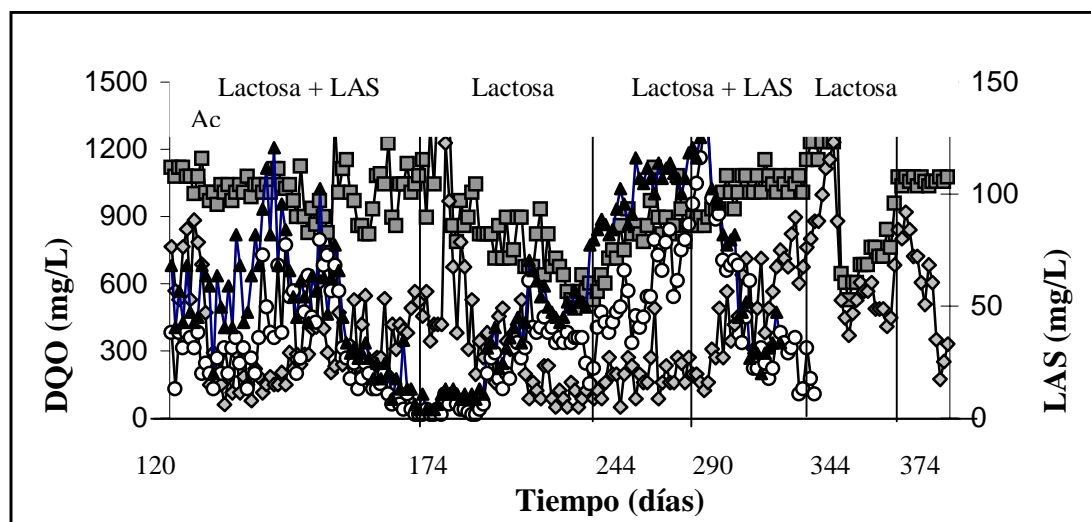


Figura 3.5.2 Eficiencia de remoción de la DQO y eficiencia de biodegradación del surfactante (■ DQO y ▲ LAS en influente, ◇ DQO y ○ LAS en efluente)

3.6 Conversión de lactosa a AGV en los reactores UASB.

La figura 3.6, muestra la concentración de lactosa residual en el reactor acidogénico durante la hidrólisis y fermentación a AGV, así como la concentración de lactosa residual en el reactor metanogénico que no se transformo a AGV, la hidrólisis de los polímeros biológicos a monómeros que después son fermentados a compuestos químicos simples como ácidos grasos volátiles (C_1 - C_4) y otros ácidos orgánicos (mas de 5 carbonos); alcoholes y gases como H_2 y CO_2 (Gujer and Zehnder, 1983) se llevan a cabo durante la primer etapa de la digestión anaerobia.

La concentración de lactosa empleada en la alimentación del reactor acidogénico generó una Cov de 4.61 g de DQO/L'd haciéndo que predominara el ácido acético con relación a los demás ácidos producidos (figura 3.8.1), es decir, la proporción de AGV en el reactor metanogénico como resultado de la hidrólisis y fermentación de la lactosa residual del primer reactor (figura 3.6) fue en menor grado (figura 3.8.2).

De esta manera se evitó la acumulación de ácidos grasos volátiles en el reactor acidogénico evitándo la inhibición de las bacterias metanogénicas.

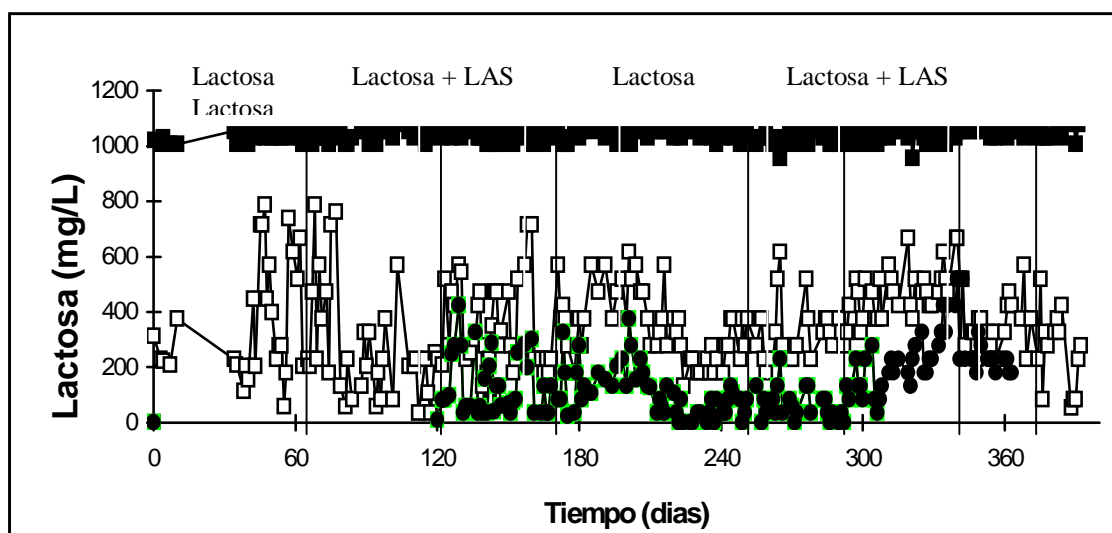


Figura 3.6 Conversión de lactosa a AGV en los reactores UASB (∇ Entrada de R.A., \circ Salida de R.A y \square Entrada de R.M, \mid Salida de R.M.).

3.7 Acumulación teórica de surfactante en los reactores.

Las figuras 3.7.1 y 3.7.2, muestran la acumulación de surfactante en los lodos de ambos reactores. Como se mencionó anteriormente (apartado 1.3.1.3) los LAS persisten en ambientes anaerobios como sedimentos acuáticos y lodos de digestores (Wolf and Feijtel, 1998), además de que no se degradan en condiciones anaerobias (Maurer, 1965; Wagener and Shink, 1987; Federle and Schwab, 1992).

Bajo condiciones anaerobias (Maurer, 1965) demostró que no hay degradación de LAS, pero sí una inhibición de la metanogénesis a partir de una concentración de 214 mg/L. Esto confirmó el comportamiento del sistema de reactores UASB durante el proceso de biodegradación del LAS, de acuerdo al siguiente balance:

$$LAS_E = LAS_{TEORICO \text{ ACUMULADO EN LOS LODOS}} + LAS_{REMANENTE EN EL EFLUENTE}$$

El LAS no se degrado por esta vía, dió lugar a la acumulación de este lo que probablemente disminuyó la producción de biomasa y consecuentemente provocó que se diera lugar a la perdida de eficiencia de remoción de la DQO. Observándose una mayor acumulación de LAS en el reactor acidogénico en relación con el metanogénico, a pesar de esto las bacterias acidogénicas no disminuyen tanto su actividad metabólica como las bacterias metanogénicas.

Cabe mencionar que durante las etapas en la que se suspendía el LAS de la alimentación del reactor acidogénico, se observó un remanente en el efluente tanto del reactor acidogénico como del reactor metanogénico, tardando en promedio 16 días en recuperarse la actividad de las bacterias acidogénicas y 36 días las bacterias metanogénicas.

Tabla 3.7.1 Balance del surfactante en el reactor acidogénico

mg/L	I	Ia	Ib	III	IV	V	VI	VII
LAS _{ENTRADA}	■	11,400	10,600	■	9,000	15,600	■	■
LAS _{SALIDA}	■	2,208.25	2,567.05	*861.31	1,201.10	3,506.31	*841.45	*284.05
LAS _{ACUM.}	■	4,355.38	1,912.4	1,051	3,569.57	5,099.01	4,257.56	3,973.51
LAS _{BIODEG.}	■	4,836.37	6,120.55	■	4,229.33	6,994.68	■	■

*Se contempló dentro del LAS acumulado para hacer el balance.

■ No hubo presencia de LAS.

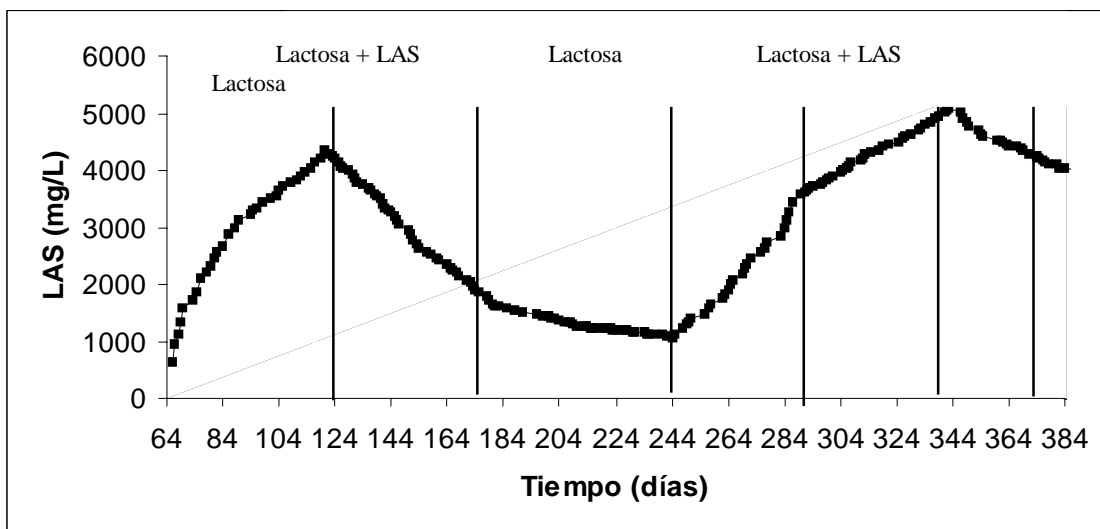


Figura 3.7.1. Tendencia sobre la acumulación del surfactante aniónico Alquilbencen sulfonato de sodio (LAS) en los lodos del reactor acidogénico.

Tabla 3.7.2 Balance del surfactante en el reactor metanogénico

mg/L	I	IIa	IIb	III	IV	V	VI	VII
LAS _{ENTRAD}	■	■	5,796.31	2,266.80	2,936.95	7,813.43	2,065.60	▨
LAS _{SALIDA}	■	■	1,574.48	560,08	857.49	2,238.86	712.41	▨
LAS _{ACUM.}	■	■	1,341.72	524.71	679.84	1,808.65	478.14	▨
LAS _{BIODEG.}	■	■	2,880.11	1,182.01	1,399.62	3,765.92	875.05	▨

■ No hubo presencia de LAS. ▨ Se suspendió los análisis de surfactante.

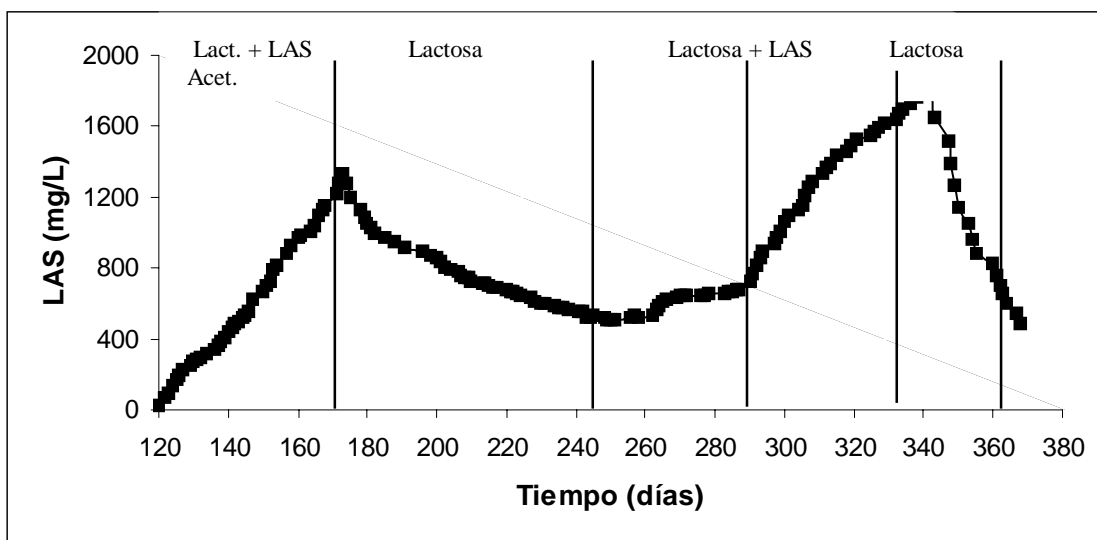


Figura 3.7.2 Tendencia de la acumulación del surfactante aniónico Alquilbencen sulfonato de sodio (LAS) en los lodos del reactor metanogénico.

3.8 pH en el reactor acidogénico y reactor metanogénico.

El pH juega un papel muy importante en los procesos de tratamiento de las aguas residuales debido a que afecta a los microorganismos ya que la mayoría de ellos opera a un pH neutro, además afecta a las solubilidades y los equilibrios de los componentes orgánicos e inorgánicos presentes, por lo tanto, influye en los procesos de anaerobiosis durante la biodegradación de compuestos indeseables para el medio ambiente y, en algunos casos llega a ser un inhibidor potencial para el proceso.

La figura 3.8.1, muestra el comportamiento del pH en el reactor acidogénico, a lo largo de todo el experimento. El pH de la alimentación se ajustó a 7 con NaOH 1N. A partir del día 44 y hasta el día 104 de operación el pH se comportó de manera variable alcanzando un promedio de 4.5 unidades de pH, luego del día 105 y hasta el día 164 se mantiene constante, con esta primer etapa de la digestión anaerobia se a partir de la hidrólisis y acidogénesis de la lactosa se produjo por fermentación los ácidos grasos volátiles.

Sin embargo a partir del día 178 y hasta el día 184 de operación a consecuencia de la producción de AGV, el pH baja en forma abrupta de 7 a 3.5, esto se explica debido al incremento en la proporción de ácidos de cadena mayor como propionico y butírico lo que es indeseable para la metanogénesis.

En efecto, la mezcla de ácidos producidos esta en función de la concentración de hidrógeno en el medio (figura 3.8.1), cuando esta es baja (5-50 ppm) existe una preferencia en la formación de ácido acético (Mosey, 1983; Harper and Pohland, 1985; Hickey and Switzenbaum, 1988). Cuando aumenta disminuye la proporción de este ácido y aumenta la proporción de ácidos de mas de dos carbonos.

A partir del día 190 y hasta el día 310, el pH nuevamente se mantiene estable, sin embargo por dos ocasiones mas nuevamente el pH baja en forma abrupta de 7 a 3.5, esto ocurrió los días 314 y 340 respectivamente.

Cuando los AGV no son transformados a metano estos se acumulan, cambiando el equilibrio $HAGV \longrightarrow AGV^- + H^+$ hasta que la especie no protonada consuma el bicarbonato presente, por lo tanto los ácidos grasos volátiles en su forma protonada (AGVH) resultan

potencialmente tóxicos para las bacterias encargadas de la metanogénesis, pero no su forma disociada (AGV).

El pH del efluente del reactor metanogénico a partir del día 44 y hasta el día 384 de operación se mantuvo en un promedio de 7.5 unidades de pH. (figura 3.8.2), a excepción de los primeros 62 días de operación en donde el pH a la entrada del reactor metanogénico fue de 4.5 lo que afecto la actividad de las bacterias metanogénicas ya que la mayor parte de ellas se desarrollan dentro de un intervalo de pH entre 6 y 8 con un óptimo de 7 (Madigan, 1988).

A consecuencia de la acidificación, se separo del efluente del primer reactor y se alimentó con acetato a partir del día 63 y hasta el día 120 para recuperar la actividad de las bacterias metanogénicas (figura 3.3).

Una vez recuperada dicha actividad nuevamente se alimentó con el efluente del reactor acidogénico, a partir del día 121 de operación adaptando un matraz de recirculación para controlar el pH de entrada al reactor metanogénico con NaHCO_3 .

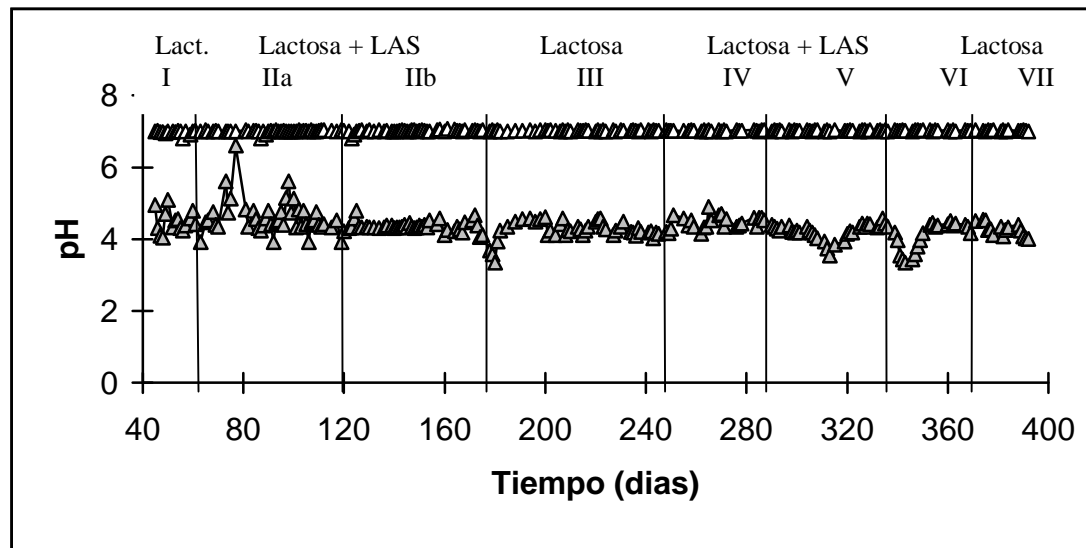


Figura 3.8.1 pH en el reactor acidogénico (∇ Influyente y \triangle Efluente).

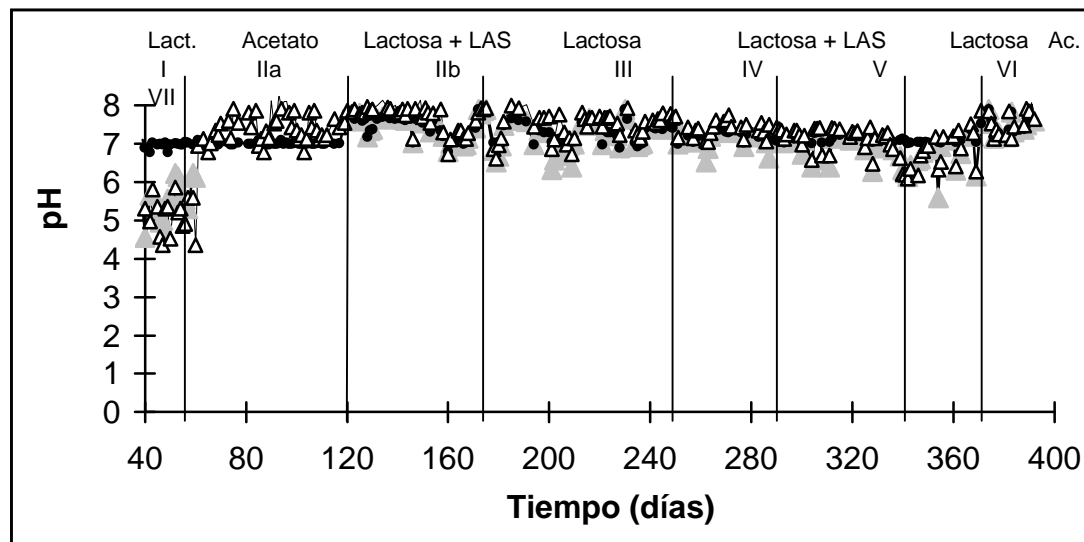


Figura 3.8.2 pH en el reactor metanogénico (Δ Influyente y Δ Efluente).

3.9 Producción de AGV y su conversión a biogás en el reactor acidogénico.

En el arranque y estabilización de los reactores UASB operados en serie, durante los primeros 62 días de operación, el reactor acidogénico se alimentó con lactosa como única fuente de carbono, iniciando en este reactor la primera etapa de la digestión anaerobia que por hidrólisis y fermentación se produjeron los AGV. La conversión metabólica de la materia orgánica a AGV fueron indicativos del comportamiento de los reactores y por lo tanto de sus eficiencias de remoción de la DQO y biodegradación del LAS.

La figura 3.9.1 muestra la producción de AGV, durante los primeros 62 días de operación dada la velocidad de carga (Cov de 4.6 g de DQO/l/d) predominó el ácido acético, alcanzando un valor máximo de 8 mmol/L representando el 60% de los ácidos grasos volátiles producidos.

Al exponer el reactor al LAS, a partir del día 63 y hasta el día 174 se dio lugar a una acumulación gradual de éste en los lodos del reactor (Figura 3.7.1), además se produjo más ácidos grasos volátiles lo que representó el 50% de la DQO total en el efluente sugiriendo que las bacterias acidogénicas no se ven tan afectadas por el LAS, lo cual concuerda con lo reportado por (Wagener and Shink, 1987). Donde a una concentración de LAS a 0.69 g/L en

un reactor de cama fija de 1000 mL, encontró la producción de acetato a una concentración mayor a 0.18 g/L cuando la metanogénesis es inhibida.

La baja producción de metano a lo largo de los primeros 200 días del experimento indicó la baja actividad de las bacterias metanogénicas. Por lo tanto, la conversión de la materia orgánica a AGV, así como la naturaleza de éstos son el origen del pH que predomina en el reactor como ocurrió a partir del día 166 y hasta el día 174 en los que predominó el propionato y el butirato inhibiendo la metanogénesis. Al suspender el LAS a partir del día 174 y hasta el día 244 y alimentar al reactor con lactosa como única fuente de carbono, se observó un ligero incremento en la producción de acetato a partir del día 206 (Figura 3.9.1), con la consecuente producción de biogás (Figura 3.9.2) alcanzando un promedio de 0.03 l/d lo que indicó una mejora en la actividad de las bacterias metanogénicas probablemente hidrogenotrofas promoviendo la producción de acetato, principal precursor de la metanogénesis.

Al incluir nuevamente el LAS en el influente del reactor, la producción de acetato es variable a partir del día 244 disminuyó drásticamente de 6 mmol/L a 3.5 mmol/L el día 290 de operación (Figura 3.9.1), y más aún cuando la concentración de LAS se incrementó de 200 a 300 mg/L hasta llegar a una producción de acetato de 2.5 mmol/L el día 344 de operación.

Con el inicio del desarrollo de las bacterias hidrogenotrofas se dió lugar a la producción de biogás a partir del día 260 alcanzando un máximo de 0.15 l/d el día 362 de operación.

Al suspender definitivamente el LAS se dió lugar a un incremento en la producción de acetato alcanzando un promedio de 4 mmol/L, para disminuir nuevamente a partir del día 374 a consecuencia del LAS acumulado en los lodos del reactor, repercutiendo significativamente en la producción de biogás.

Haciendo un balance tenemos que la DQO_E en el reactor esta dada por:

$$DQO_E = \left(\frac{\text{mg de lactosa}}{L} * \frac{1.066 \text{ mg de DQO}}{\text{mg de lactosa}} \right) + \left(\frac{\text{mg de LAS}}{L} * \frac{1.9 \text{ mg de DQO}}{\text{mg de LAS}} \right)$$

Mientras que la DQO_s del reactor esta dada por la cantidad de AGV producidos por la hidrólisis y fermentación de la lactosa alimentada, la lactosa no consumida así como por el LAS residual que no fue biodegradado, de acuerdo a:

$$DQO_s = \left(\frac{mgde lactosa * 1.066 mgde DQO}{L} \right) + \left(\frac{mgde LAS * 1.9 mgde DQO}{L} \right) + \left(\frac{molde acetato * 60 mg * 1.066 mgde DQO}{L \quad mmol \quad mgde acetato} \right) + \left(\frac{molde propionato * 74 mg * 1.510 mgde DQO}{L \quad mmol \quad mgde propionato} \right) + \left(\frac{molde butirato * 88 mg * 1.810 mgde DQO}{L \quad mmol \quad mgde butirato} \right)$$

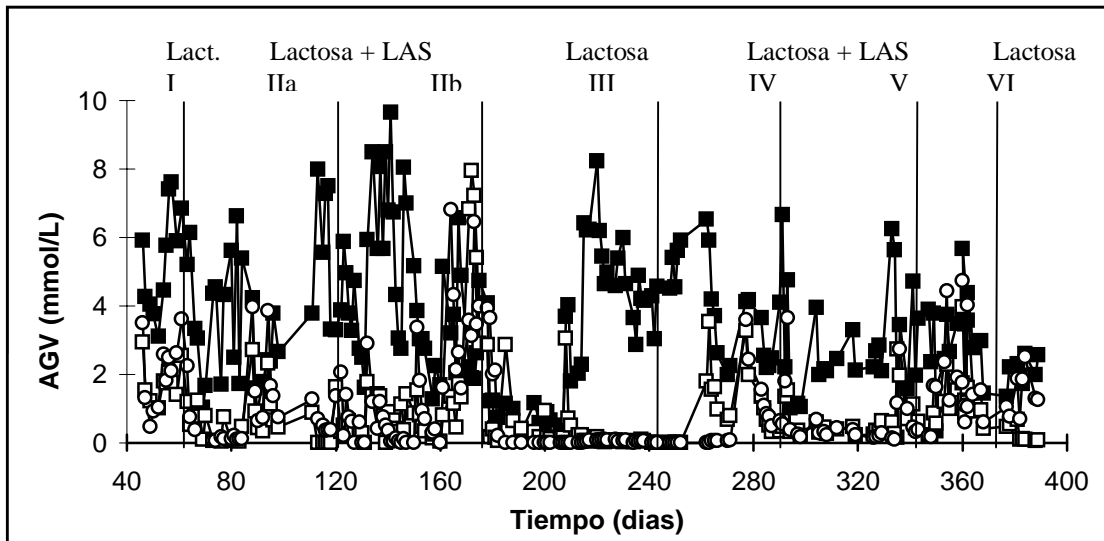


Figura 3.9.1 Producción de AGV en el reactor acidogénico (■ acetato, □ propionato y ● butirato).

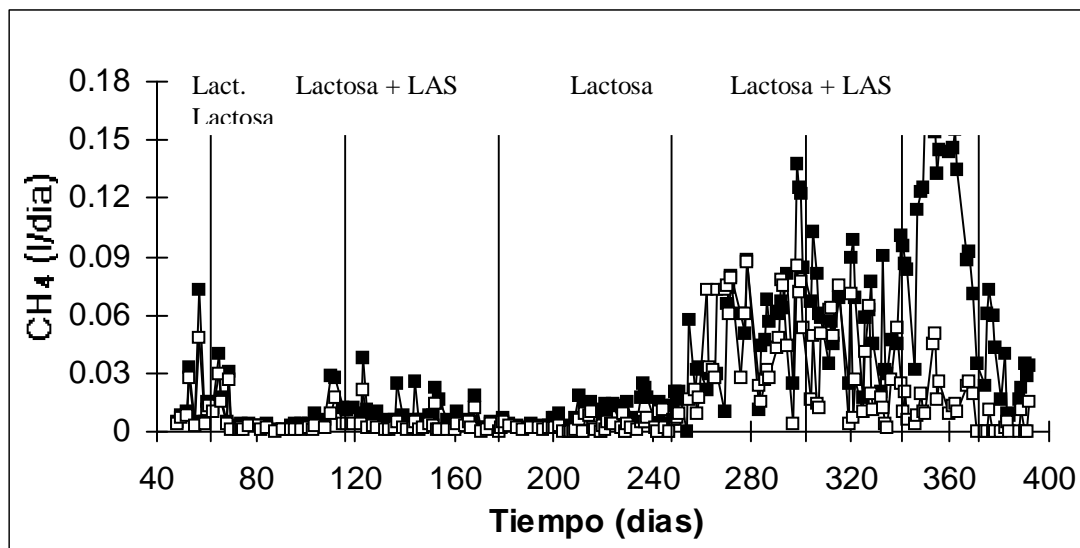


Figura 3.9.2 Producción de CH₄ en el reactor acidogénico (□ Biogas, ○ CH₄ experimental).

3.10 Producción de AGV y su conversión a biogás en el reactor metanogénico.

La figura 3.10.1, muestra los AGV producidos a partir de la hidrólisis y fermentación de la lactosa durante la acidogénesis, no convertidos a metano en el reactor metanogénico. Durante los primeros 62 días de operación se observó un incremento gradual en la concentración de acetato hasta llega a 3.5 mmol/L que al no transformarse a metano (Figura 3.10.2), este se acumuló provocando un desequilibrio de los reactores operados en serie por la sobrecarga de AGV que de bicarbonato en el medio.

Al separarlo del efluente del reactor acidogénico, a partir del día 63 se observó un remanente de acetato de 5 mmol/L el día 66 de operación, que equivale a una producción de 0.93 l/d de CH₄, no apreciándose esto en la (Figura 3.10.2). Teóricamente al alimentar al reactor metanogénico con 1 g/L de acetato debería de producir 16.6 mmol de éste, la diferencia entre el acetato alimentado y el acetato residual indican que se dió lugar a la biotransformación metabólica de manera inversamente proporcional a los mmol de acetato presentes en el medio hasta llegar a una producción de 0.3 l/d el día 120 de operación.

Sin embargo, el día 66 de operación a partir de 11.66 mmol de acetato que al ser biotransformados por las bacterias metanogénicas, debió producirse 2.17 litros de CH₄, pero solo se produjeron 0.45 litros de éste, lo que equivale a una conversión de 2.41 mmol de acetato, y las 9.24 mmol restantes no convertidos, dejaron de producir 1.72 litros de metano.

Lo anterior no se cuantificó correctamente debido al mal funcionamiento del equipo de medición de biogás utilizado, indudablemente por ello no podemos discutir de manera idónea la producción de biogás.

Al exponer nuevamente el reactor al LAS residual del reactor acidogénico, a partir del día 120 y hasta el día 146, se presentó una producción variable de biogás apreciándose una producción excesiva de biogás acompañada al mismo tiempo de una disminución súbita del mismo hasta ser nula el día 174, Esto quizá se debió a que al ser alimentado con acetato principal precursor de la metanogénesis se favoreció la biotransformación del remanente a CH₄ hasta consumirse completamente, aún predominando el propionato y el butirato del día 172 al 174 aun

predominaban, a pesar de que la producción de CH₄, la remoción de DQO, así como la biodegradación del LAS eran nulas.

Debido al LAS presente en el sistema, las bacterias de ambos reactores se vieron influenciadas, repercutiendo en la producción de AGV durante 26 días.

Al suspender la alimentación de LAS, se recuperó la actividad acidogénica y metanogénica, iniciándose la producción de AGV en el reactor acidogénico a partir del día 206 hasta el día 264 alcanzando un promedio de 5 mmol/L de acetato, disminuyendo subitamente por la presencia de LAS a 2.8 mmol/L el día 340 de operación. Observándose que todo el acetato producido en este reactor fue convertido a CH₄ por las bacterias metanogénicas a pesar de estar presente el propionato y el butirato los días 246 al 304, siendo indeseables para la metanogénesis.

En efecto, del día 305 y hasta el 344, disminuyó subitamente la actividad de las bacterias metanogénicas reflejándose tanto en la eficiencia de remoción de DQO, biodegradación de LAS como en la producción de metano. Esto se explica debido a la concentración de LAS (300mg/L) al que fue expuesto el sistema así como a la acumulación de éste en los lodos de ambos reactores conforme transcurrió el tiempo. Ya que al suspender el LAS de la alimentación del reactor acidogénico, se observó un ligero incremento en la producción de AGV alcanzando un promedio de 3 mmol/L el día 374, bajo las características del agua residual a la que fue expuesto el reactor metanogénico provocó que disminuyera la actividad de las bacterias metanogénicas, bajando la producción de metano hasta 0.03l/d.

A partir de éste día se separó del efluente del primer reactor y se alimentó con acetato recuperando con el tiempo actividad de las bacterias metanogénicas, observándose una disminución significativa de acetato en el efluente del reactor, lo que significa que las bacterias comenzaron a recuperar lo que mejoró su eficiencia de remoción de la DQO, la cual a la salida esta dada por:

$$DQO = \left(\frac{mgdeactosa}{L} * \frac{1.066mgdeDQO}{mgdeactosa} \right) + \left(\frac{mgdeLAS}{L} * \frac{1.9mgdeDQO}{mgdeLAS} \right) + \left(\frac{moldeacetato}{L} * \frac{60mg}{mmol} * \frac{1.066mgdeDQO}{mgdeacetato} \right) + \left(\frac{moldepropionato}{L} * \frac{74mg}{mmol} * \frac{1.510mgdeDQO}{mgdepropionato} \right) + \left(\frac{moldebutirato}{L} * \frac{88mg}{mmol} * \frac{1.810mgdeDQO}{mgdebutirato} \right)$$

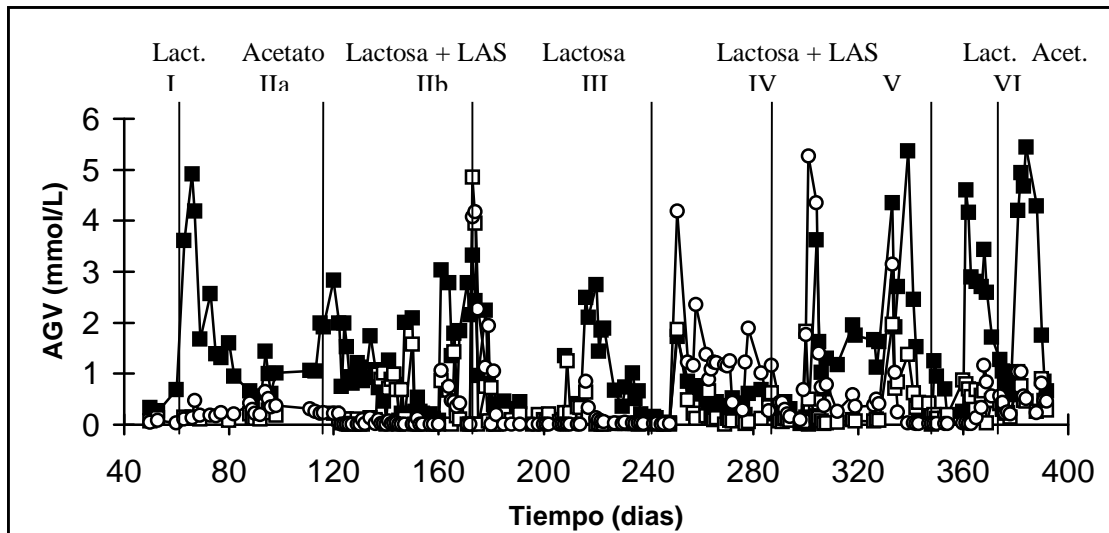


Figura 3.10.1 Conversión de los AGV a metano en el reactor metanogénico acidogénico (■ acetato, □ propionato y ● butirato).

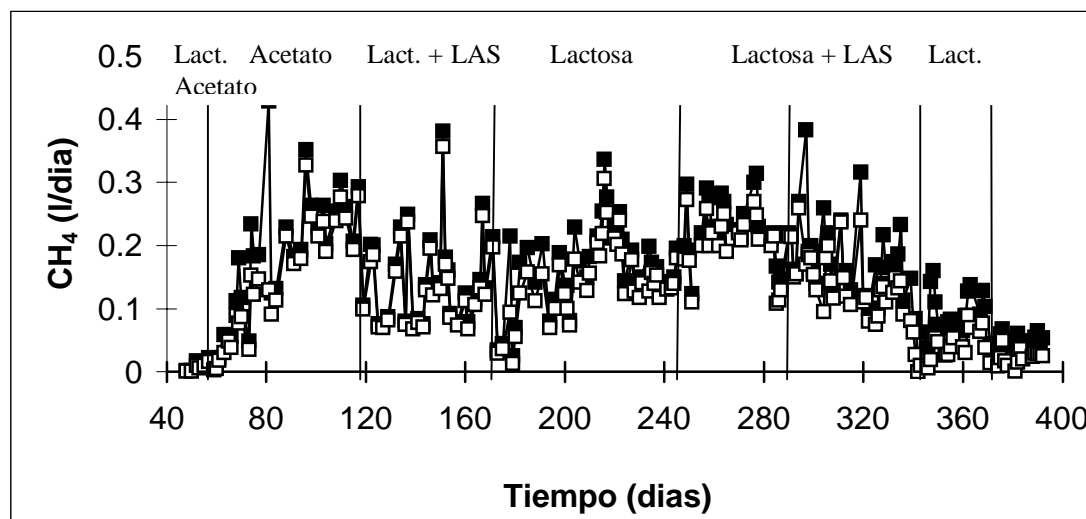


Figura 3.10.2 Producción de CH₄ en el reactor metanogénico ((□ Biogas, ○ CH₄ experimental).

4. CONCLUSIONES.

4. CONCLUSIONES.

- Durante el arranque y estabilización de los reactores operados en serie (etapa I), en los primeros 50 días de operación mostraron una eficiencia de remoción de DQO del 29.41 y de un 52.84% respectivamente, sin embargo, dada la velocidad de producción de AGV y su lenta conversión a metano provocaron una acumulación de éstos en el reactor acidogénico lo que origino se acidificara repercutiendo a su vez en el metanogenico y consecuentemente sobre la eficiencia de remoción de la DQO de ambos.
- Aunado a lo anterior, el reactor metanogénico se separó del efluente del reactor acidogénico, este reactor se alimentó con lactosa y LAS como fuentes de carbono, mientras que el reactor metanogénico se alimento con acetato. El primero alcanzó una eficiencia de remoción de DQO del 51.54%, degradando el LAS en un 42%. En tanto, el reactor metanogénico alimentado con acetato alcanzo una eficiencia de remoción del 69.26%.
- Al recuperar la actividad de las bacterias metanogénicas, nuevamente se alimentó con el efluente del reactor acidogénico para iniciar con las pruebas de biodegradación del LAS. En los primeros 50 días, ambos reactores fueron eficientes, sin embargo, debido a la presencia de LAS en el medio de alimentación del primer reactor, la población bacteriana de éste se vio ligeramente afectada evitando que no se lleve a cabo correctamente la hidrólisis y fermentación de la lactosa lo que provoco una sobreproducción de propionato y butirato inhibiendo la metanogenesis. Con lo cual a partir del día 170 al 174 en ambos reactores la eficiencia de remoción de la DQO fué nula.
- Para que la población bacteriana de ambos reactores no continuara siendo afectada por la presencia del LAS, se suspendió del medio de alimentación del reactor acidogénico, lo que permitió apreciar un remanente de LAS en los efluentes de éstos haciendo suponer que el LAS se acumuló en los lodos de los reactores y que solo una parte fué degradado.
- Debido a la concentración de LAS encontrada en los efluentes de los reactores nuevamente el sistema se expusó a 200 mg/L de LAS a partir del día 244 y hasta el día 290, durante este tiempo se observó una decadencia gradual en la eficiencia de remoción de la DQO en el reactor acidogénico del 42.24%, mientras que el reactor metanogénico a pesar de estar

expuesto al LAS residual del efluente del acidogénico presentó una eficiencia de remoción de la DQO del 83.1% lo que se explica que debido al acetato producido por las bacterias acidogénicas favorecieron la actividad de las bacterias metanogénicas.

- Al incrementar la concentración de LAS de 200 a 300 mg/L en el medio de alimentación del reactor acidogénico, a partir del día 290 y hasta el día 343, se notó con claridad que las bacterias acidogénicas continuaron removiéndose DQO y solo en los últimos 10 días para concluir con esta etapa (V), ligeramente perdieron eficiencia de remoción alcanzando un 36.57%, en el caso del reactor metanogénico drásticamente perdió eficiencia de remoción conforme transcurría el tiempo hasta llegar a ser nula el día 343, esto se explica por dos cosas, en primer lugar el LAS afecta más a las bacterias metanogénicas que a las bacterias acidogénicas, y segundo que al perder actividad metanogénica, se da lugar a la predominancia del butirato a consecuencia de una posible fermentación del acetato no consumido con lo que estas se inhiben, originándose así la acumulación de LAS en los lodos del reactor el cual adquirió una apariencia blanquecina.
- Al suspender definitivamente la alimentación de LAS en el reactor acidogénico, las eficiencias de remoción de la DQO en ambos reactores mejoraron siendo del 33.24% en el acidogénico y del 42.53% en el metanogénico.
- Durante el tiempo en que se expusieron los reactores al LAS, con los resultados obtenidos se demostró que se da lugar a una acumulación de surfactante promedio en los lodos del reactor acidogénico del 32.14%, mientras que en el metanogénico es del orden del 23.13%.
- Con estos resultados, quedó demostrado que no es posible llevar a cabo la biodegradación del LAS vía digestión anaerobia ya que las bacterias acidogénicas no fueron capaces de transformar el LAS presente en el influente dejando solamente AGV producto de la hidrólisis y fermentación de la lactosa para el reactor metanogénico.

5. RECOMENDACIONES.

5. RECOMENDACIONES

I. Estudiar los posibles compuestos intermediarios que se originan durante la ruptura de la cadena alquímica a fin de establecer si alguno de ellos es el responsable de su presencia en la biomasa, como de su toxicidad para evitar que la población bacteriana sea inhibida durante el proceso de tratamiento de las aguas residuales.

II. En base a la experiencia en la operación de una PTAR por oxidación aerobia que trata efluentes con alta concentración de LAS y cuya eficiencia promedio anual de degradación oscila alrededor del 90%, se recomienda utilizar esta biotecnología como otra alternativa.

6. BIBLIOGRAFIA.

6. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Anderson G.K. and Kasapgil B. (1994). Microbiological study of two stage anaerobic digestion during start-up. *Wat. Res.* **28** (11): 2383-2392.

Andreesen J.R., Gottschalk G. and Schlegel, H.G. (1970). *Clostridium formicoaceticum* nov. sp. Isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* **72**: 154-174.

Andrews J. F. (1969). Dynamic model of the anaerobic digestion process. J. Sanit engng. Div. Proc. Amb. Soc. Civ. Engrs S.A. **1**: 95-118.

APHA. (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. **17** th ed. Washington, D.C. *American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.*

Balch W.E., Schoberth S., Tanner R.S., and Wolfe R.S. (1977). Acetobacterium, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**: 355-361.

Balch W.E., Fox G. E., Magram L.J., Woese C.R. and Wolfe R.S. (1979). Methanogens: Reevaluation of unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43** (2): 260-296.

Baresi W.E., Mah R.A., Ward D.M. and Kaplan I.R. (1978). Methanogenesis from acetate: enrichment studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 186-197.

Barker H.A. (1941). Studies on the methane fermentation V. Biochemical activities of *Methanobacterium omelianskii*. *J. Biol. Chem.* **137**: 153-167.

Berna J.L., Moreno A. and Ferrer J. (1990). The behaviour of LAS in the environment. *J. Chem. Tech.* **26**: 387-397.

Berth P. and Jeschke P. (1989). Consumption and fields of application of LAS. *Tenside Surfact. Deter.* **26**: 75-79.

Boone D.R. and Bryant M.P. (1983). Propionate degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinni* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environm. Microbiol.* **40**: 626-632.

Bressan M., Marin M.G., Brunneti R, (1991). Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on Skeletal Development of Sea Urchin Embryos (*Paracentrotus Lividus* LMK). *Wat. Res.* **25**, 613-616.

Bressan M., Brunneti R., Casellato S., Fava G.C., Giro P., Marin M., Negrisolo P., Tallandini L., Thomann S., Tosoni L., Turchetto M. and Campesan G.C. (1989). Effect of linear alkylbenzene sulfonate. (LAS) on benthic organisms. *Tenside Surfact. Deterg.* **26**: 148-158.

Brock T. D. and Madigan M.T. (1991). Microbiología. Sexta edición. Ed. prentice hall hispanoamericana s.a. México. pp: 681-685

Bryant M.P., Wolin E.A., Wolin M.J. and Wolfe R.S. (1967). *Methanobacillus omelianskii* a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.* **59**: 20.

Calzada J.F. (1990). Digestión anaerobia en America Latina, aspectos generales. En Memorias de conferencias sobre el tratamiento anaerobio de aguas residuales en America Latina. UNAM, México D.F. Noviembre 8 y 9. pp: 67-71.

Colleran E. and Wiljie A. (1986). Microbiological bases of anaerobic digestion. In Anaerobic Treatment of Industrial Wastewaters. Proc. Second National Conference. University of Chicago.

Demain A.L. and Solomon N.A. (1985). Biology of industrial microorganisms. The Benjamin-Cummings Publishing Company, INC, California. U.S.A. pp: 189-222.

Federle W.T and Schwab B.S. (1992). Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond. *Wat. Res.* **26**: 123-127.

Ferguson T.J. and Mah R.A. (1983). Effect of H₂-CO₂ on methanogenesis from acetate or methanol in *Methanosarcina* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 348-355.

Ferry and James. (1993). Methanogenesis: Ecology, physiology, biochemistry and genetics. Ed Chapman Hall, New York.

Fiestas R.U. J. (1988). Bases de los procesos anaerobios: aspectos microbiológicos en: Tercer Seminario de Depuración Anaerobia de Aguas Residuales. Universidad de Valladolid (ed). Valladolid, España. pp: P2.1-P2.19.

Garcia J.L. (1989). Cours de DEA de biologie Cellulaire et Microbiologie "Ecologie microbienne de la digestion anaerobie" Universities di Aix-Marseille I et II. 50 pages.

Garcia J.L. (1990). Taxonomy and ecology of methanogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 297-308.

Garcia 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 Cafetera. Manizales, Colombia.

Ghosh (1991). Pilot-scale demonstration of two-phase anaerobic digestion of activated sludge. *Wat. Tech.* **23**: 1179-1188.

González-Mazo E., Forja J.M. and Gómez-Parra A. (1998). Fate and Distribution of Linear Alkylbenzene Sulfonates in the Littoral Environment. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1636-1641.

Gujer W., Zehnder A.J.B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Wat. Sci.Tech.* **15**: 127-167.

Guyot J.P. and Ramírez F. (1989). Inhibition of anaerobic acetate degradation by formate. *Biotechnol. Lett.* **11**: 365-368.

Guyot J.P. (1992). Introducción a la microbiología de la digestión anaerobia en bioprocesos para el tratamiento de efluentes industriales. UAM, ORSTOM e IMP (eds), Mayo-UAM-I: 4-21. México D.F., México.

Harper S.R. and Pohland F.G. (1985). Biotechnology report: Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 585-602.

Hickey R.F. and Switzenbaum S.M. (1988). The role of intermediate and product gases as regulators and indicators of anaerobic digestion. In: Poster papers. 5th. Int. Symp. Anaerobic Digestion. A. Tilche., A. Rozzi (eds). *Monduzzi Editore Bologna, Italy*. pp: 43-47.

Hashim M.A. and Kulandia. (1989). Anaerobic treatment of branched alkylbenzene sulfonates. *Che. Tech. Biotechnol.* **44**: 517-522.

Hideshige Takada., Kunihiro Mutoh., Naomichi Tomita., Tsuyoshi Miyadzu and Norio Ogura. (1994). Rapid removal of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) by attached biofilm in an urban shallow stream. *Wat. Res.* **28** (7): 1953-1960.

Jens E. S. and Birgitte K. A. (1994). Granular sludge formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 229-246.

Jimenez L., Breen A., Thomas N., Federle T.W. and Sayler G.S. (1991). Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a Four-member Aerobic Bacterial Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1566-1569.

Kazuho-Inaba (1992). Quantitative assessment of natural purification on wetland for linear alkylbenzene sulfonates, *Wat. Res.* **26** (7): 893-898.

Khalil E.F., Whitmore T.N., Gamel El-Din A., El Bressel A. and Lloyd D. (1989). The effects on *Methanosarcina barkeri*. *Microbiol. Lett.* **57**: 313-316.

Lettinga G., Van Vesel A. F.M., Hobma de Zeeuw S.W. and Klapwijk A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 699-734.

Lewis M.A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Wat. Res.* **25**: 101-113.

Lewis M.A. (1992). The effects of mixtures and other environmental modifying factors on the toxicities of surfactants to freshwater and marine life. *Wat. Res.* **26**: 1013-1023.

Mah R.A., Ward D.M., Baresi L., Glass T.L. (1977). Biogenesis of methane. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 309-341.

Madigan M.T. (1988). Microbiology, physiology and ecology of phototrophic bacteria in: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Zehnder, A.J.B. (editor). Wiley-Liss. New York. U.S.A. pp: 39-111.

Maurer W., Cordon T.C., Well J.K., Nuñez-Ponzoa M.V., Ault W.C. and Stirton A.J. (1965). The effect of tallow based detergent on anaerobic digestion. *The Journal of the American Oil Chemist Society*. pp: 189-192.

Marcomini A. and Giger W. (1988). Behavior of LAS in sewage treatment. *Tenside surfact. Deterg.* **25**: 226-229.

Matthies C. and Schink B. (1993). Anaerobic degradation of long chain dicarboxylic acids by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 221-226.

McCarty P. L. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. Part II; Environmental requirements and control. *Public works*. 95 (**10**), 123.

Modler R.F., Willhalm R and Yoshida Y. (1989). In *Chemical Economics Handbook Marketing Research Report*, SRI Internacional; Menlo Park, USA.

Mosey F. (1983). Mathematical modelling of the anaerobic digestion process regulatory mechanism for the formation of short chain volatile acids from glucose. *Wat. Sci. Tech.*, **15** (819): 209-232.

Okpokwasili G.C. and Olisa A. O. (1991). River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos. *Wat. Res.* Vol. **11**: 1425-1429.

Perez A.B. (1994). Degradación anaerobia de surfactantes. Tesis de Maestría, Departamento de Biotecnología, UAMI, México D.F. 81 pags.

Rinzema A. and Lettinga G. (1988). Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. In: *Bioenvironmental Systems*. Edited by Wise D.L. CRC press, Boca Raton, Florida. pp: 65-102.

Rosen M. J. (1978). Surfactants and interfacial phenomena. Ed. John Wiley & Sons. USA.

Rouvière P.E. and Wolfe R.S. (1988). Novel biochemistry of methanogenesis . *J. Biol. Chem.* **263**: 7913-7916.

Saval S. And Noyola A. (1992). Aportaciones de la Biotecnología al Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. *BIOTECNOLOGÍA*. **2**. (5-6) pp: 155-172.

Saval S. (1993). Tratamiento anaerobio de aguas residuales, *V Congreso Nacional de Biotecnología*. **3**: 5-6.

Schwitzguebel J.P. and Peringer P. (1986). Methane production by two phase anaerobic digestion, in *Biology of Anaerobic Bacteria* by H.C. Dubourguier et al. *Elsevier Sc. Pub. Amsterdam*. pp: 28-33.

Shelton D.R. and Tiedje J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 850-857.

Shobert S.M. (1983). Methanogenic flora and their metabolic route: "Avances de la digestión anaerobia" *Mircen-Biotecnología*. Instituto Centroamericano de Investigación Industrial. Guatemala. pp: 2-19.

Sigoillot J.C. and Nguyen M.H. (1992). Complete Oxidation of linear alkylbenzene sulfonate by Bacterial Communities Selected from Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1308-1312.

Speece R.E. (1983). Anaerobic Biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. and Tech.* **17**: 416a-427a.

Speece R.E. (1990) Toxicity fate in anaerobic process. En: *tratamiento anaerobio en América Latina. Conferencia sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales en América Latina.* México D.F., México.

Standard Methods for examination of water and wastewater (1985). Sixteenth edition, APHA, AWWA, WPCF.

Swisher R.D. (1963). Biodegradation of ABS in relation to chemical structure. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **35**: 877-891.

Swisher R.D. (1981). The problem of Ultimate Biodegradability of linear alkylbenzene sulfonates. *An Extension. Tenside Detergent.* **18**: 57-63.

Swisher R.D. (1987). *Surfactant Biodegradation*, 2nd edn. New York: Marcel Dekker.

Tabor C.F. and Baber L.B. (1996). Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the Mississippi River. *Environmental Science & Technology*. **30**: 161-171.

Takashima M. and Speece R.R. (1989). Mineral nutrient requirements for high rate methane fermentation of acetate at low SRT. *J. Water Pollut Control Fed.* **61** (11, 12): 1645-1650.

Tanaka Y. and Nakanishi H. (1981). Purification on sephadex LH-20 and high performance liquid chromatographic determination of dodecylbenzenesulfonate in sediment and biological samples. *Bunseki Kagaku* **30**: 569-573.

Thauer R.K., Jungermann K. and Decker K. (1977). Energy conservation in chemotropic anaerobic bacteria. *Bacterial. Rev.* **41**: 100-180.

Therien N., Le Calve P. and Jones P. (1984). A respirometric study of the influence of aliphatic alcohols on activated sludge. *Wat. Res.* **18**: 905-910.

Thiele J.H., Chartrain M. and Zeikus G. (1988). Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (1): 10-19.

Van den Berg (1984). Developments in methanogenesis from industrial wastewater. *Can. J. Microbiol.* **30**: 975-990.

Viñas M J., Martínez B., Baselli. and Galain C. (1994). Separación de etapas acidogénica y metanogénica; un ejemplo con agua residual de fabricación de pulpa termomecánica. 201-214.

Visser F. A., Van Lier J.B. and Macario A.J.L. (1991). Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (6): 1728-1734.

Wagener S. and Schink B. (1987). Anaerobic degradation of nonionic and anionic surfactants in enrichment cultures and fixed-bed reactors. *Wat. Res.* **21**: 615-623.

Wagener S. and Schink B. (1988). Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 561-565.

Wilson F.J. and Jarbas J.R. (1989). "Chemical Oxygen Demand (COD) using microwave digestion. *Wat. Res.* **23** (8): 1069-1071.

Woese C. (1982). Archaeobacterias. *Ciencia*, **44**: 48-61.

Wolf W. and Feijtel. (1998). Terrestrial Risk Assessment for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in sludge-amended solids. *Chemosphere*. **36**: 1319-1343.

7. ANEXOS.

7. ANEXOS

7.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO).

- **Solución Digestora.** Se secó durante 2 horas a 103 °C, 50 g de $K_2Cr_2O_7$ se enfrió en desecador y se pesó 42.256 g. También se pesaron 33.3 g de $HgSO_4$. Y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.
- **Sulfato mercúrico**, este se adicionó en baño de hielo y muy lentamente se adicionó 167 mL de H_2SO_4 puro, al estar completamente fría la mezcla, se disolvió lentamente y finalmente se aforó a 1 L.
 - **Acido Sulfúrico puro con Sulfato de Plata.** Se pesó suficiente sulfato de plata para una proporción de 5.5 Ag_2SO_4/Kg de H_2SO_4 .

Para calcular la cantidad exacta se consideró el peso específico y la pureza del ácido sulfúrico que se utilizó. En un matraz aforado de 1 L, se agregaron 300 mL del ácido así como el sulfato de plata pesado. Una vez hecha la mezcla, esta se dejó en reposo de uno a dos días para que se disolviera y después se completó el volumen de aforo con el resto del ácido. Cada reactivo preparado se vació cada reactivo preparado en los frascos dispensadores respectivos y se calibraron dichos dispensadores a 1.0 mL para la solución digestora y 2.0 mL para la mezcla de ácido con plata. Se hizo una curva patrón con biftalato de potasio a concentraciones de 0 a 1,500 mg/L. (Anexo 7.2).

Procedimiento.

- Se prendió la parrilla para DQO, se dejó calentar por 30 minutos para alcanzar la temperatura adecuada.
- En un tubo HACH con tapa de rosca se añadió 2 mL de la muestra a analizar en la dilución apropiada y/o 2 mL de agua destilada para el blanco.
- Se adiciono 1 mL de solución digestora.

- Se adiciono lentamente 2 mL de solución de ácido con plata.
- Se taparon los tubos HACH perfectamente y se homogeneizó la mezcla mediante agitación suave.
- Se colocaron los tubos en el reactor para la digestión a 150°C, por 2 horas.
- Transcurrido el tiempo se sacaron de la parrilla y se dejaron enfriar.
- Se prendió el espectrofotómetro y se ajustó la longitud de onda a 620 nm. Se checo que el filtro amarillo estuviera instalado.
- Ya fríos los tubos, se calibró con el blanco preparado y se procedió a leer las muestras.
- Se desecho las muestras ya leídas en el contenedor destinado para estos residuos.

7.2 Curva estándar para DQO

De acuerdo a la siguiente fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, se realizaron los cálculos necesarios para determinar la curva estándar y conocer la concentración de DQO (mg/L), obteniendo la siguiente tabla.

Tabla 7.2 Curva estándar para DQO

Concentración de DQO (mg/L)	Concentración de biftalato (mg/L)	mL de biftalato	mL de agua	Volumen Final (mL)
100	0.085034	0.25	2.25	2.5
200	0.170068	0.5	2.0	2.5
300	0.255102	0.75	1.75	2.5
400	0.340136	1.0	1.5	2.5
500	0.42517	1.25	1.25	2.5
600	0.510204	1.5	1	2.5
700	0.595238	1.75	0.75	2.5
800	0.680272	2.0	0.5	2.5
900	0.765306	2.25	0.25	2.5
1,000	1.417233	2.5	0	2.5

Procedimiento

- En un tubo, se adicionó 2.5 mL de muestra a analizar (H₂O + biftalato).
- Se adicionó 1.5 mL de K₂Cr₂O₇.

- Se adicionó 3.5 mL de ácido sulfúrico con sulfato de plata.
- Se tapó y se homogeneizó con un vortex.
- Se digirió en un horno a 150°C durante 2 horas.
- Se dejó enfriar.
- Finalmente se leyó la absorbancia a 620 nm.

Blanco.- se prepara adicionando 2.5 ml de agua destilada, 1.5 ml de la solución de dicromato de potasio y finalmente, 3.5 ml de la solución de ácido sulfúrico con sulfato de plata. Se gráfico la absorbancia en función de la concentración de la DQO para obtener la curva estándar (tabla 7.2) y obtener la ecuación de la recta.

- Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado

Tabla 7.2a Parámetros para obtener la curva estándar de DQO

Concentración de DQO(mg/L)	Abs.1	Abs.2	Abs.3	Absorbancia Promedio	Desviación estándar	% de error
100	0.05	0.05	0.05	0.05	70.6753	0
200	0.09	0.09	0.09	0.09	141.3577	0
300	0.12	0.125	0.125	0.1233	212.0448	2.34
400	0.17	0.17	0.16	0.1666	282.7248	3.46
500	0.2	0.21	0.21	0.2066	353.4072	2.7936
600	0.245	0.25	0.25	0.2483	424.0884	1.1624
700	0.28	0.28	0.28	0.28	494.7767	0
800	0.315	0.32	0.32	0.31833	565.4603	0.9066
900	0.355	0.36	0.36	0.35833	636.1427	0.8056
1000	0.4	0.39	0.39	0.3933	706.8286	1.4678

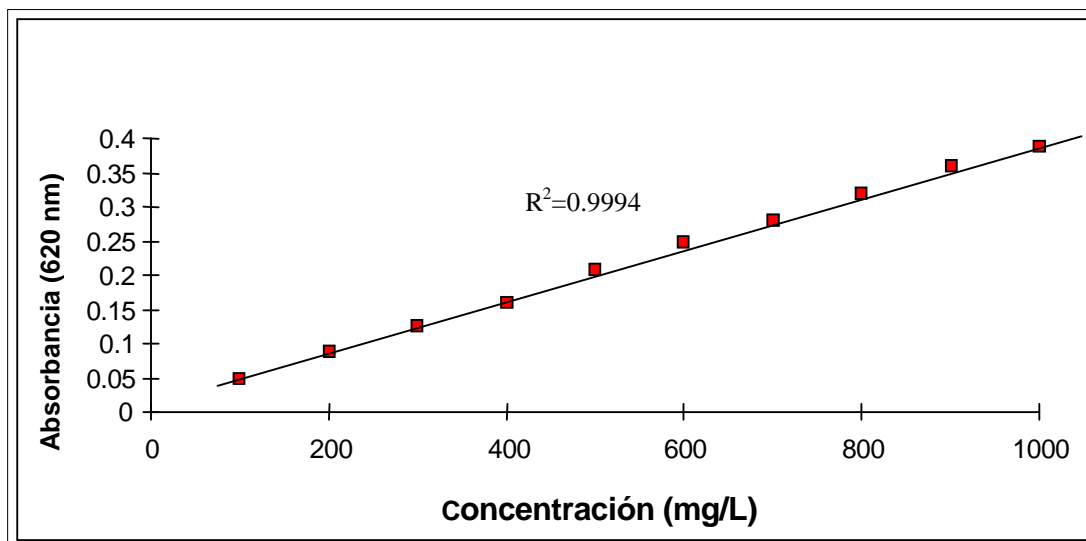


Figura 7.2 Curva estándar para DQO

Ecuación de recta:

$$Y = 3.833 \times 10^{-4} X + 1.264 \times 10^{-2}$$

7.3 Curva estándar para la lactosa. De acuerdo a $C_1 V_1 = C_2 V_2$, se hicieron los cálculos para la curva de calibración.

Tabla 7.3a Parámetros para la curva estándar de lactosa

Concentración (mg/L)	ml de solución patrón	ml de H ₂ O	Volumen final (mL)
100	0.2	1.8	2
200	0.4	1.6	2
300	0.6	1.4	2
400	0.8	1.2	2
500	1.0	1.0	2
600	1.2	0.8	2
700	1.4	0.6	2
800	1.6	0.4	2
900	1.8	0.2	2
1000	2.0	0	2

Procedimiento:

- A 2 mL de muestra, se adiciono 1 mL de solución de fenol al 5% y 5 mL de H₂SO₄ concentrado mezclándose perfectamente con ayuda del vortex.

- Se dejó reposar los tubos durante 10 minutos y se leyó la absorbancia de cada tubo a 480 nm.

Blanco.- se preparó con 2 mL de agua destilada, 1 mL de solución de fenol al 5% y H₂SO₄ concentrado, en el orden antes mencionado, graficando la absorbancia en función de la concentración de lactosa para obtener la curva estándar a partir de los datos que se muestran en la tabla 7.3.b. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado

Tabla 7.3b Parámetros para la curva estándar de lactosa

Concentración mg/L	Asb.1	Abs.2	Abs.3	Promedio	Desv. std.	% de error
10	0.092	0.1	0.116	0.1026	0.01222	11.9027
20	0.219	0.219	0.22	0.219	0.00057	0.26322
30	0.25	0.26	0.33	0.281	0.04531	16.12456
40	0.381	0.426	0.462	0.423	0.04058	9.59414
50	0.553	0.555	0.608	0.572	0.03119	5.45331
70	0.7	0.727	0.758	0.728	0.02902	3.98484
80	0.728	0.746	0.877	0.783	0.08132	10.3779
90	0.801	0.818	1.094	0.904	0.16447	18.1875
100	0.982	1.015	1.168	1.055	0.099242	9.40683

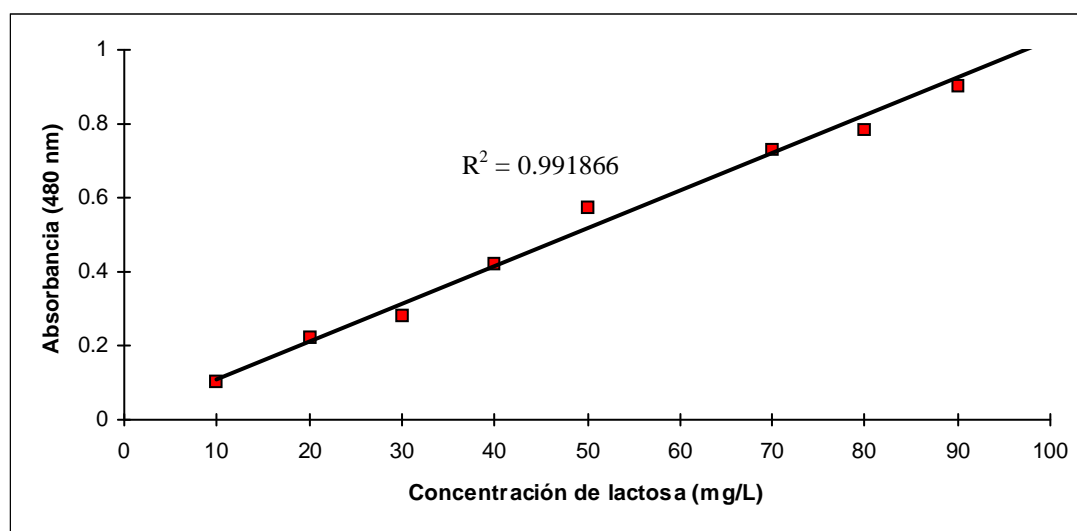


Figura 7.3 Curva estándar para lactosa

$$\text{Ecuación de recta: } Y = 5.16495 X - 0.284616$$

7.4 Curva estándar para el surfactante

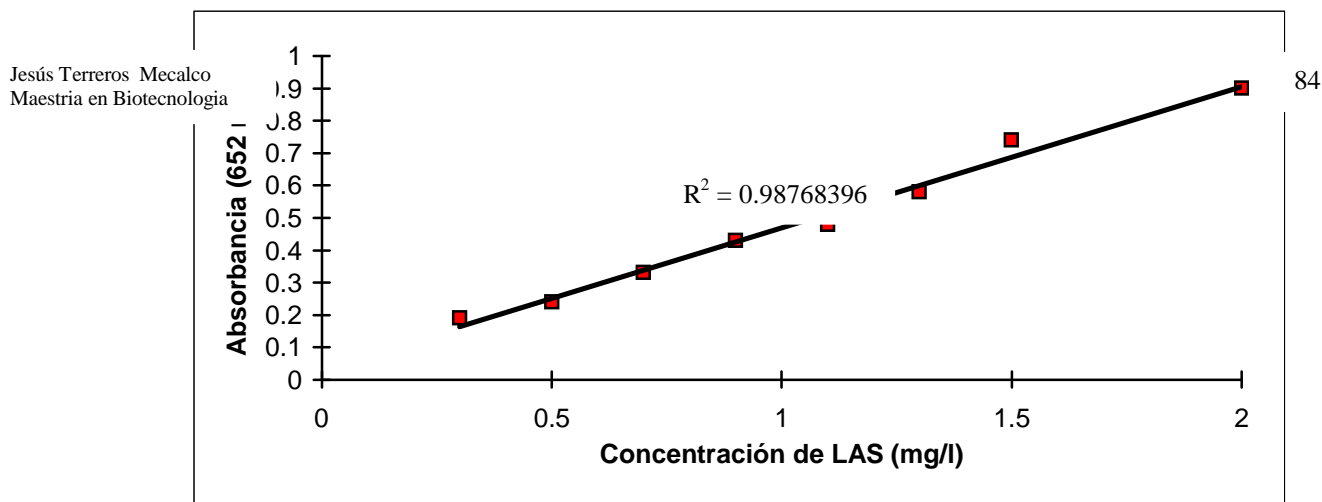


Figura 7.4 Curva estándar para el surfactante

Ecuación de recta:

$$Y = 4.36 \times 10^{-1} X + 3.33 \times 10^{-2}$$

7.5 Curva estándar para AGV.

Se determinó la concentración de (AGV) como acetato, propionato y butirato producidos durante la hidrólisis y fermentación a partir de la curva de calibración, la que se elaboró a partir de una solución madre de una mezcla de acetato de sodio, propionato de sodio y butirato de sodio de 100 mM.

Tabla 7.5.1 Preparación de la curva estándar de AGV

Estandar de AGV* mm/L	HCl 50% ** μ l	Solución madre*** 100 mmol (μ l)	Agua destilada μ l
1	50	10	940
2	50	20	930
4	50	40	910
6	50	60	890
8	50	80	870
10	50	100	850

* Estandares de la mezcla de acetato, propionato y butirato (AGV: ácidos grasos volátiles).

** Solución de ácido clorhídrico al 50%

*** Solución madre de la mezcla de AGV 100 mmol.

Cada estándar se inyectó por triplicado en el cromatógrafo, las áreas obtenidas de acetato, propionato y butirato, fueron correlacionados con las concentraciones y se realizó una l para obtener las concentraciones de las muestras a analizar.

Tabla 7.5.1.1 Acetato

Concentración mmol/L	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio
1	6166	4819	6170	5718.33
2	6514	5832	6423	6256.33
4	12558	12671	12464	12564.33
6	15738	16935	17567	16746.66
8	25140	23298	17858	22098.66
10	26996	23108	27007	25703.66

Tabla 7.5.1.2 Propionato

Concentración mmol/L	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio
1	10597	8382	11873	10284
2	11602	11239	12026	11622.33
4	21720	23219	24106	23015
6	24252	30341	35515	30036
8	45118	44985	44143	44748.66
10	56110	47718	55255	53027.66

Tabla 7.5.1.3 Butirato

Concentración mmol/L	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio
1	15523	12641	18128	15430.66
2	15601	16901	17928	16810
4	29337	30041	32196	30524.66
6	31125	41910	48623	40552.66
8	57446	60043	67832	61773.66
10	88953	68934	79085	78990.66

Finalmente se graficó el promedio de las áreas correspondientes a acetato, butirato y propionato en función de la concentración (Tabla 7.5.1.2), para obtener la ecuación de la recta.

Tabla 7.5.2 Parametros para determinar la curva estándar para AGV

Concentración mmol/L	Area Promedio Acetato	Area Promedio Propionato	Area Promedio Butirato
1	5718.33	10284	15430.66
2	6256.33	11622.33	16810
4	12564.33	23015	30524.66
6	16746.66	30036	40552.66
8	22098.66	44748.66	61773.66
10	25703.66	53027.66	78990.66

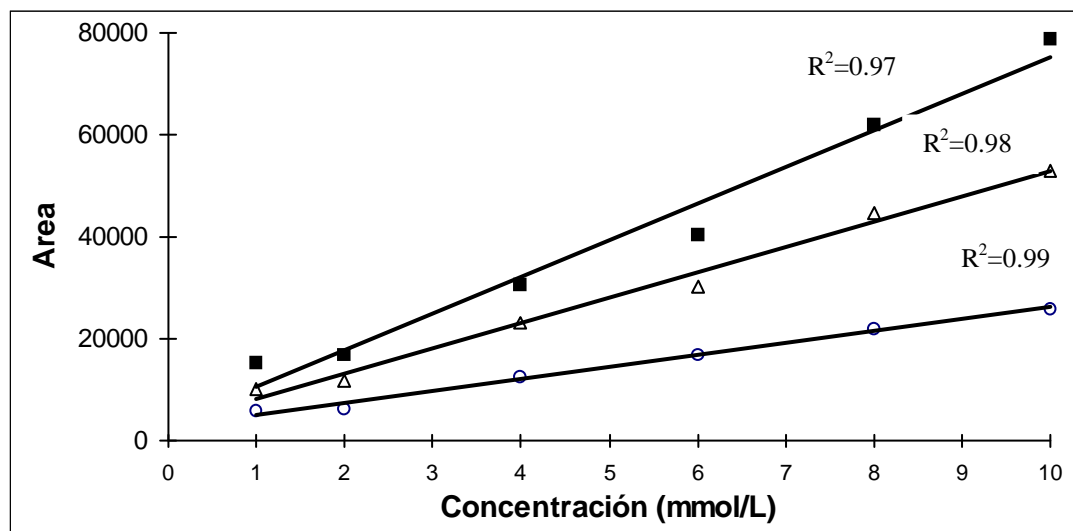


Figura 7.5.2 Curva estándar para AGV (\circ Acetato, Δ Propionato y \blacksquare Butirato).

Ecuación de recta para:

$$\text{Acetato: } Y = 2342.56 X + 2744.71$$

$$\text{Propionato: } Y = 4958.02 X + 3171.46$$

$$\text{Butirato: } Y = 7191.27 X + 3525.46$$

7.6 Composición del biogás

Para determinar el % de CH₄ presente en el biogás, se preparó una solución saturada de sal y 10 tubos HACH perfectamente limpios y secos, luego se pesó cada uno de ellos. Cada tubo se llenó completamente con la solución salina, se volvió a pesar. Y a partir de una botella serológica saturada con CH₄, se inyectó un volumen conocido para obtener la siguiente tabla:

Tabla 7.6 Relación peso del tubo (vacío o lleno) con el % de CH₄

Tubo	Peso(g) de tubo vacío	Peso(g) de tubo lleno	% de metano
1	16.7652	35.7813	10
2	16.9333	36.2578	10
3	17.4091	37.3	20
4	17.8511	37.4	20
5	17.4233	36.7	40
6	17.2253	37	40
7	16.5681	37.9	60
8	17.6698	37	60
9	17.8051	37.7	80
10	16.7921	36.3	80
11	16.8238	36.9	100
12	18.1067	37.8	100

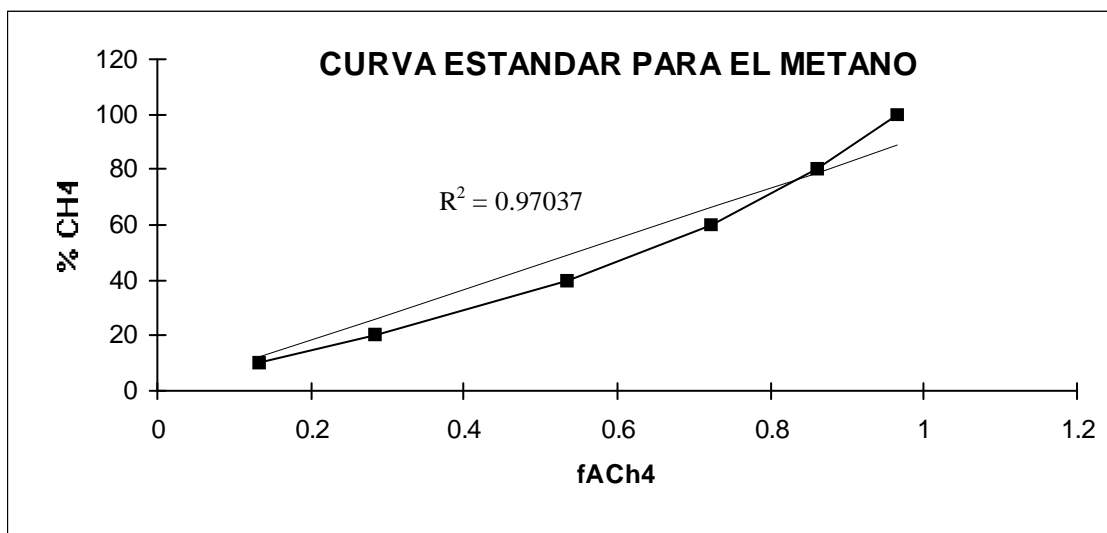


Figura 7.6 Curva estándar para el CH₄
Ecuación: $Y = 104.7973 X - 9.507685$