

9,10

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

C.B.S.

" INMOVILIZACIÓN DE BACTERIAS  
ANAEROBIAS EN UN LECHO  
FLUIDIFICADO INVERSO"

T E S I S

que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

MÓNICA ALICIA MERAZ RODRÍGUEZ

México, D.F. a <sup>30</sup>~~28~~ de noviembre de 1998.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que  
presentó

MÓNICA ALICIA MERAZ RODRÍGUEZ  
el día 30 de noviembre del año de 1998.

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. Adalberto Noyola Robles \_\_\_\_\_.

Asesor: Dr. Ilangovan Kuppusamy \_\_\_\_\_.

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda \_\_\_\_\_.

Sinodal: Dr. Simón González Martínez \_\_\_\_\_.

Sinodal: Dr. Rafael Vázquez Duhalt \_\_\_\_\_.

"El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio número PFP-200-93".

## PRESENTACIÓN DE LA TESIS

---

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la operación en lote y en continuo de reactores de lecho fluidificado inverso en condiciones anaerobias. Se presenta una breve revisión de los conceptos de la digestión anaerobia tanto en mesofilia como en termofilia, así como las características de los principales grupos bacterianos acetoclásticos involucrados en la formación de biopelículas descritos en ambas condiciones. Se revisa la capacidad de adaptación a condiciones termofílicas de las bacterias anaerobias.

Igualmente se revisan las condiciones que dan lugar a la formación de biopelículas, los tipos de soportes y equipos que se han utilizado para explotar esta característica en el tratamiento de aguas residuales. En el caso específico de los lechos fluidificados se presentan las diferencias hidrodinámicas de los sistemas de flujo ascendente y descendente, algunas aplicaciones para el tratamiento de aguas residuales y las ventajas y desventajas en el uso de estos prototipos.

El sistema de inmovilización en lote y el soporte utilizados en este trabajo fueron similares a los de González *et al.* (1992). Posteriormente, para llevar a cabo la experimentación con reactores continuos, fueron necesarias algunas modificaciones para mejorar la operación.

El seguimiento de la inmovilización de las bacterias se llevó a cabo a través de la acumulación de biomasa en el soporte y de la actividad acetoclástica de las partículas inmovilizadas a través del tiempo. La técnica para la determinación de actividad acetoclástica de Ramírez *et al.* (1994) se adaptó a las características del soporte utilizado. Adicionalmente, se implementó una metodología para la determinación de la concentración de biomasa inmovilizada

Las determinaciones de proteínas solubles y carbohidratos totales, no dieron resultados congruentes entre las concentraciones de cada uno de estos componentes y la proporción en que se encuentran en la biopelícula. Este problema

había sido reportado con anterioridad en determinaciones similares hechas en todos anaerobios por Fajardo (1987) y Mendoza y Carra (1990). Sin embargo la relación proteínas/carbohidratos resultó ser comparable con resultados de la literatura para algunos lotes de partículas.

La microscopía electrónica de barrido se utilizó en el análisis cuantitativo de las biopelículas. Estas fotografías muestran el tipo de microflora involucrada en cada lote y algunas diferencias distintivas entre los sistemas mesófilos, aceto y termofilia y termofílico.

Durante la operación en continuo de estos reactores se manipularon algunas variables de operación tales como el TRH y consecuentemente la carga orgánica volumétrica y la carga másica. Se comparó el efecto de la altura del lecho sobre la capacidad de conversión y la carga orgánica volumétrica alcanzada en ambos sistemas. Ambos presentaron problemas de expansión excesiva debido a gas retenido en la fase líquida.

Finalmente este prototipo se utilizó en el tratamiento de aguas residuales municipales, con el objeto de disminuir el contenido de la materia orgánica soluble hasta un nivel que pudiera ser apropiado para el reuso del agua en riego. Sin embargo, para esta opción de tratamiento deberá considerarse un posttratamiento para la eliminación de sólidos, microorganismos patógenos y parásitos.

## RESUMEN

---

En este trabajo se presentan los resultados de la inmovilización de bacteria anaerobias en partículas de polietileno molido, utilizando un lecho fluidizado de flujo descendente operando en lote, así como en continuo. Con objeto de analizar la dinámica de formación de biopelículas anaerobias se presentan las inmovilizaciones en lote en mesofilia (35° C) y termofilia (55° C) que se llevaron a cabo durante periodos de 120 a 135 días, utilizando como inóculo lodos previamente adaptados a las temperaturas de trabajo.

Utilizando acetato y glucosa como sustratos para la inmovilización en mesofilia, se obtuvo un contenido de biomasa expresado como sólidos volátiles inmovilizados (SVI) en las partículas de 17.6 mg SVI/g soporte seco y la actividad acetoclástica máxima fue de 3.6 g acetato/L·d. En cambio cuando se utilizó acetato solamente, se encontró que la concentración de biomasa fue de 1.23 mg/g soporte seco y la actividad acetoclástica fue de 0.4 g/L·d. Este último lote se mantuvo a 55° C durante 120 días para adaptarlo a termofilia. Al finalizar este tratamiento, los SVI aumentaron de 1.2 a 2.9 mg/g de soporte seco y la actividad acetoclástica aumentó a 0.5 g acetato/L·d.

La dinámica de inmovilización en termofilia se llevó a cabo alimentando los reactores con los mismos sustratos que en el caso anterior. Se encontró que para ambos experimentos, la capacidad de acetoclástica de las biopartículas fue inferior con respecto a los experimentos mesofílicos, de 0.2 y 0.08 g acetato/L·d. En el primer caso la máxima cantidad de biomasa fijada fue de 0.9 mg SVI/g soporte seco y en el segundo de 2.3. De todos los experimentos se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) que muestran el tipo de microflora inmovilizada. Los lotes alimentados con acetato, tanto en mesofilia como en termofilia mostraron bacterias bacilares del tipo *Methanosaeta*, colonizando el soporte. El lote mesofílico adaptado a termofilia, mostró inicialmente bacilos de extremos planos que

posteriormente cambiaron de morfología y además se inmovilizaron bacterias cocoides. La inmovilización en termofilia con acetato y glucosa mostró estructuras similares a las descritas para el lote inmovilizado en acetato. La inmovilización en mesofilia con acetato y glucosa mostró que bacilos de extremos planos se hallaban embebidos en la biomasa que colonizó el soporte, principalmente bacterias de tipo cocoide.

A partir de estos experimentos y dados los resultados obtenidos durante la inmovilización en mesofilia con acetato y glucosa, se compararon dos reactores continuos mesofílicos con relaciones altura de lecho/diámetro de reactor de 6 y 3, utilizando estos mismos sustratos. Durante el arranque se operaron a un TRH de 24 horas que posteriormente se varió para analizar la respuesta del biorreactor al cambio en esta variable, así mismo se aumentó la carga orgánica volumétrica. Ambos reactores presentaron una restricción en la operación debida al flujo descendente para llevar a cabo la fluidificación inversa, ya que el biogás producido en el sistema se retiene en la fase líquida, llevando a una expansión excesiva del lecho y al desplazamiento de biopartículas reactivas. Este problema se presentó en el sistema con mayor altura de lecho, cuando la carga orgánica alcanzada era de 3 kg DQO/L·d. El segundo fue posible operarlo con 16 kg DQO/L·d, debido a que la altura del lecho era menor. Sin embargo, se operaron a cargas máxicas de 3.4 y 5.1 kg DQO/kg SVI·d, respectivamente y se encontró que los reactores se mantienen estables con eficiencias hasta del 96% y relaciones de alcalinidad de 0.75 en promedio. La máxima cantidad de biomasa en el primero fue de 5.2 kg SVI/m<sup>3</sup> de reactor para el primero y de 13.8 kg SVI/m<sup>3</sup>, para el segundo.

Finalmente, este prototipo se probó para el tratamiento de aguas residuales de tipo municipal. El reactor fue alimentado con agua residual de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa cuya concentración de DQO presentó variaciones entre 108 y 471 mg/L. Se utilizaron TRH de 3, 2, 1.3 y 0.6 h y consecuentemente las cargas orgánicas volumétricas variaron desde 1.7 a 10.4 kg DQO/m<sup>3</sup>·d, con las que

las eficiencias de remoción disminuyeron del 60 al 44.5%. El metano producido fue el 10% del teórico esperado y el reactor presentó poca expansión. La máxima concentración de biomasa en el soporte fue de 3.6 kg SVI/m<sup>3</sup> de reactor. El reactor mantuvo un pH de 8.0 y la relación de alcalinidades no disminuyó de 0.74, lo que indica que el sistema es estable aún cuando se operó con cargas másicas de 11 kg DQO/kg SVI·d. La operación a un TRH tan corto como 0.6 h permitió tratar aproximadamente 92 L/d de agua residual. Debido al flujo descendente, este sistema no presenta retención de sólidos suspendidos, por lo que deberán considerarse sistemas de postratamiento.

[illegible]

# ÍNDICE

|                                                                                                                                                                       | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>PRESENTACIÓN DE LA TESIS</b>                                                                                                                                       | iii    |
| <b>RESUMEN</b>                                                                                                                                                        | v      |
| <br><b>CAPÍTULO 1.</b> Generalidades de la digestión anaerobia mesofílica y termofílica. Formación de biopelículas. Sistemas de tratamiento con biomasa inmovilizada. |        |
| 1.1. La Degradación anaerobia de aguas residuales                                                                                                                     |        |
| 1.1.1. Generalidades                                                                                                                                                  | 3      |
| 1.1.2. Sintrofia                                                                                                                                                      | 6      |
| 1.1.3. Las metanógenas mesofílicas                                                                                                                                    | 7      |
| 1.1.4. Las metanógenas termofílicas y sintrofia                                                                                                                       | 10     |
| 1.2. La termoestabilidad                                                                                                                                              |        |
| 1.2.1. Generalidades                                                                                                                                                  | 13     |
| 1.2.2. Proteínas                                                                                                                                                      | 14     |
| 1.2.3. Ácido desoxirribonucleico                                                                                                                                      | 15     |
| 1.2.4. Lípidos, membrana celular y metacoindritina                                                                                                                    | 16     |
| 1.2.5. Capacidad de adaptación                                                                                                                                        | 17     |
| 1.3. Formas de agrupamiento                                                                                                                                           |        |
| 1.3.1. Generalidades                                                                                                                                                  | 18     |
| 1.3.2. Las sustancias exopoliméricas y su composición                                                                                                                 | 20     |
| 1.3.3. La formación de biopelículas                                                                                                                                   | 25     |

|                                                                  | Página |
|------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.3.4. La influencia del tipo de soporte                         | 28     |
| 1.3.5. Biopelícula y metabolismo                                 | 29     |
| 1.3.6. Estabilidad de las biopelículas                           | 31     |
| 1.3.7. Inmovilización de bacterias anaerobias                    | 32     |
| 1.4. Los sistemas de tratamiento con biomasa inmovilizada        |        |
| 1.4.1. Generalidades, prototipos y soportes                      | 33     |
| 1.5. El lecho fluidificado (LF)                                  |        |
| 1.5.1. Antecedentes                                              | 34     |
| 1.5.2. La hidrodinámica de reactores de lecho fluidificado (RLF) | 36     |
| 1.5.3. Arranque y operación de lechos fluidificados              | 46     |
| 1.5.4. Ventajas y desventajas de los lechos fluidificados        | 50     |
| 1.5.5. Los RLF de una y dos etapas                               | 53     |
| 1.5.6. Aplicaciones de los RLF                                   | 54     |
| 1.6. Sumario                                                     | 55     |
| 1.7. Justificación                                               | 58     |
| 1.8. Objetivos                                                   |        |
| 1.8.1. Objetivo general                                          | 59     |
| 1.8.2. Objetivos particulares                                    | 59     |
| <b>CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos</b>                          |        |
| 2.1. Reactores operados en lote                                  |        |
| 2.1.1. Sistema de inmovilización                                 | 63     |
| 2.1.2. Soporte                                                   | 64     |

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.3. Inóculos                                                                 |    |
| 2.1.3.1. Inóculo mesofílico                                                     | 66 |
| 2.1.3.2. Inóculo termofílico                                                    | 66 |
| 2.1.4. Composición del medio de cultivo de Balch                                | 67 |
| 2.1.5. Arranque y operación de los reactores                                    | 68 |
| 2.1.6. Determinaciones de actividad acetoclástica y parámetros cinéticos        | 68 |
| 2.1.6.1. Preparación del medio de cultivo en botellas serológicas               | 69 |
| 2.1.6.2. Toma de muestras durante los experimentos de inmovilización            | 70 |
| 2.1.6.3. Inoculación de botellas serológicas                                    | 70 |
| 2.1.6.4. Adición de sustratos                                                   | 71 |
| 2.1.6.5. Toma de muestra para análisis cromatográfico                           | 72 |
| 2.1.7. Técnica para el análisis cromatográfico de acetato y de metano           |    |
| 2.1.7.1. Elaboración de la curva estándar de acetato                            | 73 |
| 2.1.7.2. Elaboración de la curva estándar de metano                             | 74 |
| 2.1.7.3. Cálculos de actividad acetoclástica total y específica                 | 75 |
| 2.1.8. Determinación de biomasa inmovilizada                                    | 76 |
| 2.1.8.1. Técnica para la determinación de sólidos volátiles inmovilizados (SVI) | 77 |
| 2.1.8.2. Técnica para la determinación de proteína soluble                      | 79 |
| 2.1.8.3. Técnica para la determinación de carbohidratos totales                 | 80 |
| 2.1.9. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB)    | 81 |
| 2.2. Reactores operados en continuo                                             |    |
| 2.2.1. Dimensionamiento                                                         | 84 |
| 2.2.2. Inóculos                                                                 | 87 |
| 2.2.3. Soporte                                                                  | 88 |

|                                                                                                               | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.2.4. Condiciones de arranque                                                                                | 88     |
| 2.2.5. Condiciones de operación en continuo                                                                   | 89     |
| 2.2.6. Análisis                                                                                               | 90     |
| 2.2.6.1. Técnica para la determinación de demanda química de oxígeno (DQO)                                    | 90     |
| 2.2.6.2. Técnica para la determinación de calidad del biogás                                                  | 91     |
| 2.2.6.3. Técnica para la determinación de la relación de alcalinidades                                        | 92     |
| 2.2.7. Definiciones y cálculos para reactores continuos                                                       | 93     |
| 2.2.7.1. Tiempo de retención hidráulico (TRH)                                                                 | 93     |
| 2.2.7.2. Eficiencia de remoción de materia orgánica                                                           | 94     |
| 2.2.7.3. Carga orgánica volumétrica                                                                           | 94     |
| 2.2.7.4. Carga másica                                                                                         | 94     |
| 2.2.7.5. Actividad específica                                                                                 | 94     |
| 2.2.7.6. Caudal de biogás producido                                                                           | 95     |
| 2.2.7.7. Caudal experimental de metano                                                                        | 95     |
| 2.2.7.8. Caudal teórico de metano                                                                             | 95     |
| <br><b>CAPÍTULO 3. Inmovilización de bacterias anaerobias en mesofilia (35° C) en el RLFI operado en lote</b> |        |
| <br>3.1. Inmovilización con acetato y glucosa                                                                 |        |
| 3.1.1. Dinámica acetoclástica de partículas inmovilizadas                                                     | 98     |
| 3.1.2. Dinámica de acumulación de biomasa                                                                     | 99     |
| 3.1.3. Descripción de muestras observadas en MEB                                                              | 101    |

|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| 3.2. Inmovilización con acetato                           |     |
| 3.2.1. Dinámica acetoclástica y acumulación de biomasa    | 103 |
| 3.2.2. Descripción de imágenes observadas en MEB          | 104 |
| 3.3. Adaptación de biopartículas mesofílicas a termofilia |     |
| 3.3.1. Dinámica de actividad acetoclástica                | 106 |
| 3.3.2. Dinámica de acumulación de biopelícula             | 108 |
| 3.3.3. Descripción de imágenes obtenidas en MEB           | 109 |
| 3.4. Determinación de parámetros cinéticos                | 111 |
| 3.5. Discusión                                            | 115 |
| 3.6. Conclusiones                                         | 119 |

#### **CAPÍTULO 4. Inmovilización de bacterias anaerobias en termofilia (55° C) en el RLFI operado en lote**

|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| 4.1. Inmovilización con acetato y glucosa                 |     |
| 4.1.1. Dinámica acetoclástica de partículas inmovilizadas | 123 |
| 4.1.2. Dinámica de acumulación de biomasa                 | 124 |
| 4.2. Inmovilización con acetato                           |     |
| 4.2.1. Dinámica acetoclástica y acumulación de biomasa    | 125 |
| 4.2.2. Descripción de muestras observadas en MEB          | 127 |
| 4.3. Comparación de resultados entre experimentos         | 129 |
| 4.4. Discusión                                            | 132 |
| 4.5. Conclusiones                                         | 135 |

## **CAPÍTULO 5. Arranque y operación en continuo del RLFI para el tratamiento de agua residual sintética**

### **5.1. RLFI-1**

5.1.1. Inoculación y arranque 139

#### **5.1.2. Operación en continuo**

5.1.2.1. Evolución de la concentración de DQO, carga orgánica volumétrica y eficiencia de remoción 140

5.1.2.2. Producción de biogás y composición 144

5.1.2.3. Evolución del pH y de la relación de alcalinidades 148

5.1.2.4. Evolución de SSV en el efluente y acumulación de biomasa inmovilizada en el soporte 149

5.2. Discusión 153

### **5.3. RLFI-2**

5.3.1. Inoculación y arranque 157

#### **5.3.2. Operación en continuo**

5.3.2.1. Evolución de la concentración de DQO, carga orgánica volumétrica y eficiencia de remoción 159

5.3.2.2. Producción de biogás y composición 163

5.3.2.3. Evolución del pH y de la relación de alcalinidades 165

5.3.2.4. Evolución de SSV en el efluente y acumulación de biomasa inmovilizada en el soporte 166

5.4. Discusión 169

5.5. Conclusiones 177

## **CAPÍTULO 6. Tratamiento anaerobio de aguas residuales municipales en el RLFI**

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.1. Arranque                                                                                    | 182 |
| 6.2. Operación en continuo                                                                       |     |
| 6.2.1. Evolución de la concentración de DQO, carga orgánica volumétrica y eficiencia de remoción | 182 |
| 6.2.2. Producción de biogás y composición                                                        | 185 |
| 6.2.3. Evolución del pH y de la relación de alcalinidades                                        | 186 |
| 6.2.4. Evolución de SSV en el efluente y acumulación de biomasa inmovilizada en el soporte       | 188 |
| 6.3. Discusión                                                                                   | 190 |
| 6.4. Conclusiones                                                                                | 197 |

## **CAPÍTULO 7. Conclusiones Generales y Recomendaciones**

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 7.1. Conclusiones Generales | 200 |
| 7.2. Recomendaciones        | 202 |

|                    |            |
|--------------------|------------|
| <b>REFERENCIAS</b> | <b>204</b> |
|--------------------|------------|

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                   | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1.1.</b> Etapas y vías metabólicas involucradas en la digestión anaerobia.                                                                                              | 5      |
| <b>Figura 1.2.</b> Esquema de la formación de biopelículas en un soporte inerte inmerso en una fase líquida.                                                                      | 27     |
| <b>Figura 1.3.</b> Regímenes de expansión en la fluidificación ascendente en sistemas trifásicos.                                                                                 | 37     |
| <b>Figura 1.4.</b> Regímenes de expansión en lechos fluidificados de flujo descendente en sistemas trifásicos.                                                                    | 40     |
| <b>Figura 2.1.</b> Esquema del sistema de inmovilización alimentado por lote.                                                                                                     | 63     |
| <b>Figuras 2.2.a, b, c y d.</b> Imágenes de MEB de partículas de polietileno utilizadas como soporte.                                                                             | 65     |
| <b>Figura 2.3.</b> Esquema del procedimiento general para la determinación de actividad específica para partículas plásticas.                                                     | 82     |
| <b>Figura 2.4.</b> Esquema del RLFI y del medidor de flujo de biogás que se utilizó para la operación en continuo.                                                                | 85     |
| <b>Figura 3.1.</b> Consumo de acetato y dinámica de actividad acetoclástica de partículas mesofílicas inmovilizadas con acetato y glucosa.                                        | 98     |
| <b>Figura 3.2.</b> Cinética de acumulación de SVI, síntesis de carbohidratos y proteínas durante la inmovilización de células en biopartículas alimentadas con acetato y glucosa. | 99     |
| <b>Figuras 3.3.a, b, c y d.</b> Imágenes de MEB de biopartículas mesofílicas alimentadas con acetato y glucosa.                                                                   | 102    |
| <b>Figura 3.4.</b> Consumo de acetato y dinámica de actividad acetoclástica de partículas mesofílicas alimentadas con acetato.                                                    | 104    |
| <b>Figuras 3.5.a, b, c y d.</b> Imágenes de MEB de biopartículas inmovilizadas en mesofilia alimentadas con acetato.                                                              | 105    |

|                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figuras 3.6.a y b.</b> Consumo de acetato (a) y dinámica acetoclástica (b) de partículas mesofílicas mantenidas en condiciones termofílicas.                                                 | 107 |
| <b>Figura 3.7.</b> Comparación de actividades específicas antes (35 °C) y después de la adaptación (55 °C).                                                                                     | 108 |
| <b>Figura 3.8.</b> Evolución de la concentración de proteínas, carbohidratos y SVI de biopartículas adaptadas a termofilia.                                                                     | 109 |
| <b>Figuras 3.9.a, b, c y d.</b> Imágenes de MEB de biopartículas mesofílicas adaptadas a termofilia y alimentadas con acetato.                                                                  | 110 |
| <b>Figura 3.10.</b> Velocidad específica de tres lotes de biopartículas a diferentes concentraciones de acetato                                                                                 | 112 |
| <b>Figura 3.11.</b> Linearización por la modificación de Hanes-Woolf para los tres lotes de biopartículas obtenidos.                                                                            | 113 |
| <b>Figura 4.1.</b> Cinética de consumo de acetato durante el periodo de inmovilización de partículas termofílicas inmovilizadas con acetato y glucosa.                                          | 123 |
| <b>Figura 4.2.</b> Acumulación de biopelícula en biopartículas inmovilizadas en termofilia con acetato y glucosa.                                                                               | 124 |
| <b>Figura 4.3.</b> Cinética de consumo de acetato durante el periodo de inmovilización de partículas termofílicas con acetato.                                                                  | 126 |
| <b>Figuras 4.4.a, b, c y d.</b> Imágenes de MEB de biopartículas termofílicas inmovilizadas con acetato y con acetato y glucosa.                                                                | 128 |
| <b>Figuras 5.1, 5.2 y 5.3.</b> Evolución de la DQO soluble, de la carga orgánica volumétrica (Bv) y de la eficiencia de remoción de DQO durante el arranque y operación en continuo del RLFI-1. | 142 |
| <b>Figura 5.4.</b> Evolución de la producción de biogás y composición de metano durante la operación del RLFI-1.                                                                                | 145 |

**Figura 5.5.** Comparación entre la producción de metano teórica y experimental durante la operación del RLFI-1.

**Figura 5.6.** Evolución del pH y de la relación de alcalinidades en el efluente durante el arranque y operación en continuo del RLFI-1.

**Figura 5.7.** Evolución de los sólidos suspendidos volátiles durante el arranque y la operación en continuo del reactor de RLFI-1.

**Figura 5.8.** Evolución de biomasa inmovilizada durante la operación del reactor de RLFI-1.

**Figura 5.9.** Relación entre los datos experimentales y teóricos de la producción de metano obtenidos durante la operación del RLFI-1.

**Figuras 5.10 y 5.11.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la carga orgánica aplicada y a los TRH utilizados durante la corrida del RLFI-1.

**Figuras 5.12 y 5.13.** Relación entre la eficiencia de remoción y las cargas orgánicas aplicadas con respecto a la actividad específica de las biopartículas durante la operación del RLFI-1.

**Figuras 5.14, 5.15 y 5.16.** Variación en el influente y efluente de la concentración de DQO, de la carga orgánica volumétrica (Bv) y de la eficiencia de remoción durante la operación del RLFI-2.

**Figura 5.17.** Evolución de la producción de biogás y de la proporción de metano respectiva durante la operación del RLFI-2.

**Figura 5.18.** Comparación de la producción de metano detectado con respecto a la producción de metano esperado durante la operación de RLFI-2.

**Figura 5.19.** Evolución del pH y de la relación de alcalinidades del efluente durante la operación del RLFI-2.

|                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 5.20.</b> Acumulación de biomasa inmovilizada durante la operación del RLFI-2.                                                                                                                                      | 167 |
| <b>Figura 5.21.</b> Evolución de los sólidos suspendidos volátiles del efluente durante la operación del RLFI-2.                                                                                                              | 168 |
| <b>Figura 5.22. y 5.24.</b> Comparación entre el metano producido y el metano esperado y la relación entre la producción de metano con respecto a la carga orgánica volumétrica removida durante la operación del RLFI-2.     | 169 |
| <b>Figuras 5.24 y 5.25.</b> Relación entre la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la carga orgánica aplicada y a los TRH utilizados durante la operación del RLFI-2.                                                 | 172 |
| <b>Figuras 5.26 y 5.27.</b> Relación entre la eficiencia de remoción de DQO y las cargas orgánicas aplicadas con respecto a la actividad específica de las biopartículas.                                                     | 172 |
| <b>Figuras 5.28 y 5.29.</b> Relación entre las cargas másicas aplicadas y la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la actividad específica de las biopartículas durante la operación del RLFI-2.                       | 173 |
| <b>Figuras 6.1, 6.2 y 6.3.</b> Evolución de la concentración de DQO, de la carga orgánica volumétrica (Bv) y de la eficiencia de remoción en influente total y efluente soluble, durante el periodo de operación del reactor. | 183 |
| <b>Figura 6.4.</b> Producción de biogás y fracción de metano durante el tratamiento de aguas residuales municipales en el RLFI.                                                                                               | 185 |
| <b>Figura 6.5.</b> Comparación entre el metano producido y el teórico expresado durante el tratamiento de aguas residuales municipales en el RLFI.                                                                            | 186 |
| <b>Figura 6.6.</b> Evolución del pH durante el tratamiento de aguas residuales municipales en el RLFI.                                                                                                                        | 186 |

- Figura 6.7.** Evolución de la relación de alcalinidades durante el tratamiento de aguas residuales municipales en el RLFI. 187
- Figura 6.8.** Evolución de los sólidos suspendidos volátiles en influente y efluente, durante el tratamiento de aguas residuales municipales en el RLFI. 188
- Figura 6.9.** Evolución de la biomasa inmovilizada durante el tratamiento de aguas residuales municipales en el RLFI. 189
- Figura 6.10.** Comparación entre la producción teórica y experimental de metano durante el tratamiento de aguas residuales municipales con el RLFI. 190
- Figuras 6.11 y 6.12.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la carga orgánica aplicada y a los TRH utilizados durante el tratamiento de aguas residuales municipales con el RLFI. 191
- Figuras 6.13 y 6.14.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO, la carga orgánica volumétrica (Bv) y la actividad específica durante el tratamiento de aguas residuales municipales con el RLFI. 193

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

|                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 1.1.</b> Comparación de parámetros fisiológicos de <i>Methanosarcina</i> spp. y <i>Methanosaeta</i> spp.                                                                                                           | 9   |
| <b>Tabla 1.2.</b> Comparación de parámetros fisiológicos de <i>Methanosarcina thermophila</i> y <i>Methanothrix thermoacetophila</i> .                                                                                      | 11  |
| <b>Tabla 1.3.</b> Constantes cinéticas de cultivos anaerobios mesofílicos (35° C).                                                                                                                                          | 20  |
| <b>Tabla 2.1.</b> Condiciones de experimentación, sustratos utilizados y concentraciones para los diferentes experimentos de inmovilización.                                                                                | 68  |
| <b>Tabla 3.1.</b> Comparación de valores de parámetros cinéticos $K_s$ y $k_{max}$ obtenidos para las biopartículas.                                                                                                        | 114 |
| <b>Tabla 4.1.</b> Comparación de actividades globales y específicas, concentración de biomasa inmovilizada y composición de la biopelícula entre condiciones de inmovilización y fuentes de carbono utilizadas.             | 130 |
| <b>Tabla 5.1.</b> Carga orgánica volumétrica, carga másica, actividad específica y velocidad superficial durante las diferentes etapas de operación del RLFI-1.                                                             | 143 |
| <b>Tabla 5.2.</b> Carga orgánica volumétrica, carga másica, actividad específica y velocidad superficial durante las diferentes etapas de operación del RLFI-2.                                                             | 162 |
| <b>Tabla 5.3.</b> Comparación entre datos experimentales de este estudio y los datos reportados para lechos fluidificados ascendentes.                                                                                      | 174 |
| <b>Tabla 6.1.</b> Cargas orgánicas volumétricas carga másicas, actividades específicas y velocidades superficiales durante las diferentes etapas de operación del reactor para tratamiento de aguas residuales municipales. | 184 |
| <b>Tabla 6.2.</b> Concentración de DQO remanente del tratamiento de aguas residuales municipales en el RLFI, durante las diferentes etapas de operación.                                                                    | 194 |

## SÍMBOLOS Y BREVIATURAS

---

$$Ar \text{ ó } Ga = \frac{d_p^3 \cdot \rho_s (\rho_l - \rho_s) \cdot g}{\mu^2}, \text{ Número de Arquímedes o de Galileo}$$

$d_p$  = diámetro de las partículas, m

$D_R$  = diámetro del reactor, m

$g$  = factor gravitacional,  $m/s^2$

$H_o$  = altura del lecho, m

$$k = k_{max} \frac{S}{K_s + S}, \text{ cinética tipo Monod para consumo de sustrato}$$

$$k = \frac{1}{x} \cdot \frac{ds}{dt}, \text{ actividad acetoclástica específica, } \frac{g \text{ acetato}}{g \text{ SVI} \cdot d}$$

$$k_{max} = \frac{\mu_{max}}{Y_{x/s}}, \text{ actividad acetoclástica específica máxima}$$

$K_s$  = constante de afinidad al sustrato, g acetato/L

$$e_{mf} = \frac{d_p \cdot u_{mf} \cdot \rho_l}{\mu_l}, \text{ Número de Reynolds}$$

$S$  = concentración de sustrato, g acetato/L

$U_{mf}$  = velocidad mínima de fluidificación, m/s

$U_{sg}$  = velocidad superficial del gas, m/s

$U_{sl}$  = velocidad superficial del líquido, m/s

$$Y_{x/s} = \text{rendimiento de producción de biomasa por consumo de sustrato, } \frac{g \text{ SVI}}{g \text{ sustrato}}$$

$\Delta P$  = caída de presión,  $\text{kg/m}^2$

$\varepsilon$  = fracción de gas y líquido

$\varepsilon_g$  = fracción de gas

$\varepsilon_l$  = fracción de líquido

$\varepsilon_{p,mf} = 1 - \frac{\text{volumen de las partículas}}{\text{volumen del lecho expandido}}$ , fracción de espacios vacíos

$\phi_s = \frac{\text{superficie de una esfera}}{\text{superficie de la partícula}}$ , esfericidad relativa

$\mu_{\max}$  = velocidad de crecimiento máximo,  $\text{d}^{-1}$

$\mu$  = viscosidad,  $\text{g}\cdot\text{cm/s}$

$\rho_s$  = densidad de las partículas,  $\text{kg/m}^3$

$\rho_l$  = densidad del líquido,  $\text{kg/m}^3$

---



# 1 Generalidades de la digestión anaerobia mesofílica y termofílica. Formación de biopelículas y sistemas de tratamiento con biomasa inmovilizada

El tratamiento biológico de aguas residuales por vía anaerobia se ha extendido en México desde 1987 debido la aplicación de la Legislación Ambiental promulgada por el Gobierno Federal para el tratamiento de desechos. En 1995 se produjeron 232 m<sup>3</sup>/s de aguas residuales municipales y 168 m<sup>3</sup>/s de aguas residuales industriales y se trataban el 20% y el 12% de estos volúmenes respectivamente, con bajas eficiencias. Esta falta de capacidad instalada para tratamiento abre la posibilidad para la introducción de sistemas de bajo costo, con tecnologías avanzadas y capaces de tratar varios tipos de efluentes, como son los

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

digestores anaerobios. De estos, actualmente se tienen 75 reactores de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) tratando el 0.57% de las aguas residuales totales generadas y 3.4 % de las aguas tratadas. Contrariamente a Europa y Estados Unidos, en México el 43.5% de los reactores anaerobios se utilizan para el tratamiento de aguas negras (Monroy *et al.*, 1997).

A pesar de la complejidad microbiológica de este proceso, es ampliamente conocido el hecho de que los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia son capaces de agruparse en consorcios bacterianos complejos y degradar sintroficamente los contaminantes disponibles en las aguas.

En este Capítulo se revisan algunas de las transformaciones y las interacciones sintróficas que se presentan en la digestión anaerobia, las características fisiológicas generales de los principales grupos de bacterias metanógenas: *Methanosaeta* y *Methanosarcina*, así como la analogía de las mismas en mesofilia y termofilia. Se revisan los factores que proveen la termoestabilidad.

Igualmente se aborda la capacidad natural de agrupamiento de estos microorganismos para la formación de biopelículas, la función de las sustancias exopoliméricas y la complejidad del proceso.

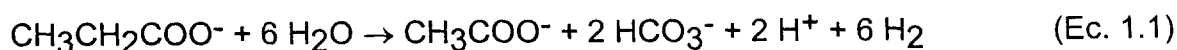
Finalmente se revisa la utilidad que representa en sistemas de tratamiento esta característica y específicamente se describe el sistema de interés de este trabajo, el lecho fluidificado, así como los regímenes de expansión y algunos fundamentos de la hidrodinámica del sistema y las características que los hacen comercialmente competitivos con los sistemas de biomasa suspendida.

## 1.1. La Degradación Anaerobia en Aguas Residuales

### 1.1.1. Generalidades

La degradación anaerobia de materia orgánica es un proceso que involucra varias vías metabólicas y que se lleva a cabo en la ausencia de oxígeno, nitrato y sulfato como aceptores de electrones. Depende de interacciones tróficas bacterianas complejas, las cuales resultan en la producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, como productos finales de la reducción del carbono.

Se realiza a través de tres pasos en serie que incluyen la hidrólisis de compuestos orgánicos complejos y de alto peso molecular disueltos en el agua residual como proteínas, carbohidrato, lípidos y compuestos aromáticos o amídicos, por medio de enzimas extracelulares. Posteriormente, a partir de fermentación de las moléculas pequeñas formadas en el paso anterior, se obtendrán piruvato, succinato, lactato y etanol así como ácidos grasos volátiles como el formato, acetato, propionato, n- e iso-butirato y en algunas ocasiones n- e iso-valerato y caproato. Los ácidos grasos y alcoholes se degradarán a acetato por β-oxidación. Los ácidos como el propionato y el butirato serán transformados a acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por oxidación anaerobia de acuerdo a las reacciones 1.1 y 1.2.

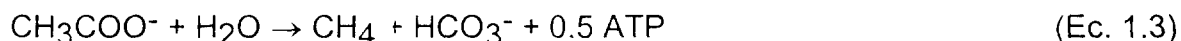


$$\Delta G^0 = 152 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^\circ = 48.1 \text{ kJ/mol}$$

El acetato, se transforma en la tercera y última etapa a metano, que es el producto final en este proceso, como se muestra en la ecuación 1.3. A partir de este sustrato se formarán aproximadamente dos terceras partes del metano total, ya que es el principal precursor de la metanogénesis en reactores anaerobios (Jeris y McCarty, 1965; Smith y Mah, 1966 y 1980).



$$\Delta G^\circ = -31 \text{ kJ/mol}$$

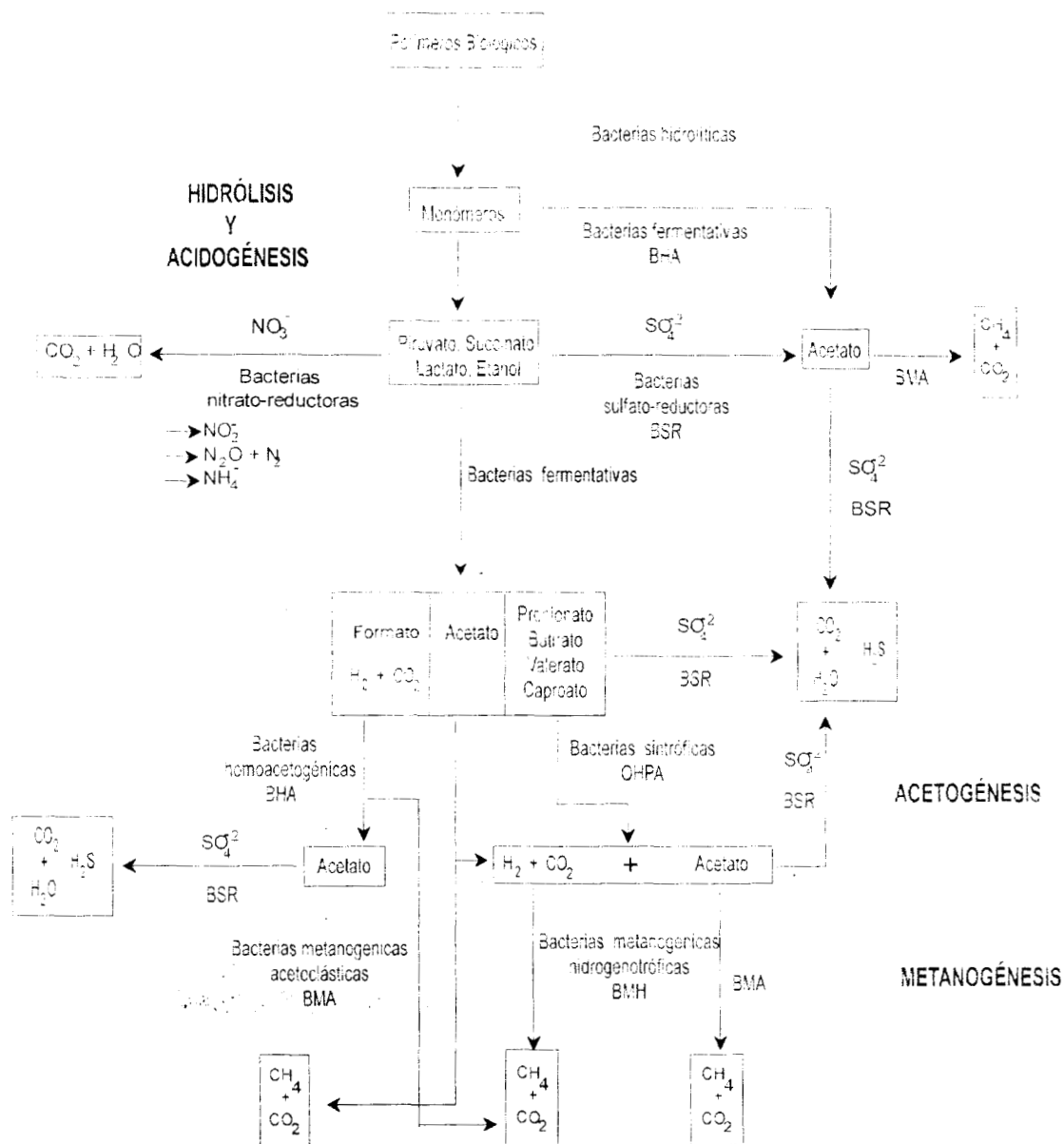
El  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  en una reacción de oxido-reducción, formarán la tercera parte restante del metano, como se muestra en la siguiente ecuación.



$$\Delta G^\circ = -135.6 \text{ kJ/mol}$$

En este esquema de metabolismo anaerobio intervienen grupos tróficos de bacterias que viven en interdependencia mutua formando consorcios bacterianos. Este proceso, descrito en la Figura 1.1, es en general lento ya que depende de varios factores, tales como el pH, la temperatura, la concentración de materia orgánica. Adicionalmente, los tiempos de retención celular en digestores

anaerobios son prolongados, debido a la baja tasa de crecimiento de los microorganismos metanogénicos.



**Figura 1.1.** Etapas y vías metabólicas involucradas en la digestión anaerobia. BHA, bacterias homoacetogénicas; BSR, bacterias sulfato-reductoras; BMA, bacterias metanogénicas acetoclásticas; bacterias sintróficas OHPA, bacterias sintróficas acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno; BMH, bacterias metanogénicas hidrogenotróficas (tomado de Garcia, 1990).

### 1.1.2. Sintrofia

Los microorganismos que forman el consorcio metanogénico comprenden tres grupos de bacterias, las primeras son bacterias hidrolíticas fermentadoras de carbohidratos simples y poliméricos, así como bacterias proteolíticas y lipolíticas, facultativas y bacterias acidogénicas que utilizarán los sustratos provenientes de la primera etapa para producir ácidos grasos volátiles. Las segundas son las bacterias homoacetogénicas y las acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA, "obligated hydrogen producer acetogenic bacteria"), que al oxidar los ácidos de más de dos carbonos producen además de ácido acético, hidrógeno, que será removido en la siguiente etapa por las bacterias metanogénicas hidrogenotrofas que lo utilizan para reducir el  $\text{CO}_2$  y producir una tercera parte del  $\text{CH}_4$ . Esta relación sintrófica se conoce como "transferencia de hidrógeno entre especies" (Bryant *et al.*, 1967).

En los ambientes anaerobios, el flujo de carbón y de electrones durante la descomposición orgánica es regulada de tal forma que las presiones parciales de hidrógeno se mantienen en niveles muy bajos, ya que el  $\text{H}_2$  es un inhibidor para varias especies de bacterias quimioheterótrofas anaerobias. La remoción metabólica del  $\text{H}_2$  hace posible que otros compuestos tales como alcoholes, ácidos grasos y compuestos aromáticos se vuelvan sustratos termodinámicamente disponibles para el catabolismo microbiano (Zeikus, 1979). El umbral mínimo de tolerancia de hidrógeno para bacterias metanogénicas hidrogenotróficas varía de 2 a 10 Pa (Cord-Ruwish *et al.*, 1988).

La presión parcial de hidrógeno o potencial redox derivado de este proceso también regula la degradación de los ácidos de más de dos carbonos a ácido acético. Esta sintrofía entre las bacterias OHPA y las hidrogenotrofas regula la digestión anaerobia. Cuando el proceso es estable no existe acumulación de ácidos y la concentración de ácido acético es de 0.1 a 0.3 g/L. Un incremento en la concentración es indicativo de un cambio de carga orgánica en el influente o de que el proceso está operando a su máxima capacidad. Si el hidrógeno se acumula, los ácidos también se acumularán y la última etapa donde se lleva a cabo la metanogénesis se verá inhibida rápidamente por la disminución del pH (Henze y Harremoës, 1983).

En esta última etapa, la metanogénesis, se encuentran también las bacterias acetoclásticas metanogénicas que consumen el acetato y lo transforman a metano, proporcionando las dos terceras partes restantes.

### **1.1.3. Las metanógenas mesofílicas**

El reino de las Archaeobacterias a las cuales pertenecen las bacterias metanógenas representa la tercera línea de descendencia en la evolución de la vida, además de los procariontes comunes o eubacterias y los eucariontes. Estos microorganismos pueden encontrarse en ambientes terrestres o acuáticos, en condiciones anaerobias, de hipersalinidad, en ambientes hidrotérmicos o geotérmicos y como simbioses en el tracto digestivo de animales. Este reino consiste de bacterias aerobias, anaerobias estrictas y facultativas que utilizan los

tienden a agregarse en cúmulos típicos de filamentos enredados. Las células individuales son de extremos planos y miden de 0.7 a 1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de largo, son no fluorescentes y presentan alta afinidad por el acetato pero baja velocidad de crecimiento en este sustrato.

El género *Methanosarcina* comprende bacterias de tipo cocoide, que forman agregados de formas irregulares llamados pseudosarcinas, cuyo diámetro puede variar de 1-1000  $\mu\text{m}$ , con una pared común envolviendo una masa apretada de células con un arreglo desordenado. La pared celular contiene una capa de proteínas adyacente a la membrana celular y fuera de esta capa se encuentra una capa de exopolímeros compuesta por polisacáridos y al menos 5% de proteínas. Son fluorescentes, presentan alta velocidad de crecimiento y baja afinidad por el acetato (König y Stetter, 1989; Jetten *et al.*, 1992; Ferry, 1993; Speece, 1996).

En la Tabla 1.1 se presentan las constantes cinéticas de crecimiento de estos microorganismos.

**Tabla 1.1.** Comparación de parámetros fisiológicos de *Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta* spp. (tomado de Jetten *et al.*, 1992).

|                                          | <i>Methanosarcina</i> spp.                                      | <i>Methanosaeta</i> spp. |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Fisiología                               | Generalizada                                                    | Especialista             |
| Substratos                               | H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> , metanol, metilaminas, acetato | acetato                  |
| $\mu_{\text{max}}$ (d <sup>-1</sup> )    | 0.3                                                             | 0.1                      |
| Tiempo de duplicación (d)                | 0.5-2                                                           | 1-12                     |
| Y <sub>x/s</sub> (g biomasa/mol acetato) | 2.1                                                             | 1.4                      |
| K <sub>s</sub> (mM)                      | 3.0                                                             | 0.5                      |
| Umbral de utilización de acetato         | 0.2 a 1.2 mM                                                    | 7 a 70 $\mu\text{M}$     |

sustratos disponibles quimiolitotóticamente, organotóticamente y organotófica facultativamente. Pueden ser mesófilos o termófilos incluyendo termófilos extremos que crecen a más de 100° C (König y Stetter, 1989).

Las bacterias productoras de metano mesófilas son anaerobias estrictas y se conocen 68 especies descritas, de las que el 77% son hidrogenotrofas, el 14% acetotrofas y el 28% metilotrofas y solamente 3% utilizan hidrogeno para reducir directamente el metanol a metano. La clasificación taxonómica comprende 3 órdenes, 7 familias y 20 géneros. Además se han descrito 5 géneros bacterianos asociadas a las metanógenas en la transferencia sintrófica de hidrógeno (García, 1990).

De estas bacterias metanógenas se reconocen dos géneros importantes que son las que se encuentran con mayor frecuencia en estos sistemas: *Methanosarcina* cuyas especies tienen la capacidad de degradar acetato y una variedad de sustratos para la producción de metano y *Methanosaeta*<sup>1</sup>, que es acetoclasta obligada. Ambas son reconocidas por tener la capacidad de utilizar únicamente el acetato como fuente de energía y carbono, es decir, son los únicos géneros de metanógenas capaces de catabolizar este sustrato (Jetten *et al.*, 1992).

El género *Methanosaeta* comprende bacterias que crecen en forma de bacilos cortos o de filamentos muy largos y flexibles formados por varias células, que permanecen juntos debido a una estructura envolvente en forma de tubo hueco y

<sup>1</sup> Anteriormente conocida como *Methanothrix*. Ya que esta especie permanece como de validez dudosa (Wayne, 1994), en lo sucesivo se tratará como género *Methanosaeta* (Patel y Sprott, 1990; Boone, 1991) excepto cuando la literatura específica indique explícitamente *Methanothrix*.

Se puede apreciar el carácter específico hacia un sólo sustrato de la última que crecerá a más bajas concentraciones que su comensal *Methanosarcina*, análogo al que se presenta en condiciones mesofílicas.

Por otro lado, Ahring y Westermann (1984) describieron el bacilo TAM ("thermophilic acetate-utilizing methanogen"), que forma filamentos de varios individuos, es metanogénico-acetoclástico y termófilo, capaz de utilizar también formato, fluoresce durante la utilización de  $H_2$ - $CO_2$  y probablemente representa un género nuevo.

A su vez, Zinder y Koch (1984) describieron un cocultivo termófilo, sintrófico, acetato-oxidante e hidrogenotrófico, en donde el acetato es inicialmente oxidado a  $H_2$ - $CO_2$  y después estos productos son reducidos a  $CH_4$ . El primer paso se lleva a cabo por medio de un bacilo acetato-oxidante (AOR, "acetate-oxidizing rod") no fluorescente y el segundo por un metanógeno hidrogenotrófico, *Methanobacterium*, sp. cepa THF ("thermophilic hydrogenotrophic fluorescent rod"), fuertemente fluorescente. El bacilo AOR depende del bacilo THF para mantener la concentración de  $H_2$  baja y el metanógeno depende del AOR para su sustrato.

Al igual que en mesofilia, en cocultivos sintróficos obligados que llevan a cabo transferencia de hidrógeno entre especies, la presión parcial de  $H_2$  debe ser tal que las reacciones de las especies involucradas sean termodinámicamente favorables. Si es muy baja, la reacción para consumidores de hidrógeno es desfavorable; si es muy alta, la reacción de los productores de hidrógeno también

es desfavorable ( $\Delta G > 0$ ). Para *Methanobacterium* THF, el umbral de hidrógeno se encontró en 14 Pa (Lee y Zinder, 1988).

Además de los grupos de bacterias metanogénicas termófilas descritas por Zinder (1990); Garcia (1990) describe fisiológicamente 13 especies incluidas en 3 órdenes, 5 familias y 6 géneros. La temperatura óptima de estas bacterias varia desde los 50° hasta los 110° C, como es el caso de *Methanopyrus*, sp.

Es importante mencionar que el mayor problema de los sistemas termofílicos, reside en el bajo rendimiento neto debido a arranques lentos y a la lentitud para responder y tolerar variaciones de carga orgánica, cambios de sustrato o adición de sustancias tóxicas (Zinder, 1990). Sin embargo, la velocidad de producción de metano es 25 a 50% más alta que en mesofilia y es independiente de la temperatura en un intervalo de 50 a 70° C (Henze y Harremoës, 1983).

## 1.2. La Termoestabilidad

### 1.2.1. Generalidades

La estabilidad térmica de las bacterias termofílicas es debida a varios factores inscritos en la información genética que es transcrita durante la síntesis de proteínas, enzimas, lípidos, ácidos nucleicos, componentes de la pared celular. Para adaptarse, sus macromoléculas deben mantener su estructura y funcionar a altas temperaturas (Sundaram, 1986; Lowe *et al.* 1993).

Se consideran dos mecanismos moleculares exclusivos de las bacterias termófilas para tolerar altas temperaturas: diferencias intrínsecas en estructuras macromoleculares y la presencia de cofactores termoestabilizadores, e. g. las termófilas extremas producen poliaminas, terminas y esperminas específicas que estabilizan el sistema de síntesis de proteínas y protegen a las macromoléculas de las altas temperaturas (Zeikus, 1979; Lowe *et al.*, 1993).

### **1.2.2. Proteínas**

En general, la termoestabilidad de las proteínas de los termófilos se refleja en cambios sutiles en la secuencia de aminoácidos. La secuencia modificada de aminoácidos resulta en cambios en la estructura interna de la proteína y en numerosas interacciones intramoleculares: interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, uniones metálicas, glicosilación. No hay evidencia de aminoácidos novedosos presentes en proteínas de metanógenos termofílicos extremos (Zeikus, 1979; Sundaram, 1986; Lowe *et al.*, 1993).

Estas interacciones hacen a las proteínas más resistentes a la desnaturalización química (solventes orgánicos, detergentes, agentes proteolíticos y pH extremos) y térmica y también hace a las enzimas más "rígidas", e. g. los sitios activos son más ordenados y son poco adaptables a sustratos diferentes, lo que resulta en una alta especificidad y por lo tanto son deficientes como catalizadores a baja temperatura (Zeikus, 1979).

Existe evidencia de que los metanógenos producen proteínas resistentes a cambios térmicos súbitos en respuesta a temperaturas elevadas, conocidas como "proteínas de choque" y también pueden producir proteínas tipo chaperonina para mantener la estabilidad de otras macromoléculas. También acumulan en el citoplasma celular en altas concentraciones, el metabolito 2,3-ciclodifosfoglicerato que utiliza como contra-ión al  $K^+$  (KcDPG) que probablemente estabiliza a las proteínas, aunque el papel específico de este compuesto no ha sido dilucidado (Lowe *et al.*, 1993; Zinder, 1993).

### **1.2.3. Ácido desoxirribonucleico**

El ADN de los microorganismos termófilos no tiene una composición de bases relevante que de indicios de estabilidad a la temperatura. El contenido de citosina y guanina es variable e *in vitro*, el ADN puede ser fácilmente estabilizado por puentes salinos con fuerza iónicas moderadas (con soluciones 0.1 M de  $Mg^{+2}$ ). Sin embargo, el *trans* RNA contiene más guanina y citosina en la región de bases específicas pareadas que provee más enlaces hidrógeno y por lo tanto mayor estabilidad a la temperatura. Igualmente, el ADN puede contener más timidina tiolada que provee mayor fuerza de agrupamiento en el interior de la molécula (Zeikus, 1979).

Una característica exclusiva de las arqueobacterias termófilas, es la presencia de una topoisomerasa, la girasa reversa. La presencia de esta macromolécula esta relacionada al crecimiento en temperaturas altas, en particular superiores a 70° C,

y produce superespirales positivas en el ADN, lo cual estabilizaría la molécula haciéndola más compacta por el mayor número de giros o superenrollamiento (Lowe *et al.* 1993).

El ADN también puede ser estabilizado por el cDPG y por proteínas tipo histona (HMf) que se unen de manera no específica al ADN aumentando la resistencia a la temperatura de desnaturalización (Zinder, 1993).

#### **1.2.4. Lípidos, membrana celular y metanocoindritina**

Los lípidos de la membrana celular de termófilos extremos contienen más ácidos grasos saturados y de cadena recta que los mesófilos. Esto permite a las bacterias termofílicas crecer en altas temperaturas proveyendo el grado correcto de fluidez requerido para el funcionamiento de la membrana.

Las bacterias metanógenas y otras arqueobacterias tienen lípidos isoprenoideos con enlaces etéreos; los grupos de los extremos de la molécula se unen de manera covalente formando una molécula tetraetérea. Igualmente existen reacciones exclusivas de las arqueobacterias, de condensación entre isoprenoides superiores que pueden describirse como cabeza/cabeza, cola/cola y cabeza/cola que resulta en una monocapa de lípidos, lo que mantiene unida e íntegra a la membrana (Lowe *et al.*, 1993).

Los mesófilos y los termófilos pueden alterar la composición de ácidos grasos específicos de los lípidos de la membrana en respuesta a la temperatura de

crecimiento para alcanzar o mantener una viscosidad en la membrana constante en un proceso llamado adaptación homeoviscosa (Zinder, 1993).

La capa exterior de heteropolisacáridos o metanocoindritina de microorganismos termófilos como *Methanosarcina thermophila*, provee agrupamiento y estabilización a la temperatura y a la presión osmótica, probablemente debido a que se trata de polímeros aniónicos con un gran número de puentes de hidrógeno (Zinder, 1990).

#### **1.2.5. Capacidad de adaptación**

Debido a la escasez y las condiciones extremas a las que se han encontrado y aislado las bacterias termofílicas, se ha optado por usar inoculos mesofílicos adaptados a termofilia. Se ha reportado que los gránulos anaerobios mesófilos pueden funcionar como acarreadores efectivos de bacterias termofílicas durante las primeras etapas de adaptación al incremento en la temperatura, aunque a largo plazo, los gránulos se desintegran perdiendo su estructura compacta, se vuelven floculentos y se tiene el lavado de sólidos en reactores, lo que disminuye la capacidad de conversión (van Lier *et al.*, 1992; Rintala *et al.*, 1993). La desintegración es debida probablemente a la muerte por alta temperatura de la mayoría de los microorganismos que sintetizan la matriz orgánica que forma el gránulo.

Es entonces evidente que la termofilicidad sólo puede estar codificada en la información genética de las células. Esto puede llevar a la conclusión de que las

bacterias anaerobias mesófilas adaptadas a termofilia, inicialmente se aclimatan a la temperatura, lo que las hace muy activas, aunque después, la actividad específica decae y la capacidad de granulación se pierde. Y solamente después de muchas generaciones de células, los microorganismos adquirirán los mecanismos moleculares específicos que darán lugar a la termoestabilidad y a la actividad biológica y será cuando estén completamente adaptadas a las nuevas condiciones, que las bacterias muestren capacidad de granulación.

### 1.3. Formas de agrupamiento

#### 1.3.1. Generalidades

Como se describió anteriormente, la digestión anaerobia es un proceso de varias etapas en el que interviene un gran número de bacterias, que mantienen asociaciones e interrelaciones de flujo de sustratos y productos; por lo que naturalmente tienden a estar agrupadas en consorcios bacterianos, tales que les permiten estar cerca unas de otras según sus necesidades metabólicas.

Ha sido ampliamente reconocido que *Methanosaeta* es la bacteria que interviene inicialmente en la formación de esta agrupación porque forma filamentos largos, que se enredan para formar estructuras, que propician la fijación de las demás bacterias asociadas (Gorris *et al.*, 1989; Zellner *et al.*, 1994). Por ejemplo, *Methanosarcina* crece en cúmulos típicos de 4 ó más células, en ocasiones incluidos en los filamentos de *Methanosaeta* (Robinson *et al.*, 1984). Estos

arreglos dan como resultado la formación de gránulos y biopelículas. Estas estructuras se mantienen unidas debido a la secreción de sustancias exopoliméricas (EPS, "exopolimeric substances"), formadas principalmente por polisacáridos y proteínas, de naturaleza química compleja, que proveen una matriz en la cual los microorganismos estarán inmersos (Guiot, 1992).

De acuerdo con Henze y Harremoës (1983), en lodos granulares, se considera que de toda la biomasa existente, expresada como sólidos volátiles ( $\text{kg SSV/m}^3$ ), sólo el 50% está activa ya que el resto es material exopolimérico y también se encuentra material inerte atrapado. Se puede calcular que la velocidad de remoción de sustrato de lodos anaerobios es de  $1 \text{ kg DQO/kg SSV}$  que se traduciría en la máxima carga másica aplicable a estos sistemas. Dependiendo de los sustratos y del tipo de reactor se han reportado cargas de 3 a  $7 \text{ kg DQO/kg SSV}$  y en la mayoría de los casos se encuentra entre 0.5 y  $2.0 \text{ kg DQO/kg SSV}$ , pero se ha calculado que si toda la materia orgánica fuera biomasa biológicamente activa se podrían alcanzar cargas de 10 a  $15 \text{ kg DQO/kg SSV}$  (Henze y Harremoës, 1983; Viñas, 1994). Se ha demostrado que en digestores anaerobios las bacterias anaerobias estrictas constituyen la población dominante y que las metanógenas representan el 10% de la microflora total (García, 1990).

Se conoce que la capacidad de degradación en los sistemas biológicos depende de la concentración de biomasa presente. En algunos prototipos de reactores como los de biopelícula, en los que se desconoce la concentración de la biomasa se desconocen estos valores.

Las constantes cinéticas y de crecimiento típicas para cultivos anaerobios que se muestran en la siguiente Tabla, son los que se han utilizado para efectuar los cálculos anteriores.

**Tabla 1.3.** Constantes cinéticas de cultivos anaerobios mesofílicos, 35° C (tomado de Henze y Harremoës, 1983).

| Parámetro             | $\mu_{\max}$<br>Velocidad de crecimiento específico máximo (d <sup>-1</sup> ) | $Y_{\max}$<br>Coeficiente máximo de rendimiento (kg SSV/kg DQO) | $r_x = \frac{\mu_{\max}}{Y_{\max}}$<br>Máxima tasa de remoción de sustrato<br>kg DQO/kg SSV·d<br>biomasa activa |     | Ks<br>Constante de afinidad (kg DQO/m <sup>3</sup> ) |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------|
| Cultivo               |                                                                               |                                                                 | 100 %                                                                                                           | 50% |                                                      |
| Bacterias acidógenas  | 2.0                                                                           | 0.15                                                            | 13                                                                                                              | 7   | 0.2                                                  |
| Bacterias metanógenas | 0.4                                                                           | 0.03                                                            | 13                                                                                                              | 7   | 0.05                                                 |
| Cultivo combinado     | 0.4                                                                           | 0.18                                                            | 2                                                                                                               | 1   | -                                                    |

### 1.3.2. Las sustancias exopoliméricas y su composición

Los microorganismos que intervienen en los procesos de digestión anaerobia tienden a formar consorcios estructurados y estratificados, ya que sintetizan sustancias exopoliméricas (EPS), llamadas también glicocálix bacteriano que provee una matriz que mantiene a las células unidas entre sí o adheridas a una superficie. Se define como cualquier componente fuera de los elementos integrantes de la pared celular, formado de polisacáridos altamente hidratados y glicoproteínas globulares y se encuentra en la parte exterior de la membrana de las células Gram negativas y del peptidoglicano de las células Gram positivas.

Costerton *et al.* (1981) clasifican los glicocálices en dos tipos: (1) como capas en forma de S, compuestas de un arreglo regular de subunidades de glicoproteínas

localizado en la superficie celular, y (2) como cápsulas compuestas de una matriz fibrosa en la superficie celular, que puede variar en espesor y pueden ser descritas como:

- (a) cápsula rígida, muy estructurada, que excluye partículas ajenas a su composición y se tiñe con tinta de la India o negrosina;
- (b) flexible, que es bastante deformable y no excluye partículas;
- (c) integral, que esta íntimamente asociada a la superficie celular;
- (d) periférica, que permanece asociada con las células pero puede estar acomodada como un desecho en el espacio entre la pared y la membrana celular conocido como *menstruum*.

Las cápsulas pueden estar constituidas por homopolímeros simples o heteropolímeros complejos compuestos de una amplia variedad de monosacáridos tales como hexosas, 6-desoxihexosas, polioles, ácidos urónicos y aminoazúcares como los más importantes y el fosfato, formato, piruvato y succinato pueden estar presentes como sustituyentes. También se ha observado que las protuberancias celulares tales como los *pili* ó *spinae*, o fracciones de estos pueden formar parte del glicocáliz o estar inmersos en este.

La EPS vista al microscopio presenta varias formas: de cubierta delgada o goma periférica, grandes áreas de material fibroso rodeando a las células, matrices fibrosas no organizadas, estructuras tipo *fimbriae* o acumulación de material amorfo encogido entre las células.

Sin embargo, el análisis de la EPS por microscopía electrónica de barrido o de transmisión es difícil. Debido al alto grado de hidratación de las cadenas de polisacáridos, se tiene una fuerte condensación de las estructuras durante la preparación de muestras, por la deshidratación y la congelación requeridas, lo que resultará en estructuras deformadas e imágenes distorsionadas. También se ha reportado que las bacterias cultivadas *in vitro*, tienden a perder la capacidad de formarlo. Es decir, el glicocálix no ha podido observarse o estudiarse en la forma en que se encuentra en la naturaleza.

La relación del glicocálix con la pared celular es entonces particularmente importante. Se ha demostrado que los cationes bivalentes tienen un papel importante en la unión de las capas S de glicocálix a la pared celular, lo que puede constituir un mecanismo general de unión. Así como las interacciones de las estructuras terciarias de los polisacáridos que están en las moléculas lipopolisacáridicas con los polisacáridos del glicocálix (Costerton *et al.*, 1981).

La mayoría de los exopolisacáridos se producen a nivel de la membrana citoplasmática e involucran nucleótidos azucarados como precursores y acarreadores lipídicos poliprenólicos, en un proceso similar al de la síntesis de lipopolisacáridos.

Como una excepción, para los *cocci* Gram positivos la síntesis del glicocálix es diferente, ya que sus polimerasas exopolisacáridicas se localizan en la superficie celular o en el *menstruum*, debido a que los nucleótidos azucarados o los lípidos

acarreadores no están involucrados en la síntesis de los homopolímeros. Además requieren sacarosa y otros disacáridos como donadores de grupos glicosílicos.

La formación de los glicocálices está regulada por los factores fisiológicos que afectan la síntesis de sus componentes. La formación de la cápsula es favorecida generalmente por las relaciones C/N altas, mientras que la síntesis que depende de donadores extracelulares de grupos glicosílicos, depende de la concentración de disacáridos. También se ha demostrado que la concentración de iones afecta la síntesis de la cápsula, y las condiciones físicas tales como el crecimiento sobre sólidos o en líquidos influencia la cantidad y composición química de los hexopolisacáridos producidos.

Las bacterias metanógenas presentan una amplia diversidad en los constituyentes de sus envolturas celulares que se pueden agrupar en tres categorías: pseudomureína, glicoproteínas o capas de proteínas y heteropolisacáridos (Jones *et al.*, 1987).

En sistemas de tratamiento tanto anaerobios como aerobios, existen numerosos reportes y discrepancias en contenido y composición de las sustancias exopoliméricas de lodos. Urbain *et al.* (1993) y Schmidt y Ahring (1994) sugieren que tales discrepancias son debidas a que se han utilizado varios métodos de extracción tales como, desprendimiento con agitación, sonicación, calor, lavados con sosa, centrifugación. Urbain *et al.* (1993) extrajeron el exopolímero de varias muestras de lodos activados y encontraron más proteínas que DNA y que polisacáridos. Esto contradice los estudios de Sato y Ose (1980) que encontraron

más ácidos nucleicos que proteínas y polisacáridos y el de Horan y Eccles (1986) que encontraron más polisacáridos que ácidos nucleicos y proteínas.

En gránulos anaerobios se ha determinado que las sustancias exopoliméricas representa del 0.6 al 20% de los SSV (Shen *et al.*, 1993; Dolfing *et al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1990; Grotenhuis *et al.*, 1991; Guiot *et al.*, 1991) dependiendo del método de extracción, de los métodos de análisis y del tipo de lodo examinado.

En un estudio comparativo de composición de efluentes y temperatura de operación de reactores UASB, Schmidt y Ahring (1994) encontraron que las EPS de gránulos de reactores alimentados con sustratos simples metanogénicos o acetogénicos tales como acetato, propionato y butirato contenían cantidades menores de polisacáridos, que los reactores alimentados con aguas residuales complejas (e. g.: fábricas papeleras, de azúcar y de alimento para peces), en condiciones mesofílicas o termofílicas. Consecuentemente, la concentración de sustancias exopoliméricas era menor. Sin embargo, la concentración de proteínas y polisacáridos fue significativamente más alta en mesofilia que en termofilia, independientemente del sustrato, así como la concentración de sustancias exopoliméricas.

Por otro lado, Guiot (comunicación personal, 1993) considera que en biopelículas en general se encontraría alrededor de 62% de proteínas, 12% de carbohidratos y el resto de materiales tales como ADN, lípidos y minerales atrapados en la matriz exopolimérica.

### **1.3.3. La formación de biopelículas**

Ya que las bacterias en la naturaleza tienden a estar rodeadas de esta matriz polianiónica gruesa, altamente ordenada y continua, cuya composición variará con respecto a los sustratos disponibles presentes, debe esperarse una influencia profunda en el acceso de moléculas, iones y protones hacia la pared y la membrana citoplasmática.

Las bacterias quedan inmersas en esta matriz, donde desarrollan su metabolismo, se reproducen y mueren y las mantiene "pegadas" unas a otras en agrupaciones y/o consorcios, les confiere la propiedad de formar microcolonias autoadherentes o biopelículas y en general un crecimiento persistente en un nicho favorable. También es una forma de protección contra compuestos tóxicos (e.g. metales pesados) y agentes antibacterianos (e.g. surfactantes, bacteriocinas, bacteriófagos, anticuerpos, antibióticos, protozoarios y otras células fagocíticas).

Esta tendencia a formar agregados celulares ya sea en forma de gránulos o biopelículas, tanto en mesofilia como en termofilia, se presenta de forma natural en el momento en que se ponen en contacto con una superficie suficientemente rugosa y/o porosa que permita la adhesión.

Las superficies en ambientes acuosos naturales presentan una alta concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos, lo que promueve la adhesión bacteriana. Una vez que se han establecido en la superficie, las bacterias producen grandes cantidades de EPS, lo que posteriormente constituirá una especie de resina de

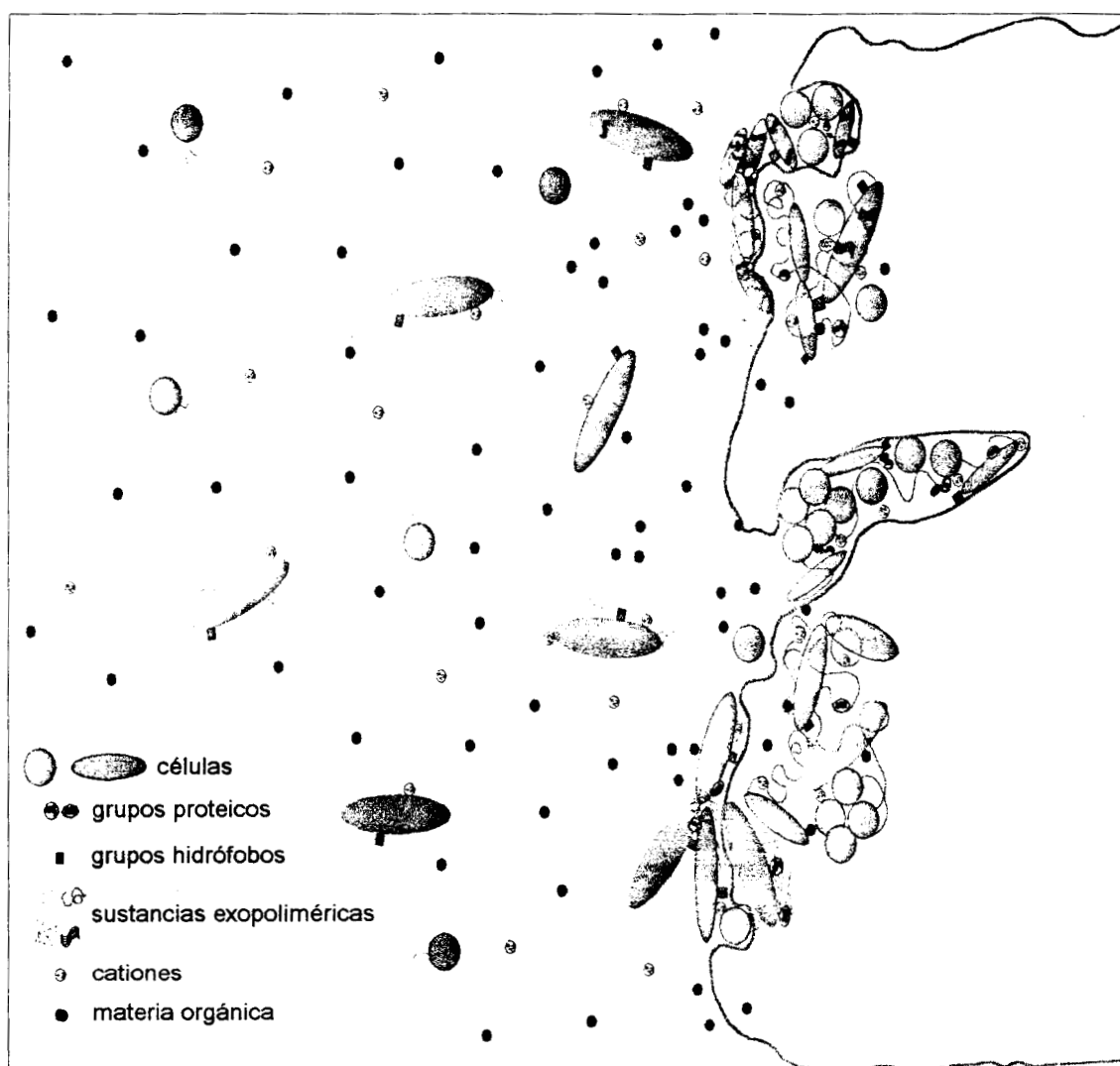
intercambio, de área superficial muy grande que concentrará los sustratos y nutrientes cerca de las células, al quedar adsorbidos en esta superficie.

La fijación bacteriana inicial a una superficie inerte, debe vencer las fuerzas electrostáticas de repulsión entre la superficie que actuará como soporte de la biopelícula y la célula bacteriana. Las grandes extensiones de la célula en forma de fibras de glicocálix, *pili* ó *spinae*, suficientemente largos para alcanzar la superficie exterior de la pared celular, pueden actuar como puente en el espacio entre la bacteria y la superficie y permitir que fuerzas de atracción tales como puentes de hidrógeno y formación de iones pareados inicien la adhesión.

La agregación de microorganismos requiere una tensión hidrodinámica o agitación mínima, para que las colisiones entre células den inicio a la agregación. Este proceso tiene bases fisicoquímicas y bioquímicas descritas ampliamente por Verrier *et al.* (1988), van Loosdrecht *et al.* (1990) y Guiot (1992). El desarrollo de biopelículas involucra varios pasos individuales distinguibles:

- (1) la adsorción de moléculas orgánicas a la superficie del soporte,
- (2) el transporte de células a la superficie,
- (3) la adhesión de las células a la superficie o unas a otras,
- (4) la producción de sustancias exopoliméricas para la formación de la matriz de la biopelícula,
- (5) la colonización y desarrollo de la biopelícula por crecimiento bacteriano y
- (6) la desunión de partículas de biopelícula causada por esfuerzos cortantes del fluido en el que están suspendidas.

Algunos de estos procesos se muestran en el siguiente esquema, en donde se propone la interacción de algunos compuestos tales como iones dibásicos, grupos hidrófobos, materia orgánica, proteínas y sustancias exopoliméricas, para mostrar así la complejidad del proceso de formación de biopelículas. Igualmente, se muestran algunas de las posibles estructuras que muestran las sustancias exopoliméricas, como se describió en 1.3.1.



**Figura 1.2.** Formación de biopelículas en un soporte inerte inmerso en una fase líquida, mostrando algunos de los pasos propuestos por Guiot (1992).

#### 1.3.4. Influencia del tipo de soporte

Para promover la adhesión de estos microorganismos, las características del soporte juegan un papel importante en la adhesión inicial, ya que para el establecimiento de una primera capa bacteriana se requiere que el soporte tenga poros o cavidades que provean zonas con poca agitación en las cuales las bacterias puedan fijarse inicialmente.

Igualmente, se deberá tomar en cuenta la composición química del soporte y la afinidad de las bacterias al mismo, como es el caso de las bacterias metanógenas. Ya que Verrier *et al.* (1988), observaron que presentan diferentes grados de afinidad por los tipos de materiales a los que pueden adherirse tales como politetrafluoroetileno (PTFE), polipropileno (PP), polietileno (PE), polivinil cloruro (PVC), poliacetal (PAC) y poliamida (PAM). En ese estudio se encontró que *Methanosarcina mazei* no se adhirió a ningún soporte debido a que forma aglomerados semiesféricos y a la naturaleza hidrofílica de los exopolímeros que excreta, por lo que la adhesión inicial de esta bacteria es debida a uniones electrostáticas. Contrariamente, *Methanothrix soehngenii* se adhiere preferentemente a superficies hidrofóbicas tales como PTFE, PP y PE y la unión inicial se dará por fuerzas hidrofóbicas. Debido a que este microorganismo forma filamentos de varios individuos, se ha encontrado que es la bacteria que inicialmente se fija a una superficie y que *Methanosarcina* generalmente esta atrapada en la red formada previamente por *Methanosaeta* (Henze y Harremoës,

1983; Robinson *et al.*, 1984; Verrier *et al.*, 1988; Heijnen *et al.*, 1989; Sánchez *et al.*, 1994).

### **1.3.5. Biopelícula y metabolismo**

La formación de biopelículas por bacterias anaerobias permite el acomodo o estratificación de acuerdo a sus necesidades de interdependencia en cuanto a la utilización de sustratos y producción de productos. De esta forma las bacterias acetoclásticas e hidrogenotrofas metanogénicas estarán cerca de las bacterias productoras de hidrógeno y de acetato (Guiot, 1992).

Las biopelículas presentan grandes áreas de transformación, con mayores concentraciones de biomasa activa por unidad de volumen de reactor, ya que se utilizan soportes porosos o con cavidades que además presentan una gran resistencia mecánica y a cambios en régimen hidráulico.

El crecimiento bacteriano en las biopelículas toma lugar a expensas de la energía producida durante la degradación de la materia orgánica. Shapiro y Switzenbaum (1984), demostraron que la velocidad de acumulación de biopelícula anaerobia se incrementa conforme aumenta la concentración de materia orgánica suministrada a los reactores. La remoción de los sustratos de la fase líquida se lleva a cabo inicialmente por la adsorción de estos a la superficie de la biopelícula, considerada como una reacción de primer orden. Posteriormente se tiene la difusión de los reactivos al interior de la biopelícula para ser aprovechados por los

microorganismos y también el flujo difusivo a través de la biopelícula de los productos del metabolismo hacia el exterior.

Es decir, después de la solubilización se tienen sustratos que se pueden difundir en la biopelícula donde el siguiente paso en la secuencia de degradación, es la producción de ácido acético que será reducido en la fase metanogénica a metano. Cuando la concentración de metano es baja, el transporte hacia afuera de la biopelícula será por difusión, para lo cual debe existir un gradiente y una acumulación de gas. Si el líquido alrededor está supersaturado entonces el metano se desalojará en forma de burbujas (Henze y Harremoës, 1983; Kitsos *et al.*, 1992).

Se han propuesto varios modelos matemáticos para la explicación de este proceso, que distinguen entre la fase acidogénica y la fase metanogénica del proceso de digestión anaerobia, con sus respectivas constantes cinéticas. Se considera que estos procesos obedecen a la Ley de Fick, debido a lo delgado de las biopelículas, que ofrecerán poca resistencia a la difusión.

La profundidad a la que el sustrato penetra la película depende de la velocidad de flujo de la fase líquida, la concentración de sustrato, los coeficientes difusivos de reactivos y productos y la velocidad de utilización del sustrato por la biomasa.

Las transformaciones corresponden a reacciones de orden cero, de primer orden o de tipo Monod, pudiendo distinguir en todos los casos entre la fase acidogénica y la metanogénica porque los sustratos y productos de cada fase son diferentes así como los parámetros cinéticos (Henze y Harremoës, 1983). Kitsos *et al.* (1992)

encontraron que la velocidad de consumo de acetato era lineal con respecto al espesor de biopelículas en formación de hasta 800  $\mu\text{m}$ .

### **1.3.6. Estabilidad de las biopelículas**

Las biopelículas son sistemas sumamente frágiles, ya que aún después de la inmovilización irreversible de células o bioinmovilización, se puede tener pérdida por desprendimiento masivo o por erosión.

La erosión por esfuerzos cortantes hará que se desprendan pequeñas fracciones de biopelícula y en este caso, el espesor de la biopelícula del soporte estará controlado por el mecanismo de regeneración de los microorganismos y por el tamaño y densidad del soporte inerte en combinación con la velocidad superficial del fluido. Es decir, estaría controlada por el equilibrio que existe entre la velocidad de reproducción de la biomasa y la velocidad de desprendimiento por los esfuerzos cortantes debidos al flujo del fluido (Henze y Harremoës, 1983; Nikolov y Karamanev, 1987; Guiot, 1992).

El desprendimiento masivo es la pérdida de grandes fracciones de biopelícula y la consecuencia es un cambio de espesor, daño y debilitamiento de la estructura de la matriz de la biopelícula, así como una variación en la cantidad de sólidos retenidos en el soporte y de la actividad específica del sistema. Este tipo de desprendimiento se ha relacionado con una gran producción de gas, cambios de presión osmótica, cambios de pH, presencia permanente de tóxicos y depredación celular, entre otros.

### 1.3.7. Inmovilización de bacterias anaerobias

Stronach *et al.* (1987) comprobaron que en mesofilia, la adición de polímeros sintéticos flocculantes, puede mejorar la retención de biomasa durante la inmovilización, pero aparentemente interfiere en el proceso de evolución de una población bien adaptada, estable y con buena actividad metanogénica.

Gorris *et al.* (1989) encontraron que la formación de biopelículas anaerobias mesófilas sobre arena en un lecho fluidificado y la composición de las mismas, es independiente del tipo de inóculo utilizado y en la composición bacteriana de la biopelícula predomina *Methanothrix* con un 72% de la biomasa total, en menor grado *Methanosarcina* y *Methanobacterium* en un 10%.

En reactores mesofilicos cuyo soporte fue arena y sobre la que se inmovilizaron cepas puras de bacterias fermentativas y metanogénicas, existe evidencia de que *Methanosarcina barkerii* se adhirió a la biopelícula después de que ésta estuvo formada por *Clostridium amalonaticus* y *Pseudomona aeruginosa*, indicando probablemente que estas bacterias en cultivo puro no tienen la capacidad de inmovilizarse por la pérdida de la producción de EPS de los cultivos *in vitro* mencionada anteriormente (Meier-Schneiders *et al.*, 1993).

Como antecedente de inmovilización de bacterias anaerobias en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) se tiene un solo trabajo en el que se ha comprobado experimentalmente por González *et al.* (1992), que el polietileno de baja densidad molido hasta fracciones de tamaño pequeño (0.25 a 0.6 mm) puede ser colonizado fácilmente y es un soporte inerte para este proceso.

La inmovilización en este material se llevó a cabo utilizando un reactor de lecho fluidificado inverso en el cual se manejaron bajas velocidades verticales de flujo (2 m/h) y se obtuvo una colonización importante de bacterias acidogénicas, acetoclásticas y metanogénicas, en condiciones mesofílicas, con las actividades tróficas inherentes a estas.

#### **1.4. Los Sistemas de Tratamiento con Biomasa Inmovilizada**

##### **1.4.1. Generalidades, prototipos y soportes**

Las biopelículas inmovilizadas en soportes inertes se manejan en una amplia variedad de configuraciones de reactores tales como los de filtro anaerobio, discos rotatorios y lechos fluidificados (Henze y Harremoës, 1983).

En estos sistemas de tratamiento, los soportes que se han utilizado son: piedra, grava, arena, sepiolita, carbón activado, Biolite®, anillos y esferas de cerámica y vidrio sinterizado y poroso, tubos plásticos y corrugados (Floccor R®), formas especiales de plástico (Hyflow® y Bioeco®), paneles modulares y tubulares de plástico (Bionet®), mallas de acero o de plástico, poliuretano reticulado (PUR®), polietileno, PVC y Teflón®, estos últimos sólo en sistemas experimentales.

Con los sistemas de crecimiento inmovilizado es posible obtener tiempos de retención celular mayores a 15 días, por lo que estos reactores se pueden operar con tiempos de retención hidráulica cortos.

En el tratamiento de aguas residuales tóxicas, estos sistemas ofrecen ventajas en comparación con los sistemas de crecimiento suspendido. Para sistemas de toxicidad crónica, la capacidad de retención de biomasa en sistemas inmovilizados permite la aclimatación al sustrato tóxico antes de que la toxicidad dé lugar al lavado de la biomasa activa. Para sistemas con toxicidad transiente, los sistemas con carga hidráulica alta proporcionan la elución rápida de los tóxicos, debido a la reducción drástica de los tiempos de retención (Guiot, 1992).

La mayor ventaja del tratamiento anaerobio, que es la baja generación de biomasa, es una desventaja en estos sistemas, ya que en general, los reactores de biopelícula requieren tiempos de arranque típicos de 1 a 2 meses y al menos 4 a 6 meses para alcanzar una operación estable a altas cargas orgánicas (Henze y Harremoës, 1983; Gorris *et al.*, 1989; Heijnen *et al.*, 1989; Zellner *et al.*, 1994).

## **1.5. El Lecho Fluidificado**

### **1.5.1. Antecedentes**

El reactor de lecho fluidificado (RLF) para tratamiento de aguas residuales, es un prototipo que se ha utilizado recientemente debido a las ventajas que presenta sobre otros sistemas. Antes de 1984, solamente se encontraban a nivel laboratorio o piloto y después de esta fecha se empezaron a utilizar a escala industrial (Heijnen *et al.*, 1989). Desde entonces y hasta 1990 se tenían operando 65 reactores comerciales

con soporte en Estados Unidos y Europa. En Estados Unidos, la primera patente concedida a un lecho fluidificado con soporte, se asignó en 1974 a Ecolotrol Inc. para la desnitrificación de aguas residuales (Sutton y Mishra, 1991). Cabe señalar que los lechos fluidificados anaerobios, también se han utilizado extensamente desde entonces para la remoción de nitrógeno de aguas residuales municipales con fines de abastecimiento.

Una de las compañías más interesadas en los lechos fluidificados para el tratamiento de desechos ha sido General Motor Corporation, particularmente en el sistema OXITRON® desarrollado por Dorr-Oliver Inc., para la remoción de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) provenientes de la pintura automotriz de las plantas de ensamblado, así como de las aguas residuales de plantas metalúrgicas. Finalmente, el uso se ha extendido desde la remoción de amonio de plantas empacadoras de pescado, tratamiento de residuales de cerveceras y de aguas negras, al tratamiento de residuales que contienen compuestos orgánicos complejos provenientes de la industria metalúrgica, química y petroquímica (Sutton y Mishra, 1991).

Los soportes utilizados han sido arena, arcilla, perlas de vidrio poroso, tierra de diatomeas, además de soportes más ligeros como el poliuretano (PUR®) y el Biolite® (la densidad aparente de éstos se encuentra entre 1.1 y 1.2 kg/m<sup>3</sup>), que se han diseñado específicamente para estos sistemas con el objeto de reducir los gastos de fluidificación. También se han utilizado resinas de intercambio iónico y carbón activado granular como soportes activados para mejorar los procesos de remoción

de contaminantes. Los menos apropiados han sido probablemente el carbón y la arena, debido a que son los más pesados (Speece, 1996) y de ahí la necesidad de diseñar soportes más ligeros.

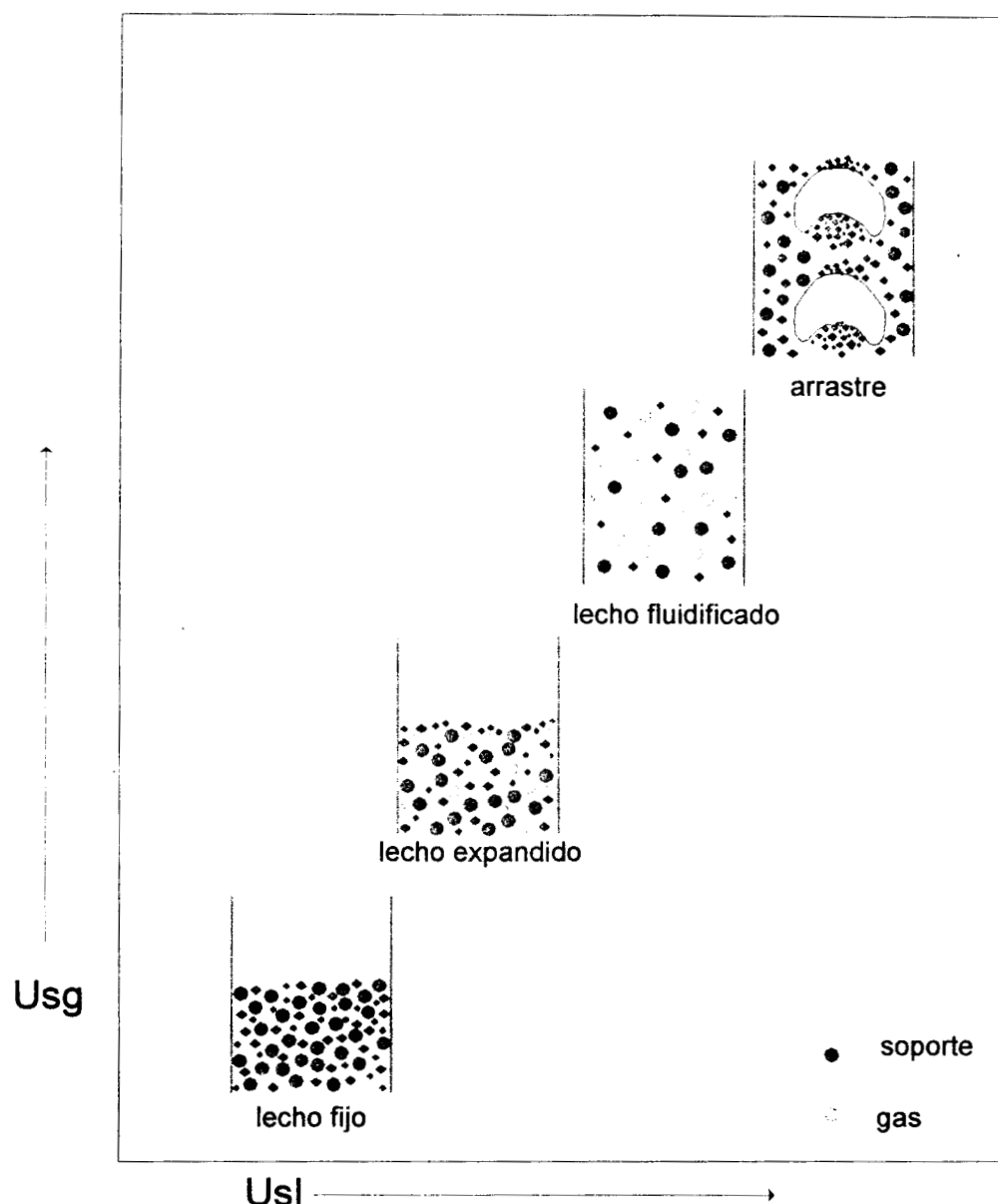
### **1.5.2. La hidrodinámica de los reactores de lecho fluidificado**

Estos sistemas consisten de reactores de dos y tres fases (sólido-líquido, sólido-gas y líquido-sólido-gas), en las que el lecho de partículas de soporte se expande con una corriente de líquido y/o de gas, de tal forma que las partículas siempre se encuentran suspendidas y no tienen una posición fija en el lecho, pero se mueven fácilmente en los alrededores y cada una tiende a permanecer localizada dentro de un pequeño volumen de la cama (Henze y Harremoës, 1983 y Kunii y Levenspiel, 1991).

La aplicación de gas a los lechos fluidificados en ambas configuraciones, sirve para aumentar la turbulencia y el mezclado pero también para disminuir la densidad del lecho, con lo que el gasto de fluidificación se disminuye (Fan *et al.*, 1982; Muroyama y Fan, 1985). En estos sistemas se requiere de separadores trifásicos para separar el líquido del soporte y del gas (Sutton y Mishra, 1991 y Holst *et al.*, 1997).

El flujo del líquido puede ser ascendente, que es la fluidificación tradicional en la que se usan soportes más pesados que el agua, por lo que se requerirán altas velocidades de líquido y de gas para alcanzar la fluidificación.

Cuando las velocidades de gas y de líquido aplicadas son bajas, se obtiene un lecho fijo, si estas aumentan se obtendrá un lecho expandido y posteriormente un lecho fluidificado, como se muestra en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Regímenes de expansión en la fluidificación ascendente en sistemas trifásicos en donde la magnitud de la velocidad superficial del gas ( $U_{sg}$ ) y del líquido ( $U_{sl}$ ) definen el tipo de régimen de fluidificación.

En este caso se alcanzan las condiciones de fluidificación particulada y el lecho se expande suavemente sin la turbulencia conocida como fluidificación agregativa o de arrastre, que se presenta cuando las burbujas grandes de gas arrastran una estela de partículas de tamaño pequeño que salen del lecho (Muroyama y Fan, 1985). Este régimen se debe principalmente a una alta velocidad de gas y de líquido, representada en la Figura 1.3 en el extremo superior derecho.

Contrariamente, en la fluidificación inversa, se obtienen dos modos de operación variando la cantidad de líquido en la columna. Una es la fluidificación con el líquido como fase continua en donde la corriente de líquido es descendente, ya que los soportes utilizados son más ligeros que el líquido, como el poliestireno, el polipropileno, el polietileno (la densidad aparente de estos soportes varía de 75 a 930 kg/m<sup>3</sup>) y flotan. Las partículas están suspendidas o flotando en el líquido y el control del nivel del líquido se hace en la parte superior del reactor.

La segunda es donde la fase continua es el gas, en donde las partículas son irrigadas por el líquido desde la parte superior del reactor y el gas fluye desde la parte inferior entre los espacios vacíos de las partículas que permanecen prácticamente inmóviles, es decir, se mantienen suspendidas por la corriente gaseosa. En este caso el nivel de líquido se controla en la parte inferior del sistema (Fan *et al.*, 1982).

La baja densidad de los soportes utilizados en este prototipo facilitan la fluidificación, porque las velocidades de flujo a que son operados estos reactores son menores, lo

cual, eliminaría el alto costo usual de los equipos de bombeo en el caso de reactores industriales (Fan *et al.*, 1982; Karamanev y Nikolov, 1992 y Krishnaia *et al.*, 1993).

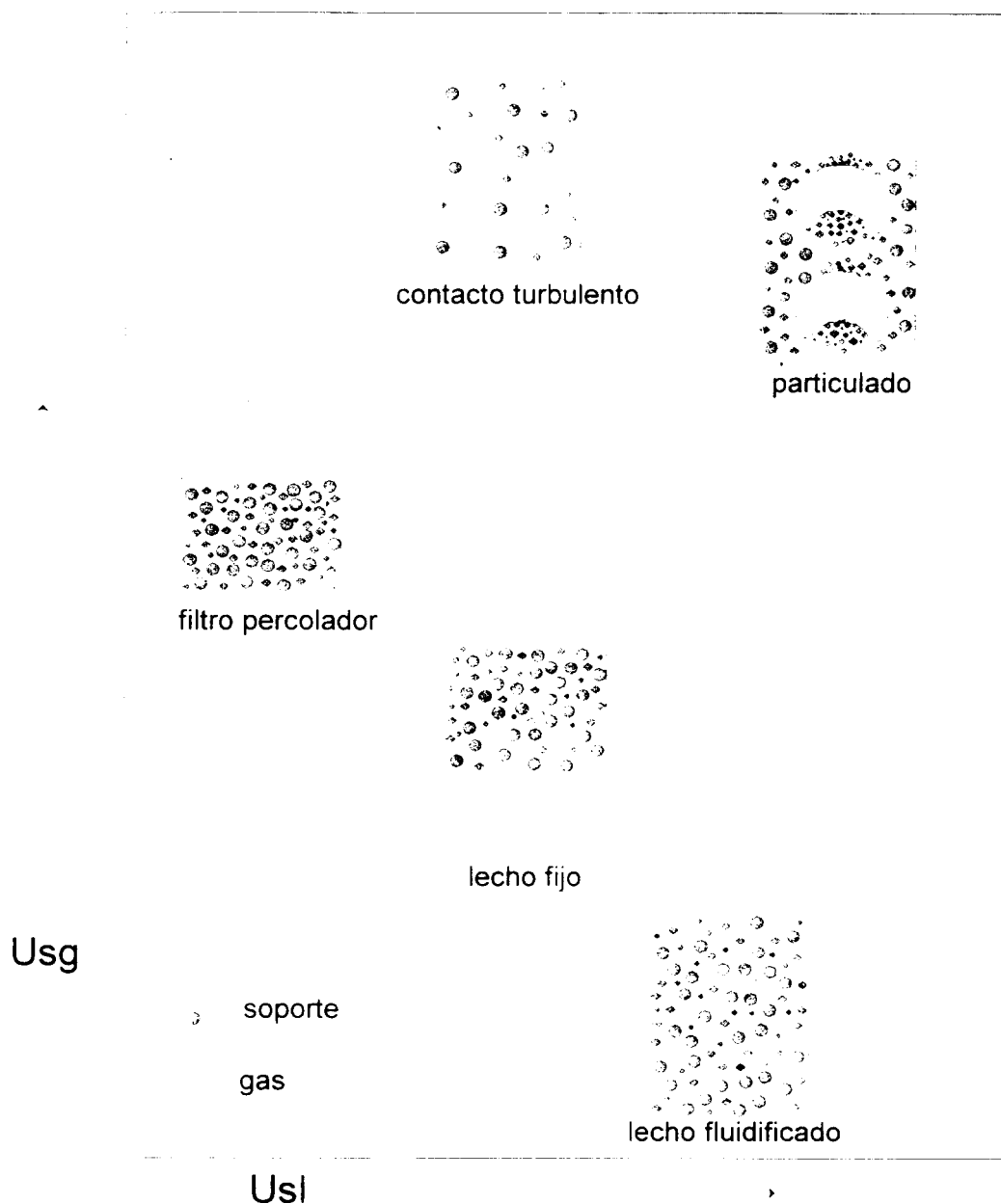
En la Figura 1.4. se muestra diagramáticamente la fluidificación en lechos inversos. En esta Figura se muestran ambos regímenes de fluidificación: uno cuando la fase continua es el gas (extremo superior izquierdo) y cuando la fase continua es el líquido (extremo inferior derecho).

En el primero, con bajas velocidades se obtiene un sistema semejante a un filtro percolador. El gas fluye solamente por los espacios libres entre las partículas y el líquido resbala sobre la superficie de estas. Lo mismo sucede con el contacto turbulento que corresponde a un tipo de fluidificación y que se presenta cuando se aplica mayor velocidad de gas y líquido a la cama.

Cuando la fase continua es el líquido, los regímenes de expansión son diferentes. Aplicando velocidades altas de líquido y de gas, se obtiene el desplazamiento de las partículas del lecho o lo que se conoce como transporte particulado (Fan *et al.*, 1982), que se presenta en función de la densidad de los soportes utilizados.

Con altas velocidades de líquido pero bajas velocidades de gas se alcanza la fluidificación, debido a que como se mencionó anteriormente, el gas disminuye la densidad del lecho y solamente se requiere una corriente suave de líquido para llevar el sistema a estas condiciones.

Cabe mencionar que Fan *et al.* (1982) reportan que existe una transición entre los regímenes debido a la transición entre las fases continuas.



**Figura 1.4.** Regímenes de expansión en lechos fluidificados de flujo descendente en sistemas trifásicos (adaptado de Fan *et al.*, 1982).

Sin embargo, en la fluidificación descendente se ha reportado que existen problemas de retención de gas dentro del reactor debido al régimen de fluidificación. Las burbujas al ser menos densas que el líquido y que el soporte, tienden a subir

y aumentar de tamaño durante la ascensión, coalescen en burbujas más grandes que tienen una fuerza de flotación mayor. En la fluidificación descendente, las burbujas de tamaño pequeño tardan más tiempo en alcanzar tamaños suficientemente grandes debido al flux descendente del líquido y permanecen más tiempo en el lecho, disminuyendo efectivamente la densidad del mismo pues forman una dispersión con el líquido, pero lo expanden en exceso y evacuan las partículas de soporte reactivo (Fan *et al.*, 1982; Karamanev y Nikolov, 1992 y Krishnaia *et al.*, 1993). En este caso la fracción de burbujas atrapadas o la fracción ocupada en el lecho por el gas,  $\varepsilon_g$ , no se ve afectada con un aumento de la velocidad superficial del líquido,  $U_{sl}$  (Fan *et al.*, 1982).

En el análisis hidrodinámico de lechos fluidificados se requiere el conocimiento de varios parámetros que determinarán las características hidrodinámicas del lecho. En este caso se utiliza la ecuación de Ergun para predecir, a partir de valores experimentales de caída de presión con respecto a velocidades superficiales del líquido, la velocidad mínima de fluidificación,  $U_{mf}$ , y los valores de fracción de espacios vacíos que ocupan cada una de las fases involucradas, tales como el líquido,  $\varepsilon_l$ , el gas,  $\varepsilon_g$  y las partículas  $\varepsilon_{p,mf}$ . La  $U_{mf}$ , físicamente es la fluidificación sin arrastre de partículas y la  $\varepsilon_{p,mf}$  el grado de expansión del lecho en esta condición (Muroyama y Fan, 1985; Kunii y Levenspiel, 1991).

La ecuación de Ergun representa físicamente un balance de fuerzas, ya que se basa en la suposición de que la fuerza de arrastre del líquido que se mueve a una velocidad superficial mínima de fluidificación es igual al peso de las partículas en el lecho durante la fluidificación ascendente, o a la fuerza de flotación que ofrecen durante la fluidificación descendente,

$$\begin{array}{l} \text{[Fuerza de arrastre ejercida} \\ \text{sobre las partículas} \\ \text{por el líquido o el gas]} \end{array} \approx \begin{array}{l} \text{[Peso de las partículas} \\ \text{o la fuerza de flotación} \\ \text{ejercida]} \end{array}$$

$$\frac{1.75}{\varepsilon_{p,mf}^3 \cdot \phi_s} (Re)_{mf}^2 + \frac{150 (1 - \varepsilon_{p,mf})}{\varepsilon_{p,mf}^3 \cdot \phi_s^2} (Re)_{mf} = \frac{d_p^3 \rho_s (\rho_l - \rho_s) g}{\mu^2} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

donde el grupo de la derecha es conocido como el número de Arquímedes, aunque algunos autores lo refieren como el número de Galileo (Kunii y Levenspiel, 1991).

La función de arrastre,  $f$ , esta definida como

$$f = \frac{3 \cdot Ar}{Re} \quad \text{para } 2 < Re < 500 \quad (\text{Ec. 1.6})$$

por lo que representa una relación entre el peso de las partículas (fluidificación ascendente) o la fuerza de flotación de las mismas (fluidificación descendente) y la energía cinemática del líquido.

Considerando el balance anterior, las condiciones mínimas de fluidificación quedan expresadas como,

$$\frac{\Delta P}{H_0} = (\rho_s - \rho_l)(1 - \varepsilon) \quad (\text{Ec. 1.7})$$

en donde la caída de presión en el lecho es igual al peso de las partículas.

Cuando el líquido es la fase continua y la densidad de la partícula,  $\rho_s$ , es menor que la del líquido,  $\rho_l$ , la fluidificación se obtiene por el flujo del líquido en contra de la fuerza de flotación neta de las partículas (Fan *et al.*, 1982; Muroyama y Fan, 1985; Kunii y Levenspiel, 1991; Karamanev y Nikolov, 1992). En este caso, que es el del reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI), la fuerza aplicada por el peso de las partículas se reemplaza por la fuerza de flotación,

$$\frac{\Delta P}{H_0} = (\rho_l - \rho_s)(1 - \varepsilon) \quad (\text{Ec. 1.8})$$

En el estudio de la hidrodinámica de lechos fluidificados se utilizan tres grupos de correlaciones para precisar la bondad de la predicción de la  $U_{mf}$ . Las que relacionan la expansión del lecho,  $\varepsilon_p$ , con respecto a las velocidades superficiales,  $U_{sl}$ , como la de Zaki y Richardson, que es la más popular por ser la más simple (Fan *et al.*, 1982; Muroyama y Fan, 1985).

Las que relacionan la expansión del lecho,  $\varepsilon_p$ , con el coeficiente de arrastre,  $f$ , el Número de Arquímedes y el Número de Reynolds como los modelos de Ramammurthy-Subbaraju y de Riba-Couderc (Fan *et al.*, 1982; Muroyama y Fan, 1985).

Y las que relacionan la altura de la cama expandida con las variables de operación del sistema tales como el diámetro de partícula  $d_p$ , la densidad de las partículas,  $\rho_s$ ,

la densidad del líquido,  $\rho_p$ , y la velocidad del líquido,  $U_{sl}$  como la de Wen y Yu (Fan *et al.*, 1982; Karamanev y Nikolov, 1992).

En el análisis del RLFI, Fan *et al.*, (1982) concluyen que los datos experimentales en un sistema sólido-líquido-gas, no pueden ser representados satisfactoriamente por las correlaciones disponibles que relacionan  $\varepsilon_p$  y  $U_{sl}$  y por la ecuación del coeficiente de la función de arrastre, más que con una varianza del 15%. Para las demás correlaciones la varianza es de 25%. Es decir, el mejor ajuste se obtiene con la correlación de Zaki y Richardson.

En cuanto a estudios de hidrodinámica en RLFI se tienen tres solamente. El primer planteamiento fue hecho por Fan *et al.* (1982), en el que se estudió el régimen hidrodinámico en sistemas sólido-líquido y sólido-líquido-gas para esferas de polietileno y polipropileno con diámetros de 4.76 a 10.1 mm, densidades aparentes de 388 a 930 kg/m<sup>3</sup> y una L/D del reactor de 35. Plantearon las correlaciones que mejor describían el sistema, que son las de Zaki y Richardson, modificadas por estos autores, así como un "mapa" de las diferentes etapas de expansión que se tienen en el lecho durante la fluidificación, que se mostró en la Figura 1.4. Las velocidades de fluidificación que encontraron estuvieron entre 5.5 y 6.4 m/h con velocidades de gas que variaron en la misma magnitud.

Posteriormente, Karamanev y Nikolov (1992) caracterizaron hidrodinámicamente el sistema sólido-líquido-gas para esferas de espuma de poliestireno con diámetros de 1.31 a 7.24 mm y densidades aparentes de 75 a 854 kg/m<sup>3</sup> y una L/D del reactor de

16. Las conclusiones a las que llegaron después de la aplicación de correlaciones fueron similares a las de Fan *et al.* (1982), las velocidades de fluidización que encontraron variaron de 2.3 a 3.0 m/h.

Krishnaiah *et al.* (1993) en un reactor de tres fases con L/D de 23 y esferas plásticas de 12.5 y 19.9 mm de diámetro y densidad aparente de 135 a 248 kg/m<sup>3</sup>, propusieron una correlación que describe la velocidad mínima del líquido en la fluidización que relaciona el coeficiente de arrastre,  $f$ , el Número de Arquímedes y el Número de Reynolds y que correlaciona los datos experimentales y los obtenidos de la simulación en forma lineal. Las velocidades mínimas de fluidización encontradas fueron de 2.1 a 2.2 con una velocidad de gas de 33.7 a 56.1 m/h.

García-Calderón *et al.* (1997), encontraron que la velocidad mínima de fluidización para un reactor con partículas de perlita molida con un diámetro de 0.968 mm y densidad de 213 kg/m<sup>3</sup>, era de 2.3 m/h y las velocidades superficiales medidas correspondieron al modelo de Zaki y Richardson.

Cabe mencionar que en todos los casos señalados anteriormente, las bajas velocidades de fluidificación obtenidas son debidas también a la aplicación de un gas para disminuir la densidad del lecho, excepto en el caso de García-Calderón *et al.* (1997), en donde las partículas inmovilizadas producen el gas en el lecho mismo.

Como se mencionó anteriormente, el RLFI, presenta problemas de retención de gas y se tiene la siguiente correlación obtenida por Fan *et al.* (1982), que predice la fracción de gas atrapado en el lecho,  $\varepsilon_g = 0.322 \varepsilon^{1.35} (U_{sg} / U_{sl})^{0.18}$ .

Este tema, es de interés ya que se tienen algunos estudios recientes en reactores fluidificados anaerobios con biopelícula activa, uno de ellos llevado a cabo por Setiadi (1995), en un reactor con un diámetro menor a 5 cm, utilizando como soporte arena y alimentando con agua residual sintética. Encontró una correlación para la expansión del lecho que relaciona el Número de Reynolds y el Número de Galileo de manera exponencial, o sea,  $\varepsilon_p = 1.72 \text{ Re}^{0.203} \text{ Ga}^{-0.179}$ , la cual predice este parámetro con exactitud.

Otro estudio similar que predice la retención de cada fase en el reactor es el de Yu y Rittmann (1997) en el que utilizan correlaciones ya conocidas. Concluyen que la presencia de biopelícula en el soporte afecta el valor del factor de arrastre y obtienen una correlación para expresar este fenómeno. En este mismo sentido se tiene el estudio hecho por García-Calderón *et al.* (1997) en el que encuentran que para partículas con densidad de 213 kg/m<sup>3</sup>, la velocidad terminal de las partículas,  $U_t$ , disminuye de 65 m/h para partículas sin biopelícula a 27 m/h para partículas que han acumulado 72  $\mu\text{m}$  de biopelícula, factor que influye en la expansión de lechos inversos, ya que la velocidad terminal de partículas menos densas que el agua es debida a la fuerza de flotación.

### **1.5.3. Arranque y operación de lechos fluidificados**

En general, durante el arranque de RLF se inoculan con lodos de alta actividad metanogénica y contenido de sólidos volátiles. La inoculación se hace adicionando

30 a 60% en volumen y el reactor se cierra durante varios días o semanas, para permitir que las bacterias inoculadas estén en contacto con el soporte el mayor tiempo posible. Otra estrategia es inocular el reactor continuamente con sobrenadante de digestores anaerobios junto con el agua residual a tratar y aparentemente los tiempos de arranque disminuyen, pero para reactores de gran escala no es práctico por los grandes volúmenes de sobrenadante requeridos (Heijnen *et al.*, 1989).

Las dimensiones clásicas de los RLF o la relación L/D, varía de 20 a 30 veces, para evitar el arrastre de partículas fuera de la zona de fluidificación, es decir, la longitud del reactor contempla una zona de "desenganche" de partículas. Esta se caracteriza actualmente por un ensanchamiento en el diámetro de la columna, que permite que las partículas disminuyan su velocidad terminal y regresen al lecho, lo que ha permitido reducir esta relación, economizando en la inversión de la construcción, así como el uso de soportes menos pesados.

La expansión del lecho esta controlada por la velocidad vertical del fluido y para lechos fluidificados se considera que debe de estar entre 30 a 50%, pero puede alcanzar hasta un 100%. Ya que en lechos fluidificados se utilizan tiempos de retención cortos, la expansión del lecho se obtendrá con una alta tasa de recirculación, que permitirá el uso de velocidades superficiales de líquido de 10 a 30 m/h en lechos ascendentes. La velocidad de sedimentación de las partículas

utilizadas como soporte en este caso, que puede ser de 150 a 300 m/h, influye también en la magnitud de las velocidades necesarias para la expansión.

En el caso de los lechos descendentes, las velocidades pueden variar de 2 a 12 m/h y en la literatura no está reportado el valor de la fuerza de flotación de muchos de los soportes utilizados.

Existe amplia información respecto a los lechos fluidificados de flujo ascendente, pues son prototipos que se han utilizado desde la década de los setenta. Estos reactores permiten la acumulación de una gran cantidad de biomasa en el soporte, de cerca de  $40 \text{ kg/m}^3$ , debido a que las partículas utilizadas tienen diámetros típicos de 0.2 a 0.8 mm, lo que representa grandes superficies para la adhesión, con  $2000 \text{ m}^2/\text{m}^3$  en promedio pero que puede alcanzar hasta  $8000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . El espesor de las biopelículas varía de 60 a 200  $\mu\text{m}$  para soportes entre 0.3 y 0.5 mm y con remoción de carga orgánica de  $40 \text{ kg/m}^3\cdot\text{d}$ . Las biopelículas son más compactas cuando los tiempos de retención se encuentran entre 4 y 40 horas. Pero en general, se ha reportado que a mayores cargas orgánicas, más gruesa es la biopelícula (Shapiro y Switzenbaum, 1984). También se considera que las altas velocidades superficiales del líquido y el gas aplicado producen suficientes esfuerzos cortantes como para controlar el espesor de la biopelícula, pero si la fricción dinámica entre partículas no es suficiente, eventualmente la biopelícula crece y cambia la densidad del soporte. En reactores ascendentes en los cuales se ha tenido un crecimiento excesivo, el diámetro efectivo de las partículas se incrementa y la densidad se reduce, lo cual

resulta en una expansión del lecho mayor que la debida a la fluidificación y las partículas pueden ser transportadas fuera del reactor, por lo que se requieren medios mecánicos para controlar el espesor de la biopelícula.

Se han utilizado una serie de sistemas para separar la biopelícula del soporte. Sutton y Mishra (1991) reportan que todos los sistemas comerciales conocidos utilizan una bomba en la cual se lleva a cabo esta separación. También se utilizan mallas gravitacionales con barras en forma de cuñas con un sistema de lavado por aspersión, así como separadores hidráulicos internos solos o acoplados con ciclones externos.

Debido a esto y a las relaciones L/D que se usan, se pueden alcanzar capacidades de tratamiento más altas que en otros reactores, desde 20 a 100 kg DQO/m<sup>3</sup>·d en equipos muy compactos (Henze y Harremoës, 1983; Heijnen *et al.*, 1989; Ehlinger, 1994 y Holst *et al.*, 1997).

Los perfiles de aplicación de carga que se han utilizado durante el arranque para estos reactores son dos: el primero conocido como el perfil de máxima eficiencia en el que se aplica una carga orgánica baja de 1 kg/m<sup>3</sup>·d y una carga másica de 0.1 kg DQO/kg SSV·d con un tiempo de residencia de 1 día. La carga se duplica cuando se ha alcanzado la máxima eficiencia. La segunda estrategia es conocida como el máximo perfil de carga en el que se aplican altas cargas orgánicas, considerando la carga másica que el reactor puede tolerar, con un tiempo de retención de 1 día. La carga se aumenta nuevamente aún cuando el nivel de remoción sea bajo (de 1500 a

2000 mg/L de ácidos grasos en el efluente). En este caso se adiciona álcali para controlar la acidificación del reactor por sobrecarga, por lo que este tipo de arranque es más costoso.

En el caso de reactores de 2 etapas se tiene que las cargas se elevan hasta obtener una acidificación completa de la primera etapa y se han reportado de hasta 100 kg/m<sup>3</sup>·d (Heijnen *et al.*, 1989).

#### **1.5.4. Ventajas y desventajas de los lechos fluidificados**

La principal ventaja que presenta el concepto de lecho fluidificado biológico es la reducción en el tamaño del reactor debido a la alta eficiencia volumétrica asociada con el desarrollo de una alta concentración de biomasa en el soporte (Sutton y Mishra, 1991). También presentan algunas otras ventajas con respecto a los reactores convencionales de biomasa suspendida tales como:

- (1) los esfuerzos altos debidos a la fluidificación por fricción con el líquido o fricción dinámica entre partículas, seleccionan biopelículas compactas y delgadas. En el caso de reactores anaerobios las biopelículas estarán dominadas por bacterias metanógenas debido a la acidogenia preferencial en las capas periféricas;
- (2) tienen alta capacidad de depuración;
- (3) mejoran el mezclado de líquidos y la turbulencia alrededor de las partículas facilita la difusión del sustrato en la biopelícula;

(4) altas concentraciones instantáneas de tóxicos en el influente no causan efectos tan fuertes sobre la biopelícula debido al régimen de mezclado;

(5) la fluidificación lava fácilmente todas las partículas sólidas inertes finas,

(6) no hay retención de sólidos suspendidos y por consiguiente no existen problemas de taponamiento (Henze y Harremoës, 1983, Heijnen *et al.*, 1989 y Guiot, 1992).

La falta de retención de sólidos tiene como consecuencia también la falta de remoción de sólidos suspendidos, debido a los cortos tiempos de retención utilizados, que impiden que la materia particulada del agua se adsorba a la superficie de la biopelícula para ser degradada en moléculas lo suficientemente pequeñas como para difundirse en ella. Por lo que es necesaria la eliminación de sólidos del efluente para obtener agua de mejor calidad (Ehlinger, 1994 y Holst *et al.*, 1997 ).

Algunos problemas que presentan los lechos fluidificados están relacionados al arranque de los reactores, debido a que la formación de la biopelícula es un proceso lento, como se mencionó anteriormente. También influye el alto consumo de energía debido a las altas tasas de recirculación utilizadas para expandir el lecho.

Con respecto a los aditamentos mecánicos críticos que aumentan el valor de la inversión en estos sistemas se tienen los distribuidores de líquido para obtener una fluidificación uniforme en reactores a escala industrial, los cuales son costosos y no funcionan totalmente, ya que presentan problemas de taponamiento con partículas presentes en la corriente de entrada o por el asentamiento de partículas de soporte en el difusor, en el caso de soportes más densos que el agua.

Los distribuidores deben tener tres características importantes: mantener una distribución uniforme de flujo en el sistema, prevenir el taponamiento de los orificios debido a cuerpos extraños del influente o por el soporte y mantener condiciones de distribución del influente sin turbulencias, de tal forma de favorecer la acumulación uniforme de biomasa en el soporte del reactor (Sutton y Mishra, 1991 y Holst *et al.*, 1997).

Los problemas de inmovilización prolongada se han solucionado con estrategias de arranque para reducir los tiempos. Se han desarrollado soportes como el Biolite<sup>®</sup>, poroso y de forma ovalada para mejorar las características hidrodinámicas del sistema con respecto a la arena y otros soportes con densidad mayor.

El diseño y operación de estos reactores es complejo, ya que requieren de una serie de aditamentos para mantener una fluidificación uniforme, boquillas a presión para evitar taponamiento en los difusores, controladores de flujo, sensores de presión para controlar la expansión del lecho, sensores de nivel de líquido, etc. Con respecto a la capacidad de conversión del reactor requieren separadores gas-líquido-sólido para recuperar las partículas que eventualmente salen del lecho, sensores de temperatura, de pH, analizadores de biogás y su composición, etc. (Fan *et al.*, 1982; Henze y Harremoës, 1983; Heijnen *et al.*, 1989; Kunii y Levenspiel, 1991; Sutton y Mishra, 1991; Ehlinger, 1994; Holst *et al.*, 1997).

#### 1.5.5. Los RLF de una y dos etapas

En el tratamiento de aguas residuales se ha reconocido la enorme ventaja de separar las etapas de la digestión anaerobia en acidogénica y metanogénica en reactores de biomasa suspendida como los UASB (Ghosh *et al.*, 1985). En los lechos fluidificados se ha aplicado este sistema a nivel industrial y se ha encontrado que la etapa acidogénica resiste altas cargas orgánicas (4 a 6 veces más que el reactor metanogénico) sin que los problemas de acidificación representen una seria perturbación del sistema, pues la etapa metanogénica está controlada respecto a la concentración de ácidos volátiles que se alimentarán, por lo que se obtienen actividades hasta 3 veces más altas que cuando se utilizan reactores de una etapa. Esto a su vez implica una alta producción de metano (Henze y Harremoës, 1983; Heijnen *et al.*, 1989).

Al controlar la cantidad de ácidos suministrados en el reactor metanogénico, el control del pH en esta etapa se hace innecesario y se tiene un menor consumo de álcali. De esta forma, la respuesta a picos de cargas orgánicas afectan poco la estabilidad del proceso global debido a que se reciben en la etapa acidogénica, que en este aspecto es más estable que la metanogénica y debido al control en la concentración de la alimentación a la etapa metanogénica, el efecto del exceso de carga puede ser considerado transitorio. También se ha reportado la estabilidad de estos sistemas a cambios súbitos en tiempo de retención hidráulico y temperatura.

Esto mismo sucede en sistemas de una sola etapa, ya que la alta tasa de recirculación diluye rápidamente estas variaciones (Heijnen *et al.*, 1989).

Las actividades específicas encontradas en los reactores de dos etapas son de 0.8 y de 2.0 g DQO/g SSV·d para la etapa acidogénica y metanogénica respectivamente, mientras que para reactores de una sola etapa es de 0.7 g DQO/g SSV·d. La desventaja del tratamiento en dos etapas es la doble inversión en dos reactores y su equipamiento, aún cuando por consideraciones económicas se construyen con las mismas dimensiones (Heijnen *et al.*, 1989).

#### **1.5.6. Aplicaciones de los RLF**

La aplicación de los lechos fluidificados clásicos en el tratamiento anaerobio de aguas residuales esta referida de manera extensa en la literatura (Henze y Harremoës, 1983; Heijnen *et al.*, 1987; Sutton y Mishra, 1991 y Holst *et al.*, 1997) y se revisó el uso que se le ha dado a los reactores industriales en secciones anteriores.

Una aplicación que se le ha dado al RLF es la única de la que se tiene referencia, es la de Nikolov y Karamanev (1987), que plantean un sistema de tres fases, mesofílico, para la remoción de sulfatos de efluentes líquidos con *Thiobacillus ferrooxidans* inmovilizado en esferas de espuma de poliestireno, con alimentación de aire como la fase gaseosa por la parte inferior del reactor y la alimentación del influente por la parte superior, de manera similar a un filtro percolador, como se describió en 1.5.2.

La primera aplicación semindustrial que se ha hecho de este prototipo se construyó en Sofía, Bulgaria por Karamanev y Nikolov (1996), como un tratamiento de aguas residuales con lodos activados inmovilizados en esferas de poliestireno, en un arreglo de tanques en serie constituido por 8 reactores. El arranque se llevó a cabo con un TRH de 7.5 h y posteriormente al disminuir este parámetro a 0.8 h encontraron que sólo tres tanques eran suficientes para remover la mayor parte de la carga orgánica, concluyendo que este prototipo es efectivo en el tratamiento de aguas residuales con alta eficiencia volumétrica y estabilidad de la biopelícula.

## 1.6. Sumario

En este Capítulo se han revisado los conceptos principales de la digestión anaerobia en mesofilia y termofilia y la capacidad de los microorganismos anaerobios para formar conglomerados debido a las asociaciones sintróficas de las que dependen para su subsistencia. Existe una teoría madura alrededor del proceso de inmovilización debida a una amplia investigación en la bioquímica y fisicoquímica del proceso. Con este desconocimiento y aunado a las características de estos microorganismos, se han desarrollado tecnologías con biomasa inmovilizada.

Dentro de estas tecnologías específicamente, se ha visto que el uso de la fluidificación mejora los mecanismos de transporte de masa fluido/partícula a expensas de una mayor agitación local. Este hecho en principio permitiría el diseño

de equipos más compactos y eficientes, pero con un gasto de energía mayor debido a las tasas de recirculación requeridas.

Por otro lado, desde el punto de vista operacional, algunos aspectos de los lechos fluidificados inversos han sido estudiados en el campo de la Ingeniería de Reactores. Algunos estudios reportan relaciones semiempíricas para corroborar la bondad de la predicción de la velocidad mínima de fluidificación, así como relaciones semiempíricas para determinar la expansión del lecho y la retención del gas en este prototipo, mientras que otras describen configuraciones básicas para posibles aplicaciones tecnológicas.

De los principales aspectos presentados en este Capítulo se tiene que:

- a) Las bacterias anaerobias presentan características metabólicas singulares por las cuales se han clasificado en una familia diferente. Estas bacterias se pueden adaptar a condiciones extremas de temperatura por medio de cambios químicos en macromoléculas, conservando sus funciones metabólicas.
- b) La agrupación de células en conglomerados sintróficos hace posible el incremento de los tiempos de retención celular y favorece la disminución de los tiempos de operación. La operación de los sistemas de tratamiento con estas agrupaciones favorece la estratificación de los microorganismos según la interdependencia de sustratos, lo que favorece la conversión dentro de la biopelícula.
- c) Las tecnologías de fluidificación son una excelente alternativa para mejorar los mecanismos de transporte fluido/partícula en procesos biotecnológicos de

tratamiento de aguas residuales. Se debe recordar que con frecuencia, la transferencia de masa es el mecanismo más lento y por lo tanto el paso restrictivo en reactores de biomasa suspendida, tales como los UASB.

d) En particular, la fluidificación inversa permite la reducción de los gastos de fluidificación debido al uso de partículas plásticas como soporte inerte, ya que la densidad de algunos plásticos pueden alcanzar órdenes del 20% de la densidad del agua.

e) Los reportes en la literatura acerca del comportamiento de los sistemas fluidificados inversos son escasos, debido a que es una tecnología naciente, sin embargo, existe potencial para la aplicación al tratamiento de aguas residuales utilizando equipos compactos debido a los cortos TRH a que pueden ser operados.

### 1.7. Justificación

La inmovilización de bacterias termofílicas anaerobias no esta documentada y no se conoce la dinámica de inmovilización y la actividad metanogénica específica de bacterias termófilas en sistemas inmovilizados.

Igualmente, el RLFI solamente ha sido operado como sistema de inmovilización y de remoción de contaminantes en condiciones aerobias y mesofílicas anaerobias.

Los estudios hidrodinámicos reportados hasta ahora para el RLFI, han sido hechos con partículas esféricas de gran tamaño. Es decir, son sistemas ideales y predecibles, al presentar pocas interacciones entre partículas, que modifican los perfiles hidrodinámicos de comportamiento del reactor.

En esta falta de estudios es donde radica la importancia de este trabajo, ya que se contempla realizar el estudio comparativo de la dinámica de inmovilización de bacterias anaerobias mesófilas y el efecto del incremento de la temperatura durante la adaptación a termofilia, así como la inmovilización de bacterias termófilas en un soporte plástico (PE de baja densidad molido), en un sistema de inmovilización similar al de González *et al.* (1992).

Igualmente, se plantea estudiar el efecto del TRH y cargas volumétricas en la operación en continuo de estos reactores y determinar la respuesta del sistema a estos cambios.

## 1.8. Objetivos

### 1.8.1. Objetivo General.

2.  
I.  
Estudio de la dinámica de inmovilización de bacterias anaerobias mesófilas y termófilas en partículas de polietileno de baja densidad en un reactor de lecho fluidificado inverso.

### 1.8.2. Objetivos particulares

que quere decir  
1.8.2.1. Evaluación de la dinámica y la calidad de formación de las biopelículas en condiciones de meso y termofilia, y de biopelículas mesofílicas adaptadas a termofilia en RLFI operados en lote.

1.8.2.2. Estudio de la capacidad de remoción de carga orgánica de las partículas inmovilizadas en RLFI operados en continuo con agua residual sintética y aguas residuales municipales.

# 2

## Materiales y Métodos

En este Capítulo se presentan los materiales, metodologías y técnicas analíticas utilizadas durante este trabajo para el seguimiento y análisis de los reactores operados en lote y en continuo.

En la primera sección se describe el sistema de inmovilización, el tipo de soporte utilizado, los inóculos empleados tanto en mesofilia como en termofilia, el medio de cultivo y la forma de inoculación, arranque y operación de los sistemas para los reactores utilizados en la inmovilización en lote. Se describe en detalle la metodología para las determinaciones de actividad acetoclástica, desde la preparación del medio hasta la toma y análisis de las muestras utilizando modificaciones a la técnica planteada por Ramírez *et al.* (1994).



Se encontrará en la sección 2.1.7. la metodología seguida para la determinación de la cantidad de biomasa inmovilizada. Ya que se trabajó con un soporte no poroso, fue posible desprender la totalidad de la biopelícula por sonicación y determinarla con una modificación de la técnica para Sólidos Suspendidos indicada en el Standard Methods (1988). La concentración de biomasa se expresó finalmente como Sólidos Volátiles Inmovilizados (SVI) y este valor se relacionó a la cantidad de soporte seco utilizado.

Para la obtención de una suspensión de material exopolimérico, se siguió una metodología similar a la de Guiot *et al.* (1991) y Schmidt y Ahring (1994). Considerando que la biopelícula estaría formada en mayor cantidad por carbohidratos y proteínas se implementó una técnica para la determinación de estos componentes según Sedmark y Grossberg (1977) y Dubois *et al.* (1956), respectivamente.

Finalmente se siguió la metodología de Zellner *et al.* (1994) para la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido, eliminando la acetona como deshidratante y secando con liofilizador, debido a la fragilidad de las biopelículas obtenidas.

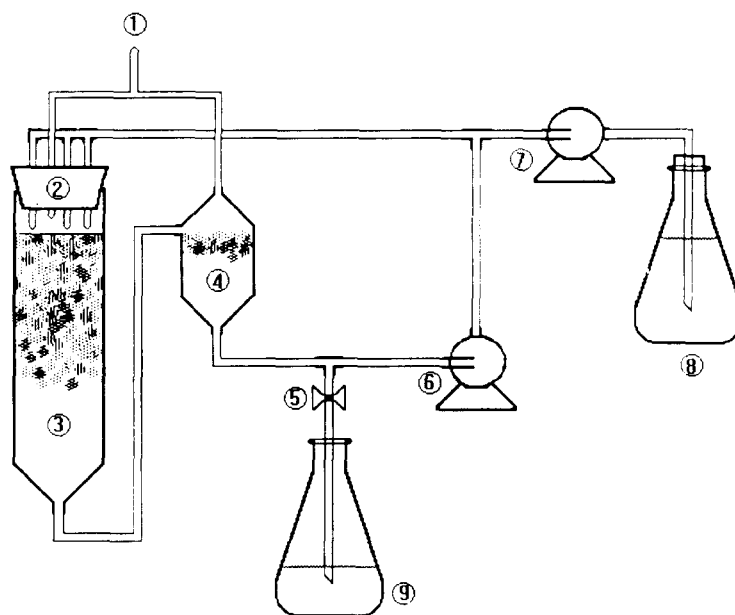
En la segunda sección se revisa en detalle el dimensionamiento, el arranque y la operación de los reactores continuos. Se propone el parámetro conocido como la relación de alcalinidades, que relaciona la alcalinidad de los bicarbonatos con la alcalinidad total y la magnitud del valor indica indirectamente la capacidad de

conversión del sistema. Para finalizar se describen las técnicas analíticas tales como DQO, SSV y análisis de la composición del biogás a través de las cuales se hizo el análisis de la respuesta de los reactores a las condiciones de operación tales como cambios de TRH, cambios de carga orgánica la influencia de la altura del lecho de soporte utilizado en cada corrida.

## 2.1. Reactores operados en lote.

### 2.1.1. Sistema de inmovilización

El sistema de inmovilización consistió en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) o de flujo descendente, como se muestra en la Figura 2.1. Consta de una columna de vidrio con un diámetro interno de 3.5 cm para una relación L/D = 13 y con capacidad aproximada de 500 cm<sup>3</sup>. De este volumen, el 30% se consideró como zona de desenganche de partículas. A la salida del reactor se instaló un separador de 250 cm<sup>3</sup>, que atrapa las partículas plásticas que salen del lecho y las separa del líquido.



**Figura 2.1.** Esquema del sistema de inmovilización alimentado por lote. (1) Salida de biogás, (2) distribuidor, (3) reactor, (4) separador líquido-sólido-gas, (5) válvula de salida, (6) bomba de recirculación, (7) bomba de alimentación, (8) alimentación intermitente, (9) salida intermitente.

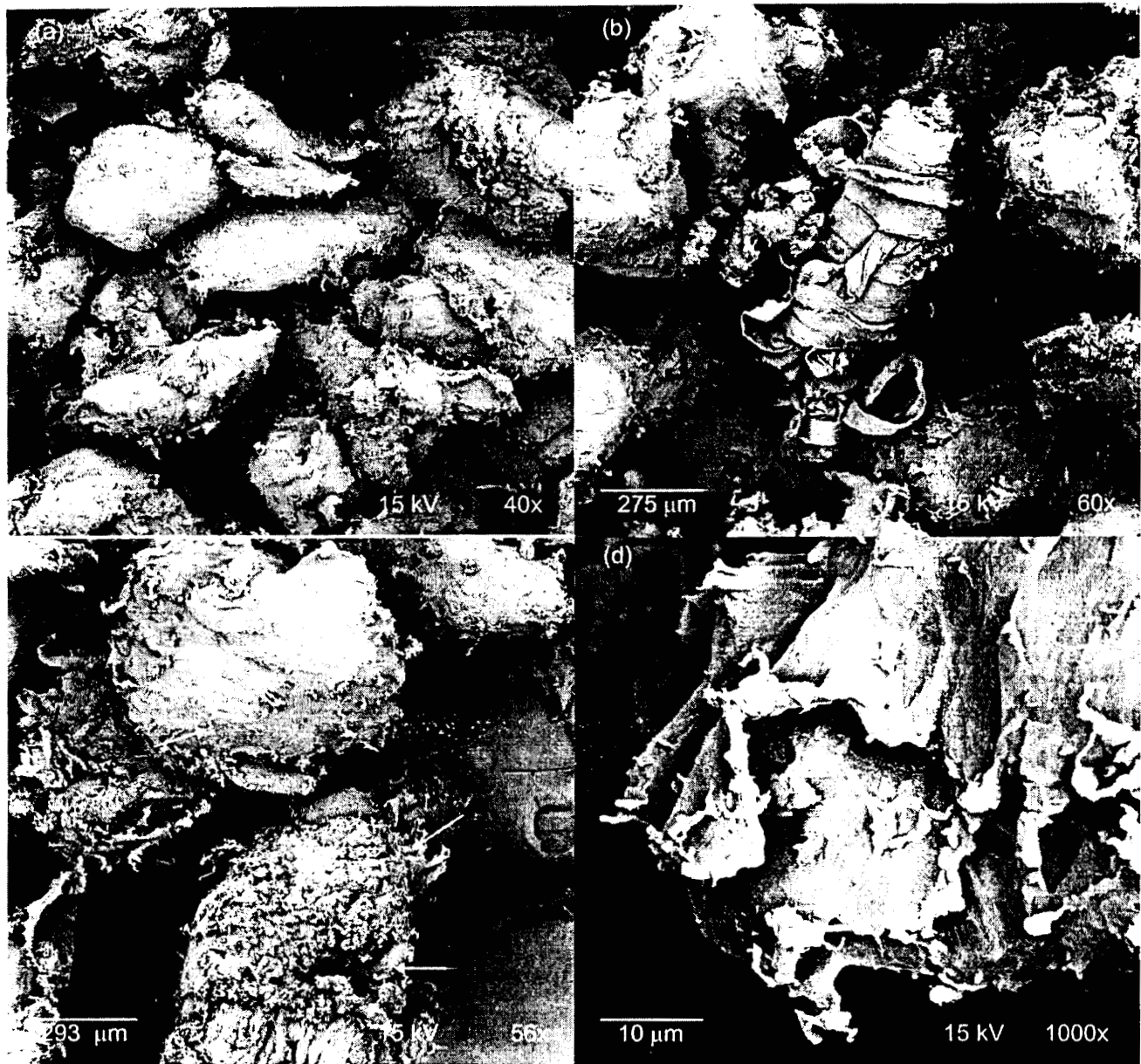
### 2.1.2. Soporte

El soporte utilizado fue polietileno molido con un diámetro de partícula promedio de 0.4 mm y una densidad aparente de  $267 \text{ kg/m}^3$ . En cada reactor se colocaron aproximadamente  $175 \text{ cm}^3$  de soporte.

Para que las partículas plásticas adquirieran movilidad en el líquido, se prepararon con un tratamiento de acondicionamiento, que consiste en agitarlas a alta velocidad en un matraz de volumen sobrado agregando una cantidad de agua y peptona de caseína. Este tratamiento dura de una a dos horas. Posteriormente se elimina esta solución y las partículas humedecidas pueden ser depositadas en los reactores.

En la Figura 2.2 se muestran fotografías de MEB del soporte y puede verse que las partículas no presentan formas ni tamaños similares como se muestra en la Figura 2.2.a. Las formas muy irregulares debido al proceso de molido que les confiere tanto superficies rugosas como lisas, se muestra en la Figura 2.2.b. Las rugosidades dan lugar a intersticios, cavidades y bordes irregulares, lo cual se muestra en las Figuras 2.2.c y d.

Se fluidificó un volumen aproximado de  $175 \text{ cm}^3$  de soporte en cada reactor con una velocidad superficial de 9.0 m/h obteniendo una expansión del lecho del 75%.



**Figuras 2.2.a, b, c y d.** Imágenes de MEB del soporte. (a) Partículas con formas y tamaños diferentes. (b) El proceso de molido sobre las lentejas de polietileno produce partículas con formas, bordes y superficies completamente irregulares. (c) Las flechas indican las áreas lisas y rugosas en las partículas, así como algunos huecos. (d) Acercamiento que muestra los bordes de una partícula. Puede apreciarse que el soporte no es poroso.

### 2.1.3. Inóculos

2.1.3.1. Inóculo Mesofílico. Se utilizó un lodo floculento que se había utilizado para degradación de detergentes y que contenía 21 g SSV/L con una actividad metanogénica específica de 0.42 mmol CH<sub>4</sub>/g SSV·h. El lodo fue observado en un microscopio óptico con epifluorescencia a 420 nm Olympus BH2-RFCA y mostró estructuras similares a *Methanosaeta*, algunos cocos del tipo *Methanosarcina* y bacilos cortos, curvos, fuertemente fluorescentes que pudieran ser *Methanobacterium*.

2.1.3.2. Inóculo Termofílico. El mismo lodo mesofílico fue adaptado a termofilia por un periodo de dos años alimentándolo con acetato, propionato y butirato en una relación 500:250:250 mg DQO/L. Después de este tiempo el contenido de SSV fue de 11.0 g/L y la actividad metanogénica de 0.22 mmol CH<sub>4</sub>/g SSV·h. Durante el proceso de aclimatación, el lodo perdió su estructura granular y se volvió completamente floculento. Posteriormente empezó a granular formando estructuras muy pequeñas, de menos de 1 mm de diámetro. Los microorganismos observados fueron filamentos muy largos no fluorescentes de bacterias tipo *Methanosaeta*, las cuales mostraban vacuolas de gas 2 ó 3 días después de haberse alimentado con acetato. La descripción de esta bacteria coincide con la reportada por Nozhevnikova y Yagodina (1983), Nozhevnikova y Chudina (1985), Zinder *et al.* (1987), Zinder (1990) y Kamagata y Mikami (1991). Se encontraron bacilos pequeños, curvos y fuertemente fluorescentes similares a *Methanobacterium* como los descritos por

Garcia (1990), embebidos en los filamentos formados por *Methanosaeta* o libres. Se encontraron también bacilos esporulados tipo *Clostridium* o *Bacillus*.

#### 2.1.4. Composición del medio de cultivo de Balch et al. (1979).

Este medio de cultivo se utilizó para alimentar los reactores en lote y continuos, y para las determinaciones de actividad acetoclástica de inóculos y biopartículas.

|                                                               |         |
|---------------------------------------------------------------|---------|
| Solución Mineral I de Balch et al., (1979)*                   | 12.5 mL |
| Solución Mineral II de Balch et al., (1979)*                  | 12.5    |
| Solución de Oligoelementos de Balch et al., (1979)*           | 2.5     |
| Solución de Vitaminas de Balch et al., (1979)**               | 1.0     |
| Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 %) | 1.0     |
| Solución de $\text{NiCl}_2$ (50 mg/L)                         | 1.0     |
| Solución de resarsurina (0.1 %)                               | 1.0     |
| $\text{NaHCO}_3$                                              | 2.0 g   |
| Extracto de Levadura                                          | 0.1     |
| Peptona de Caseína                                            | 0.1     |
| Cisteína                                                      | 0.5     |

\* Soluciones concentradas 4 veces y refrigeradas.

\*\* Solución concentrada 10 veces y refrigerada. Se agita bien antes de adicionar.

Mezclar las soluciones y disolver los demás componentes en 1000 mL de agua destilada.

#### 2.1.5. Arranque y operación de los reactores.

Se introdujo el soporte acondicionado por la parte superior de los reactores y se llenaron con el medio de Balch et al. (1979). Para iniciar los experimentos de inmovilización, los reactores se inocularon con 1000 mg SSV/L del inóculo

respectivo. Todos los sistemas fueron alimentados en lote cada 48 horas a 35° C para condiciones mesofílicas y 55° C para condiciones termofílicas y pH de 7.0 en todos los casos.

El medio de cultivo contenía los sustratos en las concentraciones adecuadas para cada experimento, como se muestra en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Condiciones de experimentación, sustratos utilizados y concentraciones para los diferentes experimentos de inmovilización.

| Condición                | Sustrato        | Concentración (g/L) |
|--------------------------|-----------------|---------------------|
| Mesofilia (35° C)        | acetato         | 1.0                 |
| Adaptación (35° → 55° C) | acetato         | 1.0                 |
| Mesofilia (35° C)        | acetato:glucosa | 0.5+0.5             |
| Termofilia (55° C)       | acetato         | 1.0                 |
| Termofilia (55° C)       | acetato:glucosa | 0.5+0.5             |

Los reactores se reinoculaban con la misma concentración de lodos cada vez que se reemplazaba el medio de cultivo.

La dinámica de inmovilización fue seguida a través de la actividad acetoclástica y de la acumulación de biomasa en el soporte. Periódicamente se tomaron muestras de soporte de los reactores, las cuales eran tratadas como se describe a continuación.

#### **2.1.6. Determinaciones de actividad acetoclástica y de parámetros cinéticos.**

Para determinar la capacidad de degradación de un sustrato o *actividad* de las partículas en inmovilización, es necesario que estén libres de cualquier sólido

sedimentable. Con este fin, el reactor se alimentó con medio fresco y con los sustratos respectivos, pero no se inoculó durante los dos días previos a la cinética.

La actividad acetoclástica de las partículas fue determinada a intervalos regulares de tiempo durante el periodo de colonización. Las determinaciones de actividad se hicieron en botellas serológicas con una cantidad conocida de biopartículas, 20 mL de medio mineral (Balch *et al.*, 1979) y una concentración conocida de acetato.

La velocidad global de consumo de acetato fue estimada de la disminución lineal en la concentración de este sustrato. Para expresar la actividad acetoclástica específica, la velocidad de degradación de acetato fue relacionada a la cantidad de biomasa inmovilizada.

La determinación de parámetros cinéticos se hizo cuando las partículas mostraban la máxima concentración de biomasa y se siguió la misma metodología aplicando concentraciones de acetato de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 mM. Se obtuvieron las correspondientes curvas de Michaelis-Menten y a través de la modificación de Hanes-Woolf se obtuvieron las constantes cinéticas  $K_s$  y  $V_{max}$  (Segel, 1982).

La temperatura de estas determinaciones fue la misma que la de los sistemas de inmovilización respectivos.

2.1.6.1. Preparación del medio de cultivo en botellas serológicas. El medio de cultivo que se utiliza para determinaciones de actividad no contiene peptona ni extracto de levadura. Se reduce por ebullición bajo corriente de nitrógeno durante 10 minutos o el tiempo necesario para obtener el vire del indicador y se enfría bajo corriente de

nitrógeno. Se le agrega la cisteína y aún bajo corriente de nitrógeno se vierte en botellas serológicas con capacidad de 60 mL, adicionando 20 mL a cada una y se tapan con tapón de hule, se anillan con aros de aluminio y se cambia atmósfera con mezcla  $N_2/CO_2$  (80%-20%) durante 2 minutos. Se esterilizan durante 10 minutos a  $121^\circ C$ . El pH debe quedar en  $7.0 \pm 0.05$ .

Para las cinéticas se consideran tres botellas control a las cuales no se les agrega ningún sustrato y tres botellas para cada uno de los sustratos a utilizar.

2.1.6.2. Toma de muestras durante los experimentos de inmovilización. Una cantidad de partículas se saca del reactor por la parte superior, y se ponen en una probeta de 100 mL que tendrá una salida de vidrio en la parte inferior, con una manguera de hule corta y una pinza Hoffman, que servirá para drenar el líquido.

Para lavar las partículas, se prepara en un matraz medio de cultivo sin peptona de caseína, extracto de levadura, cisteína ni resarsurina. Se reduce por ebullición y bajo corriente de nitrógeno por 10 minutos. Se enfría, se tapa herméticamente y se utiliza inmediatamente.

2.1.6.3. Inoculación de botellas serológicas. Cuando todo el material esta listo, se introduce en la precámara de la cámara anaerobia: las botellas sin los aros de aluminio, el matraz con medio para lavados, las partículas en la probeta, una espátula pequeña y un matraz adicional para líquidos de desecho. Después de los vacíos subsecuentes en la precámara, todo el material se pasa a la cámara.

Las partículas en la probeta se lavan suavemente varias veces con medio de cultivo, se drena al máximo el líquido por la parte inferior para eliminar cualquier sólido sedimentable, de manera que sólo queden en la probeta los plásticos inmovilizados.

Se destapan las botellas serológicas y se agregan las partículas a cada una en volúmenes de 5 mL, medidos con la probeta y adicionados con la espátula.

La cantidad de plásticos a agregar debe ser muy exacta para cada botella, ya que los errores en esta medición pueden llevar a diferencias importantes entre los triplicados en la forma en que la cinética se desarrolla.

Al finalizar esta operación, las botellas de prueba y control se tapan con el tapón de hule, se sacan de la cámara y se colocan nuevamente los aros de aluminio.

2.1.6.4. Adición de sustratos. El sustrato utilizado es acetato y se prepara pesando suficiente acetato de sodio para alcanzar una concentración conocida en un volumen de agua reducida. La sal ya pesada se pone en una botella serológica y se adiciona el agua reducida bajo corriente de nitrógeno. Se tapa con tapón de hule, se anilla y se esteriliza durante 10 minutos a 121° C.

La concentración debe ser tal, que la cantidad a agregar sea la necesaria para alcanzar la concentración deseada en mM en el volumen de líquido de la botella serológica de prueba, pero no mayor al 10% de este volumen.

La adición de sustrato se hace en condiciones estériles flameando las tapas de las botellas con alcohol. Se utiliza jeringa insulínica estéril desechable, purgada en

corriente de nitrógeno, para tomar el volumen del sustrato y agregarlo a la botella de prueba con los plásticos. Se utilizará una jeringa diferente para cada sustrato.

Al agregar el sustrato se inicia la actividad y las botellas se ponen en incubación a la temperatura correspondiente y con agitación suave.

2.1.6.5. Toma de muestras para análisis cromatográfico. Las muestras se toman en intervalos regulares de tiempo. En todos los casos las tapas de las botellas se flamearán con alcohol antes y después de la toma de muestras, para evitar contaminaciones.

a) Muestra Líquida

La muestra de 0.5 mL se toma de la fase líquida de la botella serológica, con jeringa insulínica estéril desechable que se ha purgado previamente en corriente de nitrógeno. Se debe evitar succionar los plásticos o causar turbulencia. Es recomendable utilizar una jeringa limpia para cada una de las muestras.

La muestra se deposita en un vial, se le agregan 15 microlitros de una solución de ácido clorhídrico al 50%, se centrifuga 20 minutos a 13,000 rpm y el sobrenadante se deposita en un vial limpio que se congela para análisis posterior.

b) Muestra Gaseosa

La muestra de 0.1 mL se toma de la fase gaseosa de la botella serológica, también con jeringa estéril purgada, evitando humedecerla con la fase líquida y se inyecta directamente al cromatógrafo para la determinación de  $\text{CH}_4$ . Es recomendable utilizar una jeringa seca y limpia para cada una de las muestras.

### **2.1.7. Técnica para análisis cromatográfico de la concentración de acetato y metano.**

2.1.7.1. Elaboración de la curva estándar de acetato. Para la curva estándar se prepara una solución madre 100 mM de acetato (Sigma Chemicals, pureza de 99%) y a partir de ésta se preparan viales con concentraciones de 0 a 25 mM de acetato, considerando que se agregan a los viales 15 microlitros de una solución de ácido clorhídrico al 50% y se aforan a 1 mL con agua destilada.

Las muestras líquidas se analizan por cromatografía de gases en un cromatógrafo HP 5890 con detector de ionización de flama en una columna capilar AT-1000 en las siguientes condiciones:

Temperatura del inyector: 210° C

Temperatura de la columna: 180° C

Temperatura del detector: 210° C

Flujo de nitrógeno: 5 mL/min

Flujo de aire: 300 mL/min

Flujo de hidrógeno: 30 mL/min

Volumen de inyección: 0.1 microlitros

Se inyectan cada una de las muestras y se registran las áreas de al menos 10 concentraciones diferentes en el registrador Shimadzu C-R3A, en el modo CALIBRATE, que al finalizar dará cada uno de los parámetros requeridos para la

obtención de la concentración del compuesto en la muestra. Con ésta, se construirán las curvas de consumo de acetato con respecto al tiempo.

2.1.7.2. Elaboración de la curva estándar de metano. Para la curva estándar se preparan 20 botellas serológicas de 60 mL a las que se les adicionan 25 mL de agua. Se tapan con tapones de hule y se anillan.

Los volúmenes de metano que se manejarán serán de 1 a 10 mL que se tomarán directamente del tanque de metano a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> en el regulador, con jeringa desechable de 10 mL. Estas cantidades se inyectarán cuidadosamente a las botellas por triplicado.

Las muestras gaseosas se analizan en un cromatógrafo Gow-Mac 550 con detector de conductividad térmica, con una columna de acero inoxidable empacada con Carbosphere 80/100 a las siguientes condiciones:

Temperatura del inyector: 170° C

Temperatura de la columna: 140° C

Temperatura del detector: 190° C

Flujo de helio: 30 mL/min

Volumen de inyección: 0.1 mL

Se analiza cada muestra y se registran las áreas. Se calcula la concentración de metano que se encuentra en la fase gaseosa de cada botella con el siguiente cálculo:

1 mol de CH<sub>4</sub> a 580 mm de Hg y 20° C corresponde a 31630 mL de CH<sub>4</sub>, entonces,

$$\frac{0.001 \text{ L CH}_4}{0.035 \text{ L fase gas}} \times \frac{1 \text{ mol CH}_4}{31.63 \text{ L CH}_4} \times \frac{1000 \text{ mmol}}{\text{mol}} = 0.9033 \frac{\text{mmol CH}_4}{\text{L fase gas}}$$

Este mismo cálculo se hace para las demás concentraciones. Con las áreas y las concentraciones se elabora una regresión lineal para obtener los coeficientes de la ecuación de la recta y la correlación.

Con esta curva estándar se interpretarán las áreas registradas de las muestras problema y se construirán las curvas de producción de metano con respecto al tiempo.

#### 2.1.7.3. Cálculos de actividad acetoclástica total y específica.

##### a) Actividad Acetoclástica Total

Esta definida como la velocidad de consumo de acetato que presentan las partículas por litro de fase líquida.

La velocidad de consumo de acetato es la pendiente de la disminución lineal del sustrato y se reporta por medio del siguiente cálculo:

$$\frac{\text{mmol acetato}}{\text{L fase líquida} \cdot \text{h}} \times \frac{0.06 \text{ g}}{\text{mmol acetato}} \times \frac{24 \text{ h}}{\text{d}} = \frac{\text{g acetato}}{\text{L f. l.} \cdot \text{d}}$$

El resultado obtenido se puede extrapolar a la fase líquida del reactor considerando las proporciones respectivas de fase líquida y soporte en las botellas serológicas y en el reactor.

### b) Actividad Acetoclástica Específica

Esta definida como la velocidad de consumo de sustrato que se relaciona a la cantidad de biomasa inmovilizada y se expresa por medio del siguiente cálculo:

$$\frac{\text{mmol acetato}}{\text{L fase líquida} \cdot \text{h}} \times \frac{0.025 \text{ L f. l.}}{\text{g soporte seco}} \times \frac{\text{g spte. seco}}{\text{mg SVI}} = \frac{\text{mmol acetato}}{\text{mg SVI} \cdot \text{h}}$$

En donde mmol acetato/L de fase líquida·h es la pendiente del consumo lineal de acetato de la cinética acetoclástica.

Cabe mencionar que la relación  $\frac{0.025 \text{ L soporte en fase líquida}}{\text{g soporte seco}}$ , variará de acuerdo a la cantidad de soporte seco encontrado en las botellas serológicas después de finalizar la cinética. De igual manera,  $\frac{\text{g soporte seco}}{\text{mg SVI}}$ , es el inverso de la concentración de biomasa, cuya determinación se describe en la siguiente sección.

### **2.1.8. Determinación de Biomasa Inmovilizada**

La biomasa inmovilizada se consideró como los sólidos volátiles inmovilizados o material orgánico adherido al soporte. Se consideró también que la biopelícula está formada por sustancias exopoliméricas constituidas principalmente por carbohidratos y proteínas.

La biopelícula fue desprendida de muestras de soporte por sonicación (50 a 60 Hz) en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y los componentes que se determinaron fueron proteína soluble (Sedmark y Grossberg, 1977) y carbohidratos totales (Dubois *et al.* 1956), presentes en el sobrenadante que se recuperaba después de centrifugar a 9,500 rpm por 10 minutos la fracción líquida de las muestras (Guiot *et al.*, 1991; Schmidt y Ahring, 1994). Estas fracciones se compararon entre sí para determinar la predominancia de uno u otro compuesto por medio de la relación mg proteínas/mg carbohidratos.

Igualmente, se determinaron los sólidos totales (ST), fijos (SF) y volátiles (SV) según Standard Methods (1988). Estos últimos se expresaron como sólidos volátiles inmovilizados (SVI) y se relacionaron a los ST que se expresaron como sólidos totales inmovilizados (STI) para determinar la fracción de material orgánico de la biopelícula (SVI/STI). La cantidad de biomasa se relacionó a la cantidad de soporte seco utilizado en la determinación.

2.1.8.1. Técnica para la determinación de sólidos volátiles inmovilizados (SVI). Se sigue la técnica indicada en Standard Methods (1988) para la determinación de SST, SSF y SSV, modificada en este trabajo para la determinación de biomasa adherida a un soporte no poroso.

a) Desprendimiento de la biopelícula

Para obtener una suspensión de microorganismos, se toma una botella serológica que contenga cualquier volumen de agua destilada y se le agregan 5 mL de soporte

libre de sólidos sedimentables como se indica en 2.1.5.3. Las botellas preparadas se agitan en un sonicador por 5 minutos. Con jeringa, se toma el volumen total de la suspensión y se filtra a vacío en los filtros de fibra de vidrio a peso constante. A estos filtros se les aplica la técnica convencional para la determinación de SST, SSF y SSV, referida.

El procedimiento se repite hasta que ya no se detecten diferencias en los pesos de los filtros. Es decir, hasta que se hallan extraído todos los sólidos de las partículas. Se hace por triplicado.

La suma de las determinaciones de los pesos de estos "lavados", será el contenido total de sólidos volátiles totales y fijos respectivamente en las partículas.

#### b) Concentración de biomasa

Para relacionar la cantidad de sólidos con la cantidad de plásticos usados, después de los lavados, las botellas serológicas se destapan y se ponen a secar a 60° C, durante 24 horas. Después de este tiempo se pesan cuidadosamente los plásticos y esta cantidad se relaciona con la cantidad de sólidos para expresarlo en,

mg SVI/g de soporte seco.

Con la densidad aparente del soporte, 267 kg/m<sup>3</sup>, se transforman a,

kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco

Cabe mencionar que posterior al desprendimiento de biomasa del soporte, éste se sometió a una prueba de actividad acetoclástica y fermentativa con la metodología

detallada anteriormente en 2.1.6, para corroborar que las veces que se sonicó la muestra eran suficientes para desprender la biopelícula completamente.

Igualmente para comprobar que la sonicación no afectaba la biopelícula, al tenerla en suspensión se sometió a actividad fermentativa, acetoclástica e hidrogenotrófica, adicionando como sustratos glucosa, acetato y una mezcla  $H_2$ - $CO_2$  (20%:80%) siguiendo la metodología de Hungate (1969).

2.1.8.2. Técnica para la determinación de proteína soluble (Sedmark y Grossberg, 1977).

La determinación de proteína soluble se hace utilizando azul brillante de Coomassie G-250 (Sigma Chemicals) con ácido perclórico y la solución estándar de proteína se prepara con seroalbúmina bovina (Sigma Chemicals), según la referencia.

a) Preparación de la muestra problema

Para obtener una suspensión de microorganismos, se prepara un tubo de Hungate que contenga 4 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M y se les agrega alrededor de 1 g de plásticos húmedos, libres de sólidos sedimentables en la cámara anaerobia. Se saca de la cámara y se agita con sonicador por 5 minutos. Con jeringa se saca todo el líquido de la suspensión y se deposita en viales que se centrifugan durante 10 minutos a 9,500 rpm. Se colocan en una celda para espectrofotómetro 2 mL del sobrenadante, se le agrega el reactivo de Coomassie y se espera a que desarrolle el color. Se mide inmediatamente y se registra la densidad óptica. Todo el procedimiento se repite hasta que el sobrenadante de los "lavados" no desarrolle

color y la lectura del espectrofotómetro sea cercana a cero. La determinación se hace por triplicado.

Por medio de la curva estándar preparada previamente se obtiene la concentración de proteína detectada y la suma de la concentración de estos "lavados" será el contenido total de proteína soluble en las partículas.

Para relacionar la cantidad de proteína con la cantidad de soporte usado, después del último lavado, los tubos de Hungate se destapan y se ponen a secar a 60° C, durante 24 horas. Después de este tiempo se pesan cuidadosamente los plásticos y esta cantidad se relaciona con la cantidad de proteína para expresarlo en mg de proteína soluble/g de soporte seco.

#### 2.1.8.3. Técnica para la determinación de carbohidratos totales (Dubois et al., 1956).

La determinación se hace con una solución acuosa de fenol al 5%,  $H_2SO_4$  concentrado y una solución estándar de glucosa, como lo indica la referencia.

##### a) Preparación de la muestra problema

Para obtener una suspensión de microorganismos, se sigue la misma metodología que en 2.1.8.2, a). Se le agrega la solución de fenol y posteriormente el ácido sulfúrico al sobrenadante obtenido. Se espera a que desarrolle el color, se enfríe y se mide inmediatamente, registrando la lectura del espectrofotómetro.

El procedimiento se repite hasta que en el sobrenadante de los "lavados", ya no se detecte desarrollo de color y las lecturas sean cercanas a cero. La determinación se hace por triplicado.

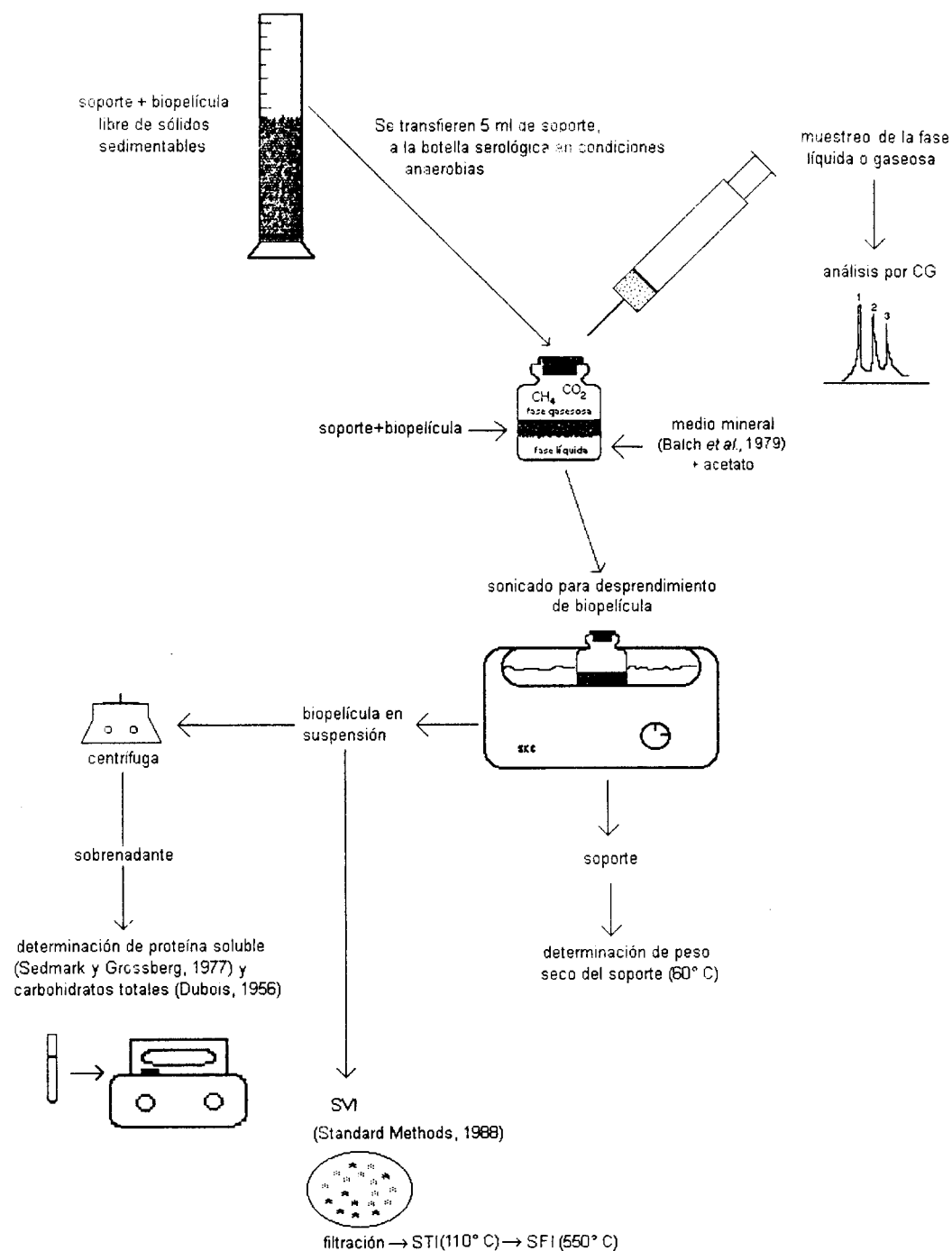
Por medio de la curva estándar preparada previamente se obtiene la concentración de carbohidratos detectada y la suma de las concentraciones de estos "lavados" será el contenido total de azúcares totales en las partículas.

La cantidad de carbohidratos totales se relaciona con la cantidad de plásticos usados, después de los lavados, como se describió anteriormente, para expresarlo en mg de carbohidratos totales/g de soporte seco.

En la Figura 2.3 se muestra esquemáticamente la metodología seguida para la determinación de la cinética acetoclástica y de biomasa descritas anteriormente.

#### **2.1.9. Preparación de Muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

Las muestras para microscopía electrónica de barrido se prepararon siguiendo una metodología similar a la de Zellner *et al.* (1994). Consistió en lavar las partículas en amortiguador de cacodilato (Grado I, Sigma Chemicals) 0.1 M a pH 7.5 dos veces por 10 minutos y fijarlas en una solución de este amortiguador con glutaraldehído al 3% (Grado I, solución acuosa al 25%, Sigma Chemicals), durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el fijador y se lavaron con el amortiguador nuevamente. Se deshidrataron durante 10 minutos en baños sucesivos de soluciones de etanol (Baker, 99% de pureza) del 10 al 100%. Ambos procesos se llevaron a cabo en ampollitas de vidrio templado a 4° C.



**Figura 2.3.** Esquema del procedimiento general para la determinación de actividad específica, biomasa y composición de la biopelícula para partículas inmovilizadas.

Al finalizar, se removi6 completamente el etanol y las muestras se congelaron sumergi6ndolas en nitr6geno l6quido. Las ampollitas as6 tratadas, se deshidrataron por liofilizaci6n a  $-50^{\circ}\text{C}$  y 5 micr6metros de Hg de vac6o en un liofilizador Labconco Lymph-Lock 4.5 durante 3 a 5 horas. Al cabo de este tiempo, las ampollitas se sellaron al vac6o. Posteriormente las part6culas se colocaron en portamuestras y se recubrieron con carb6n y oro en un Sputter-Coater Bal-Tec SCD 050 y se observaron en el microscopio electr6nico de barrido Zeiss DSM 940 A.

## 2.2. Reactores operados en continuo

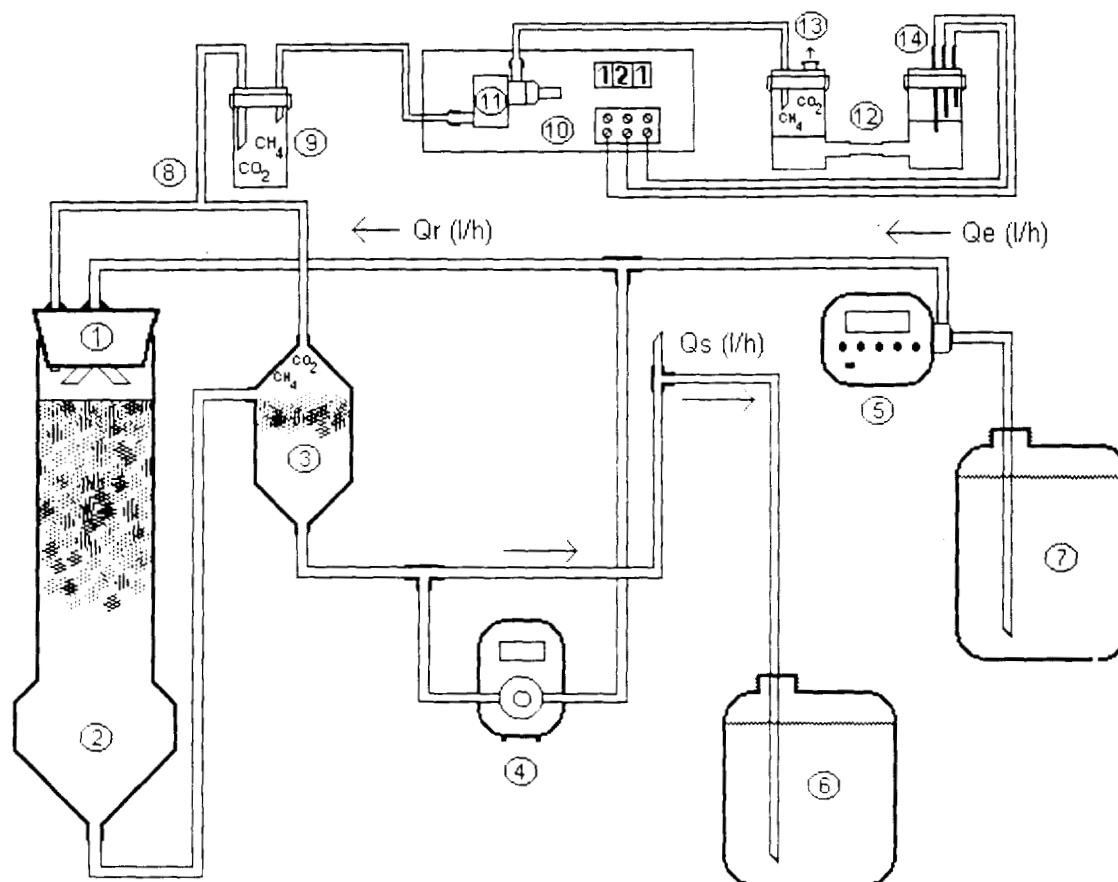
### 2.2.1. Dimensionamiento de los reactores

Se hizo un diseño del reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) para la operación en continuo, en el que se consideraron varias características. Una de ellas fue un mayor volumen dado por el diámetro y la altura del sistema, que a su vez consideraba el tercio inferior de la longitud del reactor como zona de desenganche de partículas.

Como se muestra en la Figura 2.4, en la parte inferior se incluyó una zona de baja velocidad consistente en un ensanchamiento que serviría para retener las partículas en el reactor. Este ensanchamiento termina en forma cónica con una inclinación de  $70^\circ$  para evitar la sedimentación de sólidos. La entrada del ensanchamiento se hizo con una inclinación mayor a  $60^\circ$  para facilitar la salida y el regreso del soporte a la zona de fluidificación.

El biogás producido en el reactor y el que es arrastrado al separador salía a un colector de gas que a su vez estaba conectado a un medidor para determinar el volumen producido. El medidor consistió de un sistema de desplazamiento de líquido por el biogás, que cuenta con tres electrodos de aluminio, uno a tierra, uno positivo y uno negativo. Al alcanzar el líquido el electrodo más alto, se cierra el circuito que activa la válvula solenoide de tres vías y permite la salida de biogás agregando un ciclo en el contador. De esta forma con los ciclos contados y el volumen de

desplazamiento del líquido, se obtiene la cantidad de biogás producido. El medidor de biogás tiene un puerto de muestreo para determinar la composición del mismo.



**Figura 2.4.** Esquema del RLFI y del medidor de flujo de biogás que se utilizó para la operación en continuo. (1) Distribuidor, (2) ensanchamiento inferior, (3) separador líquido-sólido-gas, (4) bomba de recirculación, (5) bomba de alimentación, (6) salida, (7) alimentación, (8) salida de biogás, (9) colector de biogás, (10) medidor electrónico de biogás, (11) válvula solenoide, (12) vasos comunicantes, (13) puerto de muestreo, (14) electrodos.

La salida del efluente se colocó al nivel del separador y del reactor para tener un efecto de vasos comunicantes, de tal forma que el gasto alimentado ( $Q_e$ ) fuera exactamente igual al gasto de salida ( $Q_s$ ).

Ya que se trabajó con un sistema muy pequeño, se utilizó como distribuidor de líquido en la parte superior del reactor, una "Y", como se muestra en el diagrama anterior, que aunque no abarcaba toda la sección expuesta por el lecho de partículas, fue suficiente para fluidificarlo y mantenerlo expandido.

Se construyeron dos reactores con las siguientes dimensiones:

|                                | RLFI-1 | RLFI-2 |
|--------------------------------|--------|--------|
| Volumen del reactor (L)        | 2.0    | 1.73   |
| Volumen del ensanchamiento (L) | 0.4    | 0.38   |
| Volumen del separador (L)      | 0.3    | 0.25   |
| Relación $L/D$                 | 20     | 20     |

Se operaron dos reactores con alimentación sintética, comparando la influencia de la altura del lecho en la capacidad de degradación y posteriormente, el reactor 2 se probó con agua residual de tipo doméstico. Las tres corridas experimentales se hicieron bajo la siguiente premisa: de los dos diferentes gastos que el sistema maneja, se tiene que considerar que el gasto de recirculación es el gasto necesario para mantener fluidificado el lecho, el cual es constante, en principio, para cualquier tiempo de retención hidráulico (TRH).

Es necesario considerar que el reactor debe ser operado bajo tres premisas importantes:

(1) ser un equipo compacto,

(2) deberá operar a TRH competitivos con otros prototipos, ya que el agua residual sintética y el agua residual municipal son completamente biodegradables y el prototipo proporciona un buen mezclado,

(3) y por consiguiente, tener un gran cantidad de biomasa inmovilizada adaptada y capaz de degradar altas cargas orgánicas en cortos TRH.

### **2.2.2. Inóculos**

El RLFI-1 se inoculó con una mezcla de lodo granular de una planta tratadora de efluentes de una papelería, de una planta tratadora de vinazas y de una planta tratadora de residuales de una cervecera con una concentración de 40 SSV/L. El RLFI-2 se inoculó también con una mezcla de lodos granulares de 34 g SSV/L provenientes de una planta tratadora de residuales de una cervecera. Ambos inóculos fueron macerados en condiciones anaerobias con el objeto de desintegrar los gránulos y dejar a las bacterias en suspensión. Posterior a este proceso se determinaban los sólidos volátiles (Standard Methods, 1988) y la actividad metanogénica específica como se indica en 2.1.5.1 y se mantenían los lodos en frascos anaerobios con el mismo medio de cultivo utilizado para alimentar los reactores. En ambos casos los reactores se reinocularon en varias ocasiones durante el arranque para mantener una concentración de 300 a 500 mg SSV/L reactor.

El reactor que se operó con aguas residuales municipales y no se inoculó ya que se trabajó con la biomasa inmovilizada restante de la corrida del RLFI-2.

### **2.2.3. Soporte**

Se utilizó el mismo soporte descrito en 2.1.2. Durante los arranques, se permitió que el régimen hidrodinámico de cada reactor seleccionara el tamaño de partículas que permanecería en el lecho. Se encontró que los finos de diámetro menor a 0.23 mm fueron totalmente evacuados y permanecieron las partículas de diámetro de 0.23 a 0.8, con un diámetro promedio de 0.4 mm. El volumen de soporte acondicionado que permaneció en el primer reactor fue de 0.588 L y en el segundo de 0.431 L, con los que se manejó una relación altura del lecho con respecto al diámetro del reactor ( $H_o/D_R$ ) de 6 y de 3, respectivamente.

La corrida experimental con agua residual de la UAM-I, se inició con 0.161 L de soporte inmovilizado y la concentración de biomasa fue de 3.47 kg/SVI m<sup>3</sup> de soporte seco.

### **2.2.4. Condiciones de arranque**

El arranque de los dos primeros reactores se llevó a cabo a un TRH de 24 horas. La velocidad superficial inicial fue de 9 m/h y el gasto en la recirculación de 13.2 L/h para el RLFI-1 y de 7.31 m/h y 15.6 L/h para el RLFI-2. Los reactores se operaron con una alimentación sintética que se preparó con las soluciones minerales, de

oligoelementos y de vitaminas de Balch *et al.* (1979, enriquecida con 0.1 g/L de peptona, 0.1 g/L de extracto de levadura y como sustratos acetato y glucosa en una relación 1:1. La carga másica empleada fue de 0.5 g DQO/g SSV·d aproximadamente para ambos, ya que se inocularon con sólidos suspendidos.

Se probaron dos metodologías de arranque: la primera consistió en mantener abierto el Reactor 1 y alcanzar eficiencias máximas de remoción. La segunda consistió en cerrar el Reactor 2 y aumentar la concentración de materia orgánica antes de alcanzar eficiencias máximas de remoción (Heijnen *et al.* 1989).

El reactor alimentado con aguas residuales municipales se arrancó con un TRH de 3 horas, una velocidad superficial de 11 m/h y un gasto en la recirculación de 27.2 L/h.

El agua residual utilizada para alimentar este reactor fue la de la unidad Iztapalapa de la UAM y tenía una DQO total de 266.3 mg/L ( $\pm 99.66$ ), 40 mg SSV/L ( $\pm 0.11$ ) y pH de 8.21 ( $\pm 0.23$ ), en valores promedio.

#### **2.2.5. Condiciones de operación en continuo**

Una vez inmovilizada cierta concentración de biomasa en el soporte se suspendía la inoculación del reactor y se operaba en continuo. Para la primera corrida se utilizaron TRH de 1, 2, 0.5 y 0.3 d y se operó durante 184 días. En la segunda corrida los TRH fueron de 6, 4 y 3 h y se operó durante 160 días. En el caso del reactor alimentado con aguas negras los TRH fueron de 2, 1.3 y 0.6 h y el agua residual utilizada

mantuvo casi las mismas características durante todo el tiempo de operación. El reactor se operó por un periodo de 360 días.

Con las variaciones en el TRH y en la concentración de la alimentación se variaba la carga orgánica volumétrica (Bv) que tratarían los reactores. Igualmente, los reactores se operaron con cargas másicas (Bx) superiores a 1.0 kg DQO/kg SVI-d.

### **2.2.6. Análisis**

Los análisis de rutina fueron para todas las corridas para influente y efluente: demanda química de oxígeno (DQO) soluble y total por reflujo cerrado similar a la técnica comercial HACH; sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles (Standard Methods, 1988); el pH y la relación de alcalinidades. La cantidad de biogás producido se determinó con el medidor por desplazamiento de líquido que se describió anteriormente y la composición del biogás por medio de la técnica descrita en 2.1.5.5, b) y en las condiciones descritas en 2.1.6.2.

Cada vez que se variaba el TRH o se aumentaba la concentración de la DQO en la alimentación, se determinaba la cantidad de biomasa inmovilizada con la metodología que se utilizó en los estudios de inmovilización, descrita en 2.1.7.1.

#### **2.2.6.1. Técnica para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).**

En este caso se utilizan 42.256 g de  $K_2Cr_2O_7$ , 33.3 g de  $HgSO_4$  y 167 mL de  $H_2SO_4$  concentrado para la solución digestora. Para la solución de ácido sulfúrico con

sulfato de plata se considera la proporción 5.5 g  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ /kg de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Ambos reactivos se preparan como indica Standard Methods (1988).

A las muestras se les añade 1.0 mL de la solución digestora y 2.0 mL de la mezcla de ácido con plata. La curva estándar para DQO se prepara con la solución HACH de biftalato de potasio en concentraciones de 0 a 1500 mg/L. Las muestras se digieren durante 2 horas a 150° C y la determinación se hace a 620 nm.

#### 2.2.6.2. Técnica para la determinación de la composición del biogás en reactores continuos.

##### a) Curva estándar de $\text{CH}_4$ - $\text{CO}_2$ .

Para reactores se utiliza una curva estándar de  $\text{CH}_4$ - $\text{CO}_2$  con mezclas de ambos gases que variarán en proporciones de 0 a 100%.

Se prepara solución salina saturada de 300 g  $\text{NaCl}$ /L, disolviendo la sal con  $\text{HCl}$  1N hasta alcanzar pH 3 y se adiciona rojo de metilo como indicador. Con esta solución, se llenan varios tubos Hungate con septo sin dejar burbujas de aire. Con una jeringa de 10 mL, se toma el volumen necesario de gas de los tanques respectivos y se inyectan en las diferentes proporciones, insertando al mismo tiempo una aguja de purga en cada tubo e invirtiéndolo, de tal forma que la solución sea purgada al momento de introducir el gas. El líquido purgado se colecta en una probeta de 10 mL para confirmar que el volumen de líquido desplazado es el mismo que el volumen de gas inyectado. Se preparan triplicados para cada mezcla.

Se toma muestra de la fase gaseosa de estos tubos y se inyecta en el cromatógrafo, siguiendo la técnica 2.1.5.5, b) y 2.1.6.2. Se registran las áreas obtenidas de al menos 10 puntos y se relacionan a las proporciones de los gases. Se hace una correlación lineal entre el % de CH<sub>4</sub> y la fracción de CH<sub>4</sub> en la mezcla total ( $X_{CH_4}$ ) que se calcula de la siguiente manera:

$$X_{CH_4} = \frac{x_{CH_4}}{x_{CH_4} + x_{CO_2}}$$

donde,

$x_{CH_4}$  = a la fracción de metano en el biogás

$x_{CO_2}$  = a la fracción de CO<sub>2</sub> en el biogás

Con esta regresión se determina la composición del biogás que producen los reactores continuos muestreando diariamente.

#### b) Toma de muestra de reactores

La muestra se toma del puerto de muestreo ubicado en los vasos comunicantes del sistema de medición de gas con una jeringa insulínica de 1 mL. Se toma un volumen sobrado para ajustarlo después, se sella herméticamente la jeringa y se hace la determinación por cromatografía de gases según se describió en 2.1.6.2, anteriormente.

2.2.6.3. Técnica para la determinación de la relación de alcalinidades. La relación de alcalinidades se definió en este trabajo, como el cociente entre el volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N gastado al titular a pH 5.75, que corresponde a la titulación de los

bicarbonatos producidos, y el volumen de ácido consumido al titular a pH de 4.3, que corresponde a la alcalinidad indirecta de los ácidos grasos volátiles (AGV) producidos, de una muestra del efluente, como lo indica Noyola (1994). La adición de los volúmenes de la titulación de los bicarbonatos y de los AGV corresponde a la alcalinidad total.

a) Determinación

Se muestrean 25 mL de efluente con pipeta volumétrica y se colocan en un vaso de precipitados en una parrilla de agitación. Se mide el pH de la muestra y se registra. En una bureta de volumen apropiado se coloca el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N. Se inicia la titulación agitando la muestra, vertiendo el ácido y registrando el cambio de pH con el potenciómetro, hasta alcanzar cada uno de los pH indicados. Se registran los volúmenes gastados y el valor de la relación de alcalinidades se calcula como:

$$\text{Relación de Alcalinidades} = \frac{\text{volumen gastado a pH 5.7}}{\text{volumen total gastado a pH 4.3.}}$$

### **2.2.7. Definiciones y cálculos para reactores continuos.**

Los resultados obtenidos en la operación en continuo de los reactores están expresados de acuerdo a los términos definidos en esta sección.

2.2.7.1. Tiempo de retención hidráulico (TRH). Es el tiempo necesario para el recambio del volumen total del reactor.

$$\text{TRH} = \frac{\text{volumen del reactor (L)}}{\text{caudal del influente (L}_d\text{)}} = d$$

2.2.7.2. Eficiencia de remoción de carga orgánica (%). Es la capacidad de remoción de materia orgánica, ya sea disuelta o total, del reactor.

$$\% \text{ Ef. Rem.} = \frac{(\text{DQO entrada} - \text{DQO salida}) (\text{g/L})}{\text{DQO entrada} (\text{g/L})} \times 100$$

2.2.7.3. Carga orgánica volumétrica (Bv). Es la cantidad de materia orgánica suministrada al reactor por unidad volumen y de tiempo.

$$Bv \left( \frac{\text{kg DQO}}{\text{L} \cdot \text{d}} \right) = \frac{\text{caudal del influente (L / d)} \times \text{DQO entrada (kg / L)}}{\text{volumen del reactor (L)}}$$

2.2.7.4. Carga másica (Bx). Es la cantidad de materia orgánica suministrada al reactor relacionada a la cantidad de biomasa presente.

$$Bx = Bv \left( \frac{\text{kg DQO}}{\text{L} \cdot \text{d}} \right) \times \text{vol. reactor (L)} \times \frac{1}{\text{conc. biomasa} \left( \frac{\text{kg SVI}}{\text{m}^3 \text{ soporte}} \right)} = \frac{\text{kg DQO}}{\text{kg biomasa} \cdot \text{d}}$$

2.2.7.5. Actividad específica. Es la cantidad de materia orgánica removida por unidad de biomasa activa presente en el reactor.

$$\text{Act. Esp.} = Bx \times \frac{\% \text{ Ef. Rem.}}{100} = \frac{\text{kg DQO}}{\text{kg biomasa} \cdot \text{d}}$$

# 3

## Inmovilización de bacterias anaerobias en mesofilia (35° C) en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) operado en lote

Como se mencionó en los antecedentes, se han hecho varios trabajos de inmovilización de bacterias anaerobias en lechos fluidificados (Stronach *et al.*, 1987; Gorris *et al.*, 1989; Meier-Schneiders *et al.*, 1993) y el único trabajo desarrollado en el RLFI para la inmovilización ha sido el de González *et al.* (1992).

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos durante la inmovilización en mesofilia de bacterias anaerobias utilizando como sustratos una mezcla de acetato y glucosa y acetato solamente. El lote de partículas inmovilizadas con acetato se adaptó a condiciones termofílicas posteriormente, usando este mismo sustrato.



Estos resultados comprenden la actividad acetoclástica global y específica para cada lote como una manera de representar la evolución del proceso de inmovilización, así como el de adaptación. Para ofrecer una comparación cualitativa, se muestran fotografías de MEB de cada uno de los lotes de biopelículas obtenidos.

Las determinaciones de proteínas solubles y carbohidratos totales como componentes de la biopelícula no resultaron ser congruentes, ya que la suma de estas dos fracciones rebasa o es igual al contenido de SVI en el lote de partículas inmovilizado con acetato y glucosa y en el adaptado a termofilia. Únicamente en el lote de partículas inmovilizadas con acetato la proporción de ambas fracciones representa la mitad de los SVI.

Sin embargo, la relación entre ambos componentes aporta información con respecto a cual de estas fracciones predomina en la biopelícula.

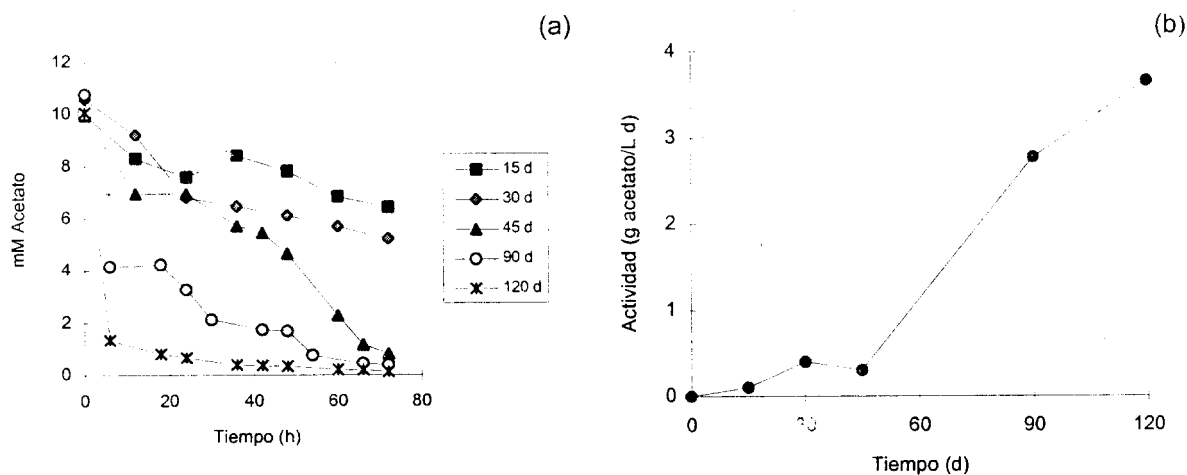
Se determinaron los parámetros cinéticos,  $K_s$  y la actividad específica máxima  $k_{max}$ , a través de una ecuación tipo Monod para cada uno de estos lotes y se encontraron diferencias importantes en los valores obtenidos que indican en cierta medida el tipo de biomasa inmovilizada, aunque no confirman el tipo de microflora observada en las microfotografías.

### 3.1. Inmovilización con Acetato y Glucosa.

#### 3.1.1. Dinámica acetoclástica de partículas inmovilizadas

En un primer experimento, se siguió la dinámica de actividad acetoclástica específica alimentando el reactor con 0.5 g acetato + 0.5 g glucosa/L medio, por un periodo de 120 días. La máxima concentración de biomasa fue de 17.6 mg SVI/g soporte seco.

En la Figura 3.1.a. se presenta el patrón de consumo de acetato de las partículas conforme transcurre el tiempo de inmovilización. En la Figura 3.1.b. se presenta la velocidad de consumo de acetato durante el periodo de inmovilización y se observa una fase de retardo de 45 días y que la actividad acetoclástica global máxima fue de 3.6 g acetato/L·d .



**Figuras 3.1.a y b.** Consumo de acetato (a) y dinámica de actividad acetoclástica (b) de partículas inmovilizadas en mesofilia con acetato y glucosa.

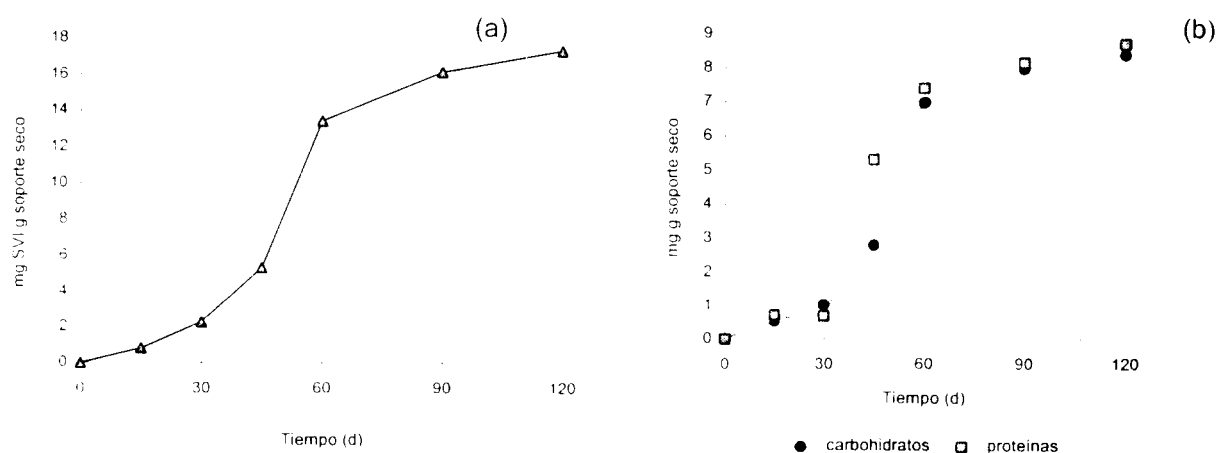
Este valor, como actividad acetoclástica específica disminuye a 1.97 g/g SVI·d

debido a la alta concentración de biomasa encontrada, a la que está relacionada esta expresión.

### 3.1.2. Dinámica de acumulación de biomasa

La acumulación de biomasa se siguió durante el tiempo de inmovilización considerando que representaría los SVI y que estaría formada de exopolímero y células básicamente, y que el exopolímero estaría constituido principalmente por carbohidratos y en menor proporción por proteínas (Costerton *et al.*, 1981).

En esta cinética se encontró que la concentración final de estos compuestos por g de soporte seco fue de 17.59 mg SVI, 8.36 mg de carbohidratos totales y 8.68 mg de proteína soluble. La concentración de estos componentes aumenta conforme transcurre el tiempo de inmovilización y el perfil que siguen todos ellos es de tipo sigmoideal, como puede verse en las Figuras 3.2.a y 3.2.b.



**Figuras 3.2.a. y b.** Cinética de acumulación de biomasa, de síntesis de carbohidratos y proteínas durante la inmovilización de células en biopartículas alimentadas con acetato y glucosa.

Es evidente del análisis de los resultados presentado que la suma de la concentración de proteína soluble y carbohidratos totales final se aproxima a la concentración de SVI. Tal incongruencia se ha encontrado anteriormente en trabajos de Mendoza y García (1990), Urbain *et al.* (1993), Schmidt y Ahring (1994) y Fajardo (1997), ya que Dolfing *et al.* (1985), Grotenhuis *et al.* (1991), Guiot *et al.* (1991) y Shen *et al.* (1993) han reportado que el material exopolimérico, constituye del 2 al 23% de los SSV en lodos granulares.

La formación de la biopelícula está asociada al crecimiento celular y se distingue claramente en ambas Figuras las tres fases características: retardo, crecimiento exponencial y estacionaria. En este caso, la fase de retardo que dura 30 días, puede interpretarse como la fase en la que algunas células se depositan en la superficie del soporte e inician la producción de exopolímero, es decir la fase de adhesión irreversible señalada por Guiot (1992). La fase de crecimiento exponencial, que dura 30 días, en la que se presenta la máxima velocidad de formación de biopelícula, corresponde a la fijación celular, reproducción, síntesis de exopolímero y desprendimiento celular. Y finalmente, la fase estacionaria donde se alcanza el máximo grosor de la biopelícula y el equilibrio entre la fijación, reproducción celular y desprendimiento.

La relación que existe entre el contenido de carbohidratos con respecto a los SVI de 0.49 g /g, lo que indica que la mitad de la biopelícula formada esta constituida de carbohidratos y concuerda con lo señalado por Guiot (comunicación personal).

La cantidad de proteína encontrada representa alrededor de un 60% del material orgánico de la biopelícula y la relación proteína/carbohidrato encontrada es de 1.03. La suma del contenido de carbohidratos y proteínas representa casi el total de la fracción volátil, expresada aquí como SVI. La relación SVI/STI es cercana a 1.0, indicando que prácticamente toda la biopelícula está constituida por material orgánico.

Por otro lado, debe hacerse notar que cuando la inmovilización de biomasa se encuentra en fase exponencial se presenta la finalización de la fase de retardo de la dinámica acetoclástica, como puede verse en las Figuras 3.1.b. y 3.2.a.

### **3.1.3. Descripción de muestras observadas en MEB**

Las imágenes obtenidas por MEB de estas biopartículas muestran una densa colonización de bacterias cocoides y bacilares de extremos planos tipo *Methanosaeta*, embebidas en los grupos de cocos, como puede apreciarse en las Figuras 3.3.a, 3.3.b y 3.3.c.

Sin embargo, la predominancia de bacterias tipo *Methanosarcina* desde el inicio de la inmovilización, contradice la hipótesis de que es *Methanosaeta* el principal género que inicia la granulación y la inmovilización. Por lo tanto, cabe considerar la posibilidad de que se trate también de bacterias acidógenas fermentadoras de glucosa y que pueden producir sustancias exopoliméricas que ayudarán en la fijación de metanógenas, como lo ha reportado antes Meier-Schneiders *et al.* (1993).



**Figuras 3.3.a, b, c y d.** Imágenes de MEB de biopartículas mesofílicas alimentadas con acetato y glucosa. (a) Colonización del soporte después de 60 días de inmovilización. Nótese la abundancia de cocos. (b) Colonización del soporte después de 120 días de inmovilización. Nótese la densidad y diversidad de la biomasa. (c) Acercamiento de la Figura anterior. (d) Colonización del soporte después de 60 días de inmovilización. Obsérvense las bacterias tipo *spirochaeta* entre las bacterias bacilares y cocoides.

En la Figura 3.3.d, las flechas indican un grupo que no se observó en los otros sistemas de inmovilización, probablemente perteneciente al género *Spirochaeta* que se ha reportado como parásito en lodos anaerobios (Prensier *et al.*, 1988 y Howgrave-Graham *et al.*, 1991).

### 3.2. Inmovilización con Acetato.

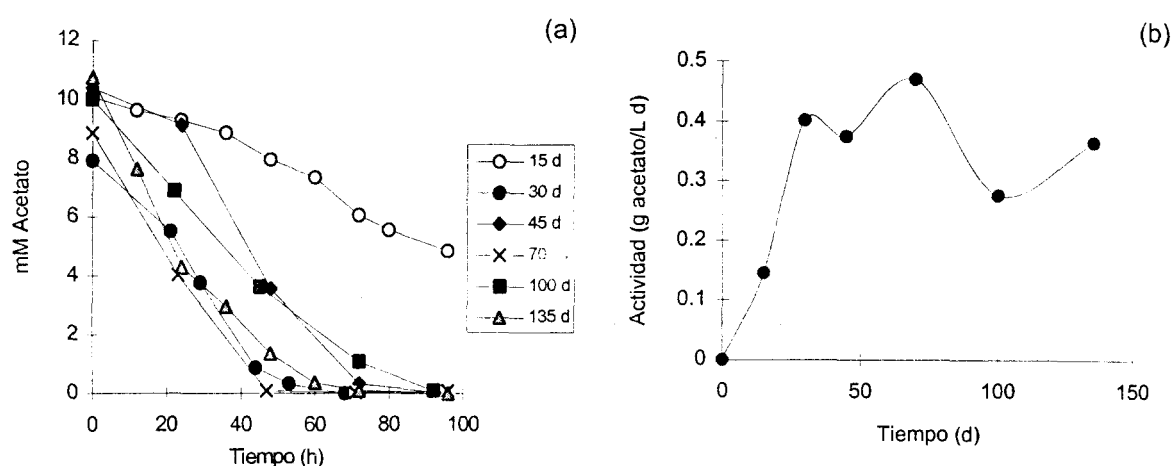
#### 3.2.1. Dinámica acetoclástica y acumulación de biomasa.

Este experimento se llevó a cabo alimentando el reactor con 1 g acetato/L y duró 135 días. En este sistema se encontraron en el día 70 las concentraciones máximas de las fracciones analizadas de la biopelícula, que en mg/g de soporte seco fueron: proteína, 0.37; carbohidratos, 0.32; SVI, 1.23 y la fracción de componentes del exopolímero representa el 56% de la biomasa inmovilizada. La relación SVI/STI es de 0.62 y la relación proteínas/carbohidratos de 1.15.

Las bajas concentraciones encontradas indican poca biomasa inmovilizada, lo que hizo que la velocidad global de consumo de acetato para estas biopartículas fuera 8 veces menor que en el experimento anterior, como puede verse en la Figura 3.4.a. La actividad acetoclástica global máxima obtenida durante el periodo de inmovilización fue de 0.47 g acetato/L·d, como puede verse en la Figura 3.4.b, mientras que la actividad específica máxima fue de 5.4 g acetato/g SVI·d. Este último valor es casi 3 veces mayor que en el experimento anterior.

La curva de actividad acetoclástica tiene dos fases distinguibles: una primera fase de inmovilización y una segunda fase después de 30 días, donde se alcanza un estado estacionario.

Después de una inmovilización inicial de células, la síntesis de biomasa y de material exopolimérico para la formación de la biopelícula se lleva a cabo lentamente debido a que el sustrato utilizado libera poca energía (menos de 1 mol ATP/mol acetato).

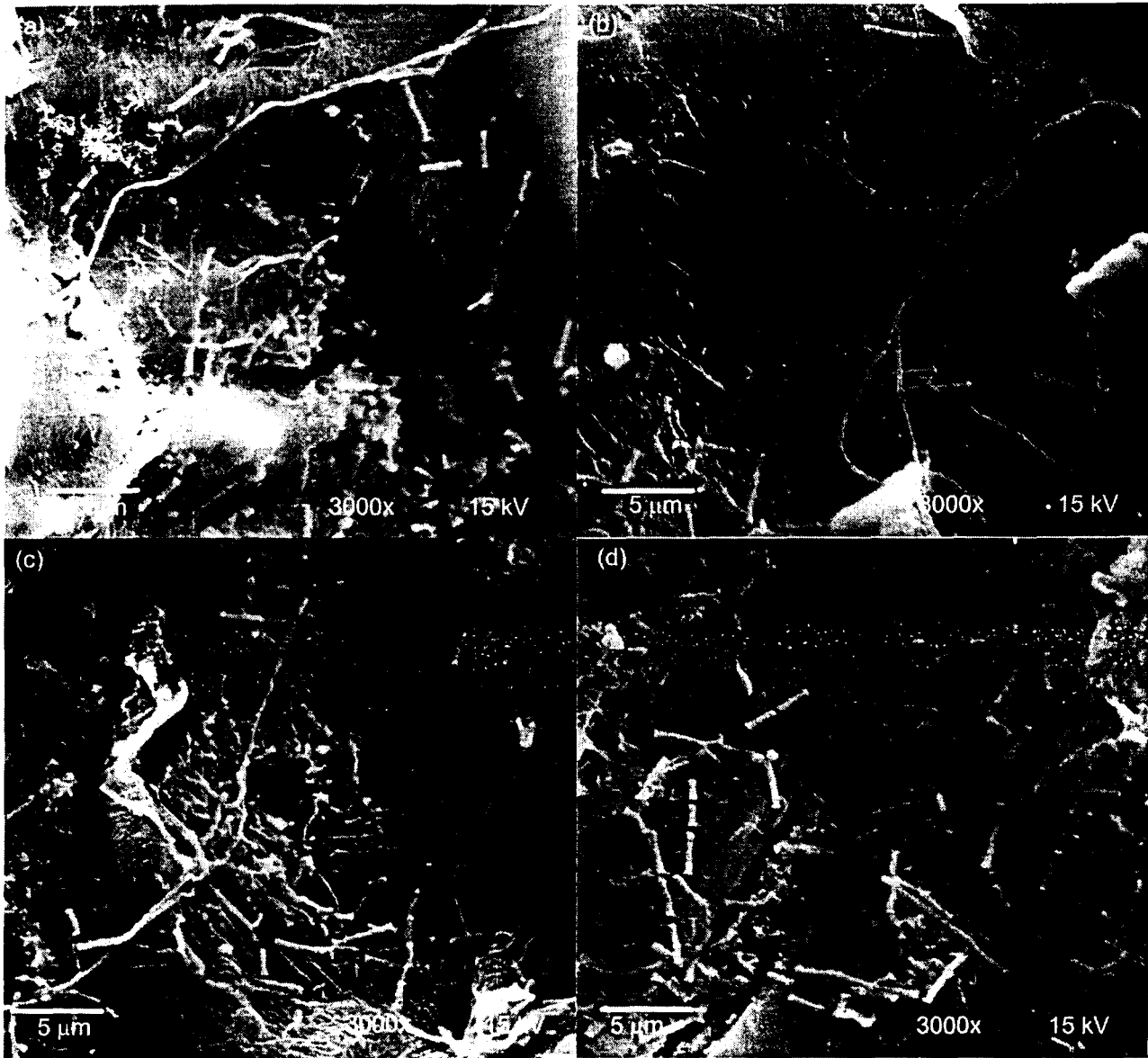


**Figuras 3.4.a. y b.** Consumo de acetato (a) y dinámica de actividad acetoclástica (b) de partículas mesofílicas alimentadas con acetato.

### 3.2.2. Descripción de imágenes de MEB

En las Figuras 3.5.a, 3.5.b y 3.5.c se muestran fotografías del soporte colonizado. Se aprecia que el grupo predominante corresponde a bacterias bacilares de extremos planos tipo *Methanosaeta* y aunque en el microscopio óptico con epifluorescencia se observó que el inóculo contenía bacilos similares y cocos, estos últimos se inmovilizaron escasamente. Este resultado podría indicar que existe la posibilidad de que los cocos presentes en el inóculo sean bacterias acidógenas fermentativas, que

no se fijaron en este experimento debido a la falta de una fuente de carbono apropiada, tal como la glucosa.



**Figuras 3.5.a, b, c y d.** Imágenes de MEB de biopartículas inmovilizadas en mesofilia (35° C) alimentadas con acetato. (a) y (b) Colonización del soporte por filamentos largos de bacterias bacilares. (c) Los mismos filamentos en un hueco del soporte. (d) Estructuras bacilares con extremos aplanados o con forma de "bambú" característica de bacterias tipo *Methanosaeta* mesofílica.

El mecanismo de adhesión fue principalmente la formación de filamentos largos (Figuras 3.5.a y 3.5.b). Esto es debido probablemente a la baja concentración de sustrato utilizado que en el caso de *Methanosaeta*, forma estas estructuras (Speece, 1986).

También ha sido reportado anteriormente por Robinson *et al.* (1984), Gorris *et al.* (1989) y por Zellner *et al.* (1994) que la predominancia de *Methanosaeta* en soportes colonizados es debido a la formación de estas estructuras.

Es importante recordar que se obtuvo una muy baja cantidad de biomasa fijada, lo que se confirma en estas imágenes y no se observó abundancia de sustancias exopoliméricas o cualquier otro material amorfo o fibroso. Igualmente, se aprecia una pobre colonización de microorganismos en la superficie del soporte. Aparentemente, las partículas están colonizadas solamente en las cavidades que ofrecen un nicho con poca turbulencia (Figura 3.5.c).

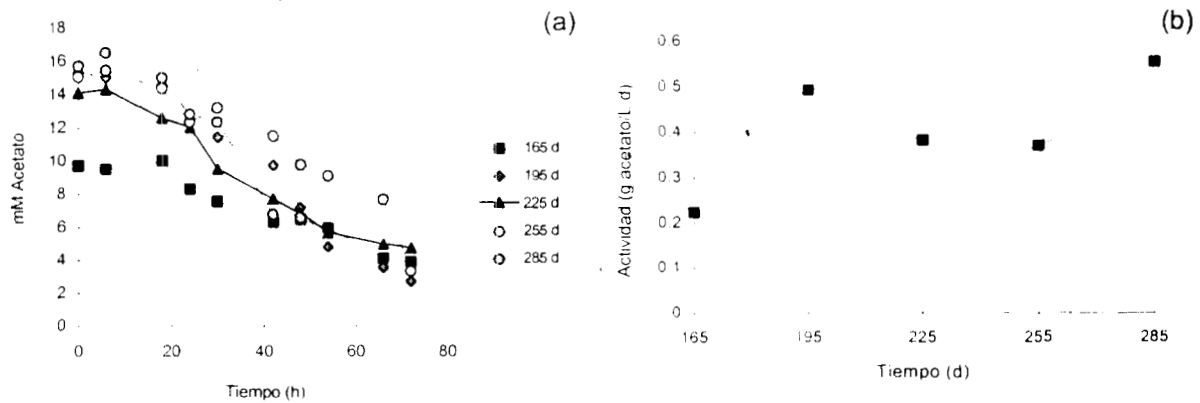
### **3.3. Adaptación de Biopartículas Mesofílicas a Termofilia.**

#### **3.3.1. Dinámica de actividad acetoclástica**

El lote de biopartículas del experimento anterior fue adaptado a termofilia a partir del día 135, aumentando la temperatura paulatinamente por un periodo de 30 días de 35° a 45° C a razón de 1° C/día y de 45° a 55° C a razón de 0.5°/día. Después de

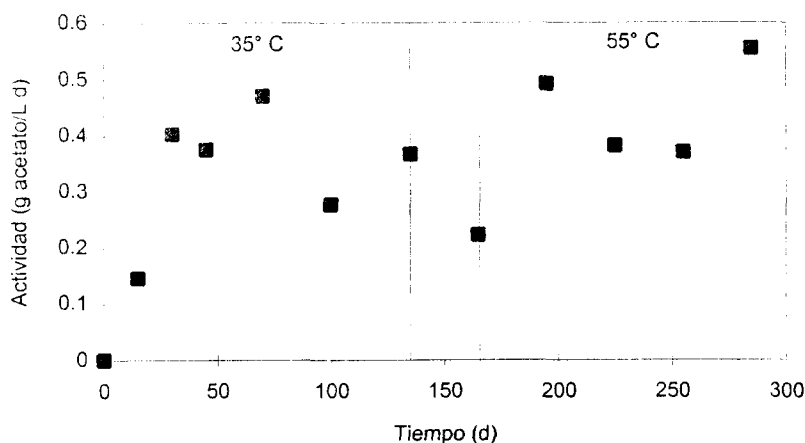
165 días y al alcanzar 55° C, la condición se mantuvo por 120 días. El reactor se alimentó con 1 g acetato/L medio durante todo el proceso.

El patrón de consumo de acetato es similar en termofilia y en mesofilia, como puede verse comparando las Figuras 3.4.a y 3.6.a. Sin embargo, la actividad acetoclástica global disminuyó al alcanzar los 55° C con respecto a la que tenían las biopartículas antes de la adaptación, y se recuperó a lo largo de los 120 días posteriores de tratamiento como puede verse en la Figura 3.6.b:



**Figuras 3.6.a y b.** Consumo de acetato (a) y dinámica acetoclástica (b) de partículas mesofílicas mantenidas en condiciones termofílicas.

La actividad acetoclástica global resultó ser mayor al final de este periodo que la que se obtuvo durante la inmovilización en mesofilia, con un valor de 0.55 g acetato/L.d, como puede verse en la Figura 3.7.

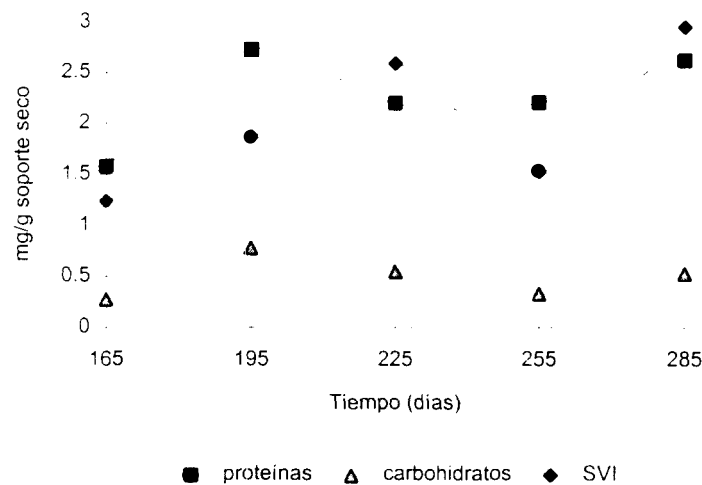


**Figura 3.7.** Comparación de actividades específicas antes (35 °C) y después de la adaptación (55 °C). El periodo durante el cual se llevó a cabo el aumento paulatino de temperatura esta indicado por las líneas divisorias.

Sin embargo, la actividad acetoclástica específica máxima disminuyó a 3.7 g acetato/g SVI·d debido a que la biomasa se incrementó a 2.43 mg SVI/g soporte seco.

### 3.3.2. Dinámica de acumulación de biopelícula

Se encontró que la cantidad de SVI y proteína aumentó en 42 y 60% respectivamente y los carbohidratos en un 52%, con respecto al lote de donde provienen esta biopartículas, como se muestra en la Figura 3.8, indicando que la temperatura estimula la producción de biopelícula. Las concentraciones finales alcanzadas en g de soporte seco fueron de 2.95 mg de SVI, 2.61 mg de proteína y 0.52 mg de carbohidratos.



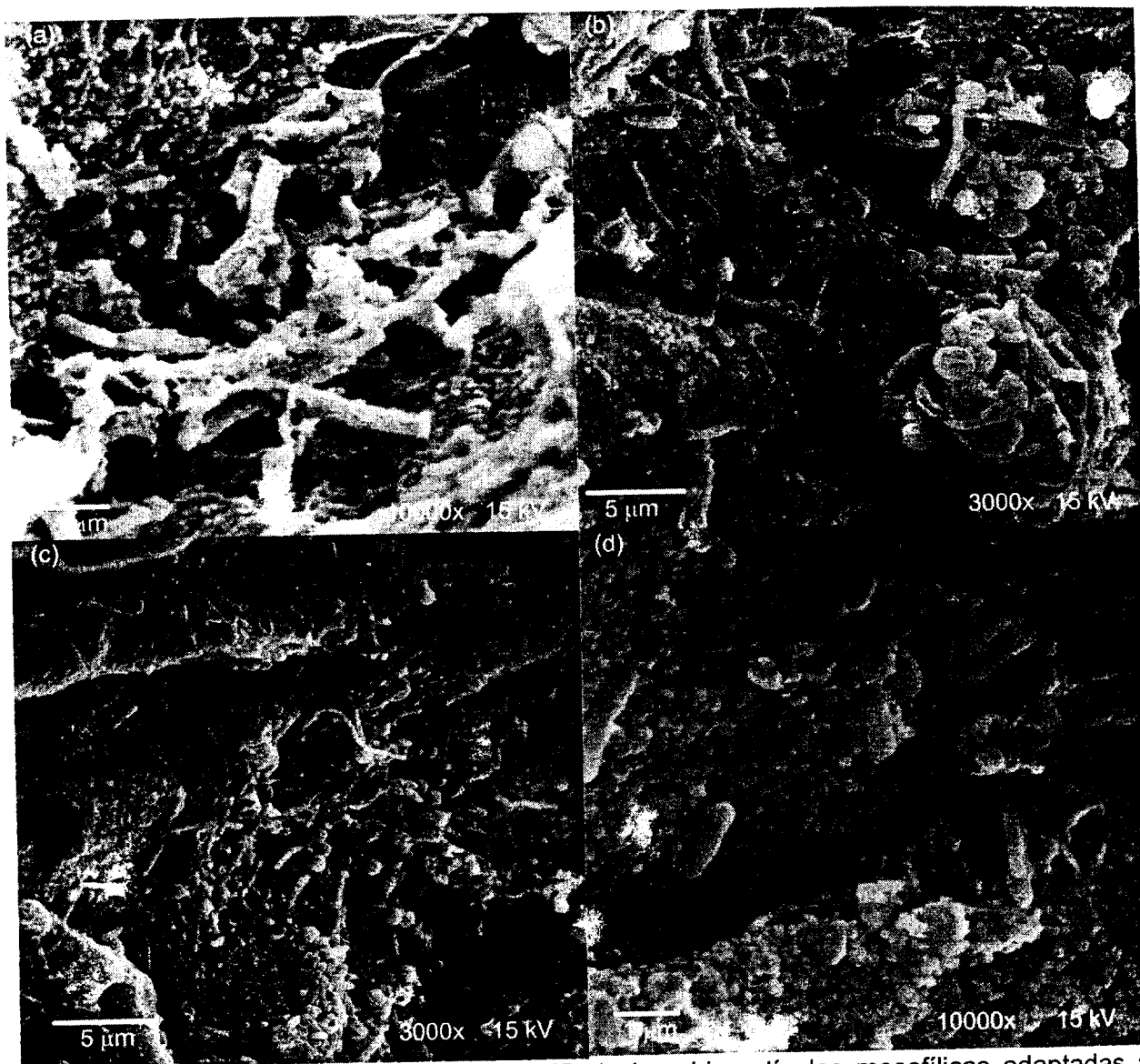
**Figura 3.8.** Evolución de la concentración de proteínas, carbohidratos y SVI de biopartículas adaptadas a termofilia.

En este caso, la suma de las fracciones de proteína y carbohidratos, rebasa el valor obtenido de SVI. Sin embargo, la relación proteínas/carbohidratos aumentó a 5.01, indicando la calidad proteica de la biopelícula.

La biopelícula formada en mesofilia resistió el proceso de adaptación y el tiempo en que se mantuvo la condición termofílica, lo que indica que efectivamente funciona como matriz acarreadora. Esto se confirma con el hecho de que la relación SVI/STI se mantiene casi constante en un valor de 0.65.

### 3.3.3. Descripción de imágenes obtenidas en MEB.

En las imágenes obtenidas por MEB, se encontró que la población era escasa como sucedió con el lote anterior, de donde estas biopartículas provienen. En la Figura 3.9.a, se muestran bacterias de tipo *Methanosaeta* encontradas al momento de



**Figuras 3.9.a, b, c y d.** Imágenes de MEB de las biopartículas mesofílicas adaptadas a termofilia alimentadas con acetato. a) Bacterias fijadas en las partículas de soporte al iniciar el periodo de termofilia después de la aclimatación. (b) y (c) Biopartículas después de 60 días en termofilia. Obsérvese el cambio de forma de las estructuras bacilares y la diversidad de bacterias, en particular la abundancia de cocos. (d) Acercamiento donde se observa el material granuloso que cubre la superficie del soporte y sobre el cual están adheridas las bacterias.

haber alcanzado la condición termofílica y en las Figuras 3.9.b y 3.9.c, se muestran bacterias de este mismo tipo y cocos de formas diversas encontrados en las biopartículas después de 60 días a 55° C. En las bacterias bacilares se modificaron los extremos aplanados característicos de *Methanosaeta* mesófila a estructuras con extremos redondeados y se encontraron numerosas células de tamaño pequeño en división. En la Figura 3.9.d, se aprecia un material granular amorfo al que aparentemente están adheridas las bacterias que solamente se encontró en este lote de biopartículas y que no se ha identificado aunque podría tratarse de material exopolimérico. Cabe recordar que en este lote de biopartículas, se obtuvieron tres veces más sólidos volátiles por gramo de soporte seco que en el lote anterior, que no necesariamente es biomasa activa y que pudiera ser material exopolimérico.

### 3.4. Parámetros Cinéticos

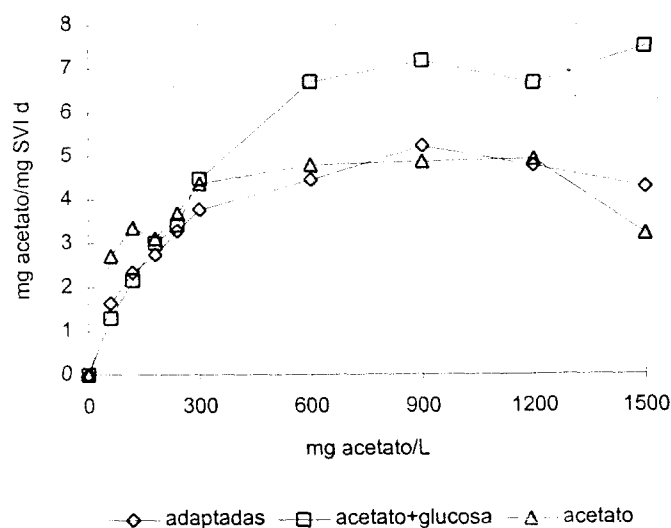
La determinación de parámetros cinéticos para estos tres experimentos se hizo con concentraciones de 60, 120, 180, 240, 300, 600, 900, 1200 y 1500 mg acetato/L.

En general, el patrón de consumo de acetato para las diferentes concentraciones y los tres lotes de partículas probados resultó ser similar la cinética de Monod. Dada esta similitud, las velocidades de consumo de acetato para cada concentración se

trataron como actividad acetoclástica específica considerando que  $k = k_{max} \frac{S}{K_s + S}$ ,

donde  $k$  es la actividad acetoclástica específica en  $\frac{\text{g acetato}}{\text{g SVI} \cdot \text{d}}$ ;  $k_{max}$  es la actividad acetoclástica específica máxima;  $K_s$  es la constante de afinidad al sustrato y  $S$  es la concentración de sustrato, ambas en g acetato/L.

Esta cinéticas mostraron que para concentraciones de acetato de 60 a 250 mg/L se obtienen velocidades específicas de degradación bajas para los tres lotes de partículas muy similares entre sí, como se muestra en la Figura 3.10.



**Figura 3.10.** Velocidad específica de consumo de acetato de tres lotes de biopartículas; adaptadas a termofilia con acetato, inmovilizadas en mesofilia con acetato y glucosa e inmovilizadas en mesofilia con acetato.

Aparentemente, la máxima actividad para el lote de partículas inmovilizadas con acetato se obtiene en un intervalo de 600 a 1200 mg/L y con 1500 mg/L disminuye la velocidad, lo que indica una probable inhibición. Estas mismas biopartículas

adaptadas a termofilia, alcanzan la máxima actividad en 900 mg/L y posteriormente la velocidad decae. Finalmente, la más alta actividad específica se tiene para el lote inmovilizado con acetato y glucosa con 1500 mg/L.

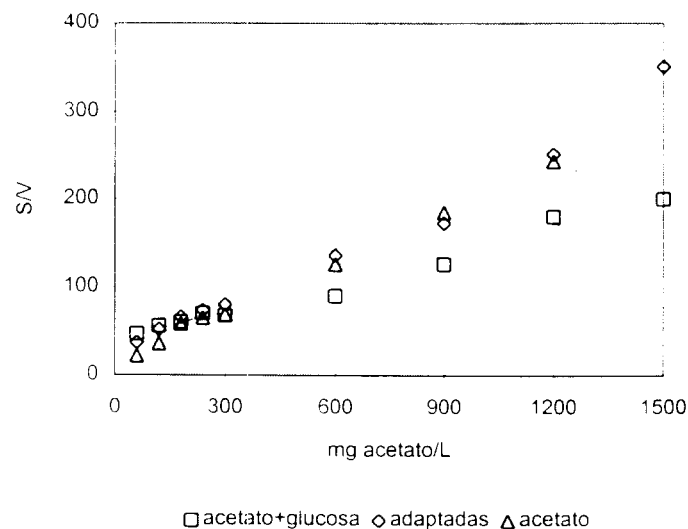
Sin embargo, las constantes cinéticas que se obtuvieron por medio de la linearización de estos datos a través de la modificación de Hanes-Woolf reportan valores diferentes. Ya que para el experimento en el que se inmovilizo con acetato y

glucosa se tiene una  $k_{max}$  de  $10.5 \frac{\text{g DQO}}{\text{g SVI} \cdot \text{d}}$  y una  $K_s$  de 359 mg DQO/L. Para la

inmovilización llevada a cabo con acetato la  $k_{max}$  fue de  $2.7 \frac{\text{g DQO}}{\text{g SVI} \cdot \text{d}}$  y la  $K_s$  de 87

mg DQO/L y para las partículas adaptadas con acetato a 55 °C fue de  $5.6 \frac{\text{g DQO}}{\text{g SVI} \cdot \text{d}}$

y 105 mg DQO/L, como se muestra en la Figura 3.11.



**Figura 3.11.** Linearización por la modificación de Hanes-Woolf para las cinéticas de consumo de acetato de tres lotes de biopartículas inmovilizadas.

La correlación para los resultados obtenidos de cada lote de partículas fue cercana a 0.9, debido a que esta modificación es apropiada cuando se utilizan concentraciones que tienen una distribución homogénea (Segel, 1982).

En la Tabla 3.1. se comparan los valores de  $K_s$  y  $k_{max}$  obtenidos para estas biopartículas con algunos datos reportados en la literatura para los géneros de *Methanosaeta* y *Methanosarcina*.

**Tabla 3.1.** Comparación de valores de parámetros cinéticos  $K_s$  y  $k_{max}$  obtenidos en este trabajo y entre referencias.

|                          |                                                | $k_{max}$<br>(mg DQO/mg SVI·d) | $K_s$<br>(mg DQO/L) | Referencia                             |
|--------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------------------|
| Mesofilia<br>(35° C)     | <i>Methanosaeta</i>                            | 2.9-6.1                        | 11-30               | Pavlostathis y<br>Giraldo-Gómez (1991) |
|                          |                                                | nr                             | 45-76               | Guyot <i>et al.</i> (1990)             |
|                          |                                                | nr                             | 20                  | Kuba <i>et al.</i> (1990)              |
|                          | <i>Methanosarcina</i>                          | 4.5                            | 38                  | Jetten <i>et al.</i> (1992)            |
|                          |                                                | 5.9-12                         | 320                 | Pavlostathis y<br>Giraldo-Gómez (1991) |
|                          |                                                | nr                             | 320                 | Guyot <i>et al.</i> (1990)             |
| Termofilia<br>(55-65° C) | <i>Methanothrix</i><br><i>thermoacetophila</i> | 9.8                            | 191                 | Jetten <i>et al.</i> (1992)            |
|                          |                                                | nr                             | 9.5                 | Zinder y Mah (1979)                    |
|                          |                                                |                                |                     | Touzel <i>et al.</i> (1985)            |
|                          | <i>Methanosarcina</i><br><i>thermophila</i>    | nr                             | 445                 | Zinder <i>et al.</i> (1985)            |
|                          |                                                |                                |                     | Min y Zinder (1989)                    |
|                          |                                                |                                |                     | Zinder (1990)                          |
| Este<br>trabajo...       | mesofilia con<br>acetato : glucosa             | 9.3                            | 356                 | Kamagata y Mikami (1991)               |
|                          | mesofilia<br>con acetato                       | 5.3                            | 81                  |                                        |
|                          | adaptadas a<br>55° C con acetat                | 5.0                            | 107                 |                                        |

nr: no reportado

Para el sistema inmovilizado con acetato y glucosa, el valor de  $K_s$  obtenido parece indicar la predominancia de *Methanosarcina* en la biopelícula, lo cual coincide con

las imágenes de MEB de las Figuras 3.3, mostradas anteriormente. La actividad específica máxima es la más alta de los tres lotes probados.

Para el lote alimentado con acetato, se obtuvo un valor de  $K_s$  cercano a los valores reportados para *Methanosaeta*, que también coincide con las fotografías de MEB mostradas en las Figuras 3.5.

Para el lote adaptado a termofilia puede verse que la actividad específica es similar a la del lote anterior así como el valor de  $K_s$ , lo que indica que si bien la adaptación no mejoró las características cinéticas de este lote, tampoco disminuyó la actividad.

### 3.5. Discusión

La inmovilización en mesofilia utilizando una fuente de carbono que libera una alta cantidad de energía al ser hidrolizada, como la glucosa (4 ATP/mol en condiciones anaerobias), resulta en biopartículas con alta actividad acetoclástica global, mayor cantidad de biomasa inmovilizada y promueve la síntesis de sustancias exopoliméricas.

Las bacterias cocoides observadas en las microfotografías pueden ser bacterias acidógenas productoras de sustancias exopoliméricas que se desarrollaron debido a la adición de glucosa. También puede tratarse de cocos tipo *Methanosarcina* ya que la hidrólisis de la glucosa por bacterias acidogénicas, resulta en dos moles de acetato aumentando la concentración de este sustrato y que favorece el desarrollo

de estos microorganismos como Ehlinger *et al.* (1987) han señalado. Adicionalmente, la acetogénesis a partir de 1 mol de glucosa produce 4 moles de  $H_2$  y 2 moles de  $HCO_3^-$ , sustratos que podrían ser utilizados también por *Methanosarcina* durante la metanogénesis, con la producción de 1 mol de ATP por mol de  $CH_4$  (Vogels *et al.*, 1988, Müller *et al.*, 1993) así como por algunas especies del género *Methanococcus* (García, 1990).

La inmovilización en mesofilia con acetato da como resultado una baja velocidad acetoclástica. Las fotografías de MEB muestran que se obtiene una escasa producción de exopolímero y el mecanismo de inmovilización de los bacilos fue por medio de la formación de filamentos largos sobre la superficie del soporte. Speece (1996) ha señalado que este tipo de crecimiento es característico de *Methanosaeta* cuando existen bajas concentraciones de sustrato en la operación de reactores.

Adicionalmente, *Methanosaeta* es exclusivamente acetoclasta y la metanogénesis a partir de acetato tiene el valor más pequeño de  $\Delta G^\circ$  (-31.0 kJ/mol), por lo tanto, se sintetizará menos de 1 mol de ATP por mol de  $CH_4$  formado. La baja producción de energía dará como resultado baja producción de biomasa y exopolímero.

Además de esta característica metabólica, se debe considerar que para la síntesis de carbohidratos como la glucosa-6-P se requieren en teoría  $82 \times 10^{-4}$  mol ATP/g célula seca y  $10 \times 10^{-4}$  mol ATP más, para la polimerización de carbohidratos. Por otro lado, la síntesis de aminoácidos y su polimerización requiere de  $427 \times 10^{-3}$  mol ATP/g células secas (Vogels *et al.*, 1988).

Cabe señalar que el sistema alimentado con acetato tiene una relación entre los sólidos volátiles y totales, 35% más baja que el sistema alimentado con acetato y glucosa. Debido a estos antecedentes y a la adición de este sustrato en bajas concentraciones, no puede esperarse la formación de una gran masa celular ni de sustancias exopoliméricas.

La probable presencia de *Methanosaeta* para los experimentos llevados a cabo, puede ser explicada de lo reportado por Verrier *et al.* (1988), que demostró que este microorganismo tiende a inmovilizarse sobre este soporte debido a su hidrofobicidad, por lo que el mecanismo de adhesión es inicialmente por medio de uniones hidrofóbicas. *Methanosaeta* se ha reportado extensamente como el primer microorganismo involucrado en la formación de gránulos y biopelículas debido a la característica filamentosa y prevalece sobre *Methanosarcina* (Gorris *et al.*, 1989 y Zellner *et al.*, 1994), ya que los filamentos pueden formar una red tridimensional. En cambio, *Methanosarcina* es una bacteria hidrofílica que forma agregados redondos y se inmovilizará inicialmente en zonas sin turbulencia excesiva (Verrier *et al.*, 1988). En las imágenes mostradas en la Figura 3.3.a, se observa que la colonización por bacterias cocoides se llevó a cabo en las cavidades del soporte. En este caso particular, la predominancia cualitativa de cocos sobre bacilos tipo *Methanosaeta* que están inmersos en la biomasa contradice lo señalado por Robinson *et al.* (1984), que ha encontrado que este bacilo frecuentemente está en la superficie de las biopelículas rodeando como con una red a los cúmulos de *Methanosarcina*.

La adaptación de las partículas mesofílicas a condiciones termofílicas, resultó en un incremento global de sólidos de alrededor del 40%. La relación entre sólidos volátiles y totales cambió ligeramente, indicando que la biopelícula mantiene su fracción orgánica y que funciona realmente como matriz acarreadora de microorganismos, ya que resistió la aclimatación y la condición termofílica durante el periodo de experimentación.

La velocidad de consumo de acetato se incrementó después de 120 días en termofilia, sugiriendo que los microorganismos se adaptaron a la condición. Estos resultados son comparables con los de van Lier *et al.* (1992 y 1993) que encontró un decremento en la actividad de reactores UASB al momento en que la condición termofílica se alcanzó y una recuperación posterior. Sin embargo, tuvo pérdida de granulación del lodo y consecuentemente lavado de sólidos, lo que finalmente hizo disminuir la actividad específica del reactor. El cambio de estructura en gránulos mesofílicos adaptados a termofilia, también ha sido reportado por Rintala *et al.* (1993), señalando la pérdida de la estructura compacta de los gránulos y una disminución en la relación de sólidos volátiles a totales.

Los resultados en esta investigación muestran que la actividad tiende a aumentar y la relación de sólidos se mantiene prácticamente en el mismo valor, lo que indica que la estructura de la biopelícula resistió la aclimatación. Probablemente esto sea debido al cambio en la naturaleza de la biopelícula, en la cual predominan las proteínas.

Los parámetros cinéticos obtenidos para estos lotes de biopartículas, señalan al grupo acetoclástico metanogénico presente en la biopelícula que también se confirma con las fotografías de MEB. Para las partículas inmovilizadas con acetato, predomina bacterias tipo *Methanosaeta*; para las biopartículas mesofílicas adaptadas a termofilia, aumenta la velocidad máxima dentro del intervalo reportado para *Methanosaeta* y para la inmovilización llevada a cabo con glucosa y acetato, los parámetros están dentro del intervalo de valores reportado para *Methanosarcina*.

### 3.6. Conclusiones

En estos experimentos se demuestra que la inmovilización en mesofilia alimentada con un sustrato exclusivamente metanogénico y en bajas concentraciones lleva a una escasa colonización y menor actividad acetoclástica. La adaptación de biopartículas mesofílicas a termofilia es favorable, ya que se sintetizó biomasa que permanece inmovilizada en el soporte, por lo que ésta sería una opción viable para disminuir los efectos de pérdida de actividad y sólidos en reactores con biomasa suspendida. Es decir, la biopelícula es capaz de adaptarse a las nuevas condiciones, de donde se concluye que la inmovilización puede utilizarse como un paso confiable para la estabilización de biomasa en condiciones termofílicas.

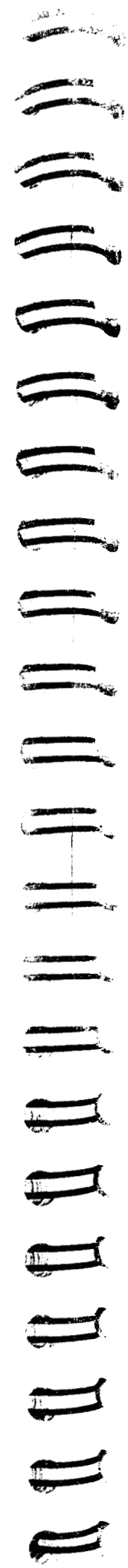
La inmovilización con acetato y glucosa se ve favorecida en actividad acetoclástica y acumulación de biomasa debido a la presencia de un sustrato de alto rendimiento energético, mismo que ayudaría a disminuir los tiempos de inmovilización. Las imágenes de MEB no permiten identificar al género de bacterias presentes en la biopelícula, pero dados los sustratos alimentados y las características obtenidas de este lote de partículas, puede creerse que se tienen tanto bacterias acidógenas así como bacterias tolerantes a altas concentraciones de acetato tal como *Methanosarcina*, y otras capaces de metabolizar  $H_2$  y  $CO_2$  proveniente de la hidrólisis de la glucosa. Igualmente, se concluye que dado el valor de  $k_{max}$  obtenido, este sistema sería capaz de tolerar altas cargas orgánicas, por lo que se consideró para la operación de reactores continuos, como se verá más adelante.

# 4

## Inmovilización de bacterias anaerobias en termofilia (55° C) en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) en lote

En la Justificación se señaló que no existen antecedentes de inmovilización en condiciones termofilicas y es en este desconocimiento en donde reside la importancia de esta parte de la investigación.

Este Capítulo esta estructurado de la misma manera que el anterior y se presentan los resultados obtenidos durante la inmovilización en termofilia de bacterias anaerobias provenientes de lodos mesofílicos adaptados previamente a termofilia, utilizando para este propósito en uno lote una mezcla de acetato y glucosa y para el otro, acetato solamente.



Como una forma de representar el proceso de inmovilización se presentan la actividad acetoclástica global y específica para cada lote.

Se encontrará que las concentraciones obtenidas para las fracciones de proteínas y carbohidratos rebasan con mucho el contenido de SVI, por lo que se consideran incongruentes. Sin embargo, se verá que la relación proteínas/carbohidratos indica el principal componente que predomina en el material extraído como sustancias exopoliméricas.

Aún así, los resultados mostraron actividades globales y específicas menores a las encontradas para los lotes de biopartículas discutidos en el Capítulo anterior.

La comparación cualitativa entre biopartículas se hace nuevamente con fotografías de MEB de cada uno de los lotes.

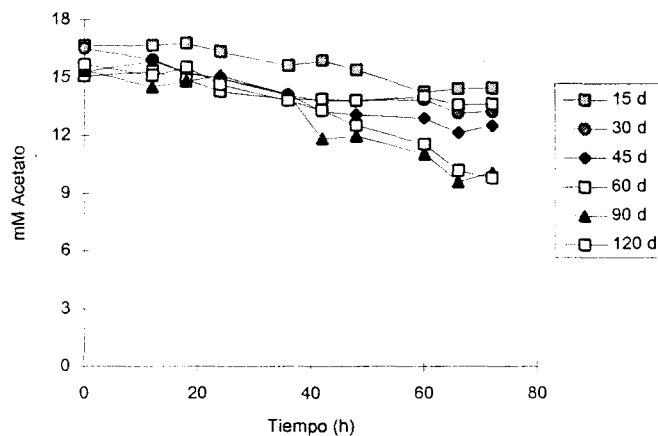
Finalmente se presenta una Tabla donde se resumen y comparan los resultados obtenidos durante los experimentos de inmovilización, tanto en mesofilia como en termofilia.

## 4.1. Inmovilización con Acetato y Glucosa

### 4.1.1. Dinámica de actividad acetoclástica

En el primer experimento, inoculado con el lodo adaptado, la inmovilización se llevó a cabo alimentando el reactor con 0.5 g acetato + 0.5 g glucosa/L medio.

Se evaluó la velocidad de consumo de acetato por 120 días y se encontró que la máxima concentración de acetato consumido en las cinéticas fue de 3 mM como se puede ver en la Figura 4.1, resultando en una actividad acetoclástica global de 0.21 g acetato/L·d.

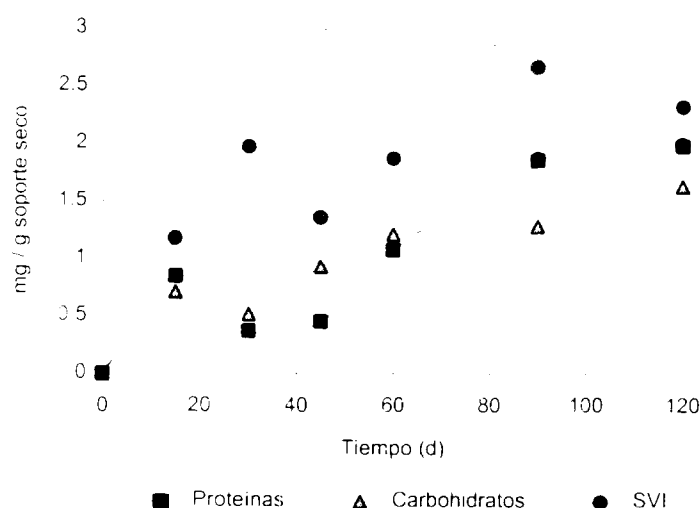


**Figura 4.1.** Cinética de consumo de acetato durante el periodo de inmovilización en termofilia de partículas inmovilizadas con acetato y glucosa.

La biomasa inmovilizada fue de 2.31 mg SVI/g soporte seco con la que se obtuvo una actividad específica de 1.29 g acetato/g SVI·d. La relación SVI/SVT fue cercana al experimento mesofílico análogo, con un valor de 0.83, sugiriendo nuevamente la acumulación de material orgánico en la biopelícula.

### 4.1.2. Dinámica de Acumulación de Biomasa

La acumulación de biopelícula se muestra en la Figura 4.2, en donde se observa que el patrón de inmovilización es creciente y poco relacionado con el de tipo sigmoidal propio del crecimiento microbiano. La fijación inicial de biomasa, decae ligeramente después de 30 días de inmovilización, para aumentar conforme transcurre el tiempo de inmovilización



**Figura 4.2.** Acumulación de biopelícula en biopartículas inmovilizadas en termofilia con acetato y glucosa.

Sin embargo, la concentración final de biomasa encontrada expresada como SVI fue muy baja, si se compara con las partículas mesofílicas inmovilizadas con glucosa y acetato. Cerca del 50% fueron carbohidratos, ya que en g de soporte seco se obtuvieron 1.62 mg de carbohidratos y 1.97 mg de proteína, para una relación proteínas/carbohidratos de 1.21.

A pesar de que se tiene un patrón similar para el aumento en la concentración de estas fracciones con respecto a los SVI, la suma de ambas, rebasa el contenido de éstos últimos.

Del análisis de los resultados obtenidos y presentados en la Figura 4.2, se desprende que durante el proceso de inmovilización existe una relación constante entre los carbohidratos presentes y los SVI, con un valor de 0.7. En cambio, entre proteínas y SVI la relación aumenta hacia el final del periodo de inmovilización alcanzando 0.85, sugiriendo que la fracción proteica predomina en la naturaleza de esta biopelícula.

## 4.2. Inmovilización con Acetato

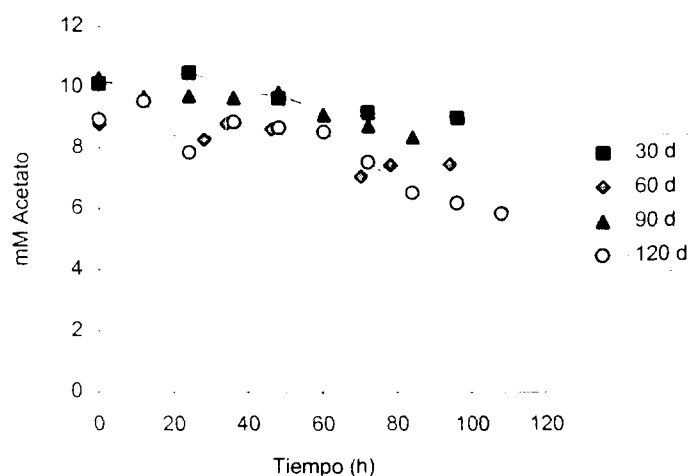
### 4.2.1. Dinámica de actividad acetoclástica y acumulación de biomasa.

En este caso el reactor fue alimentado con 1 g acetato/L y también se siguió la dinámica de inmovilización por un periodo de 120 días. En este experimento se encontró la más baja cantidad de biomasa inmovilizada, ya que se obtuvieron 0.93 mg SVI/g de soporte seco.

Durante todo el periodo de inmovilización, las pendientes obtenidas para el consumo de acetato fueron poco pronunciadas, como se ve en la Figura 4.3, y esto se traduce en que las velocidades específicas de degradación de acetato son muy

bajas, por lo que la actividad acetoclástica global es mucho menor que en experimentos anteriores.

La máxima cantidad de acetato consumida en cada cinética fue de 2 mM, equivalente a una actividad de 0.08 g acetato/L·d que con la cantidad de biomasa inmovilizada da como resultado una actividad específica de 0.72 g acetato/g SVI·d.



**Figura 4.3.** Cinética de consumo de acetato durante el periodo de inmovilización de partículas en termofilia alimentadas con acetato.

Se encontraron de 1.54 mg proteína y 0.27 de carbohidratos por g de soporte seco y la relación proteínas/carbohidratos fue de 5.7. La cantidad de proteína es cinco veces mayor que la encontrada en el experimento análogo en mesofilia y esta cantidad se mantuvo en niveles similares desde los primeros 30 días de inmovilización, ya que en determinaciones posteriores se obtuvo prácticamente la misma concentración.

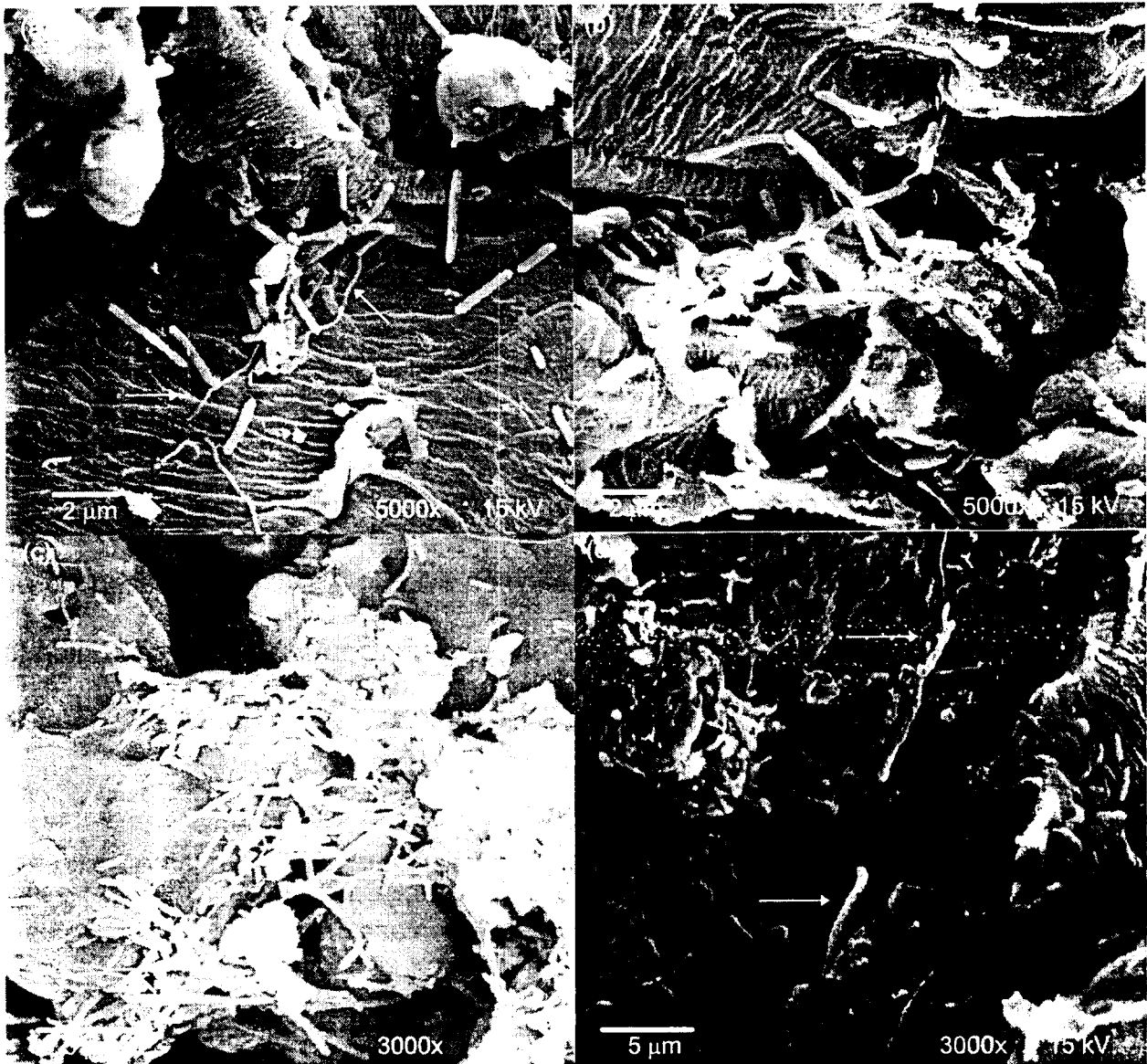
Sin embargo, este valor es similar al experimento de adaptación de biopartículas mesofílicas a termofilia, donde la fracción de proteína también es cinco veces mayor, indicando la naturaleza proteica de esta biopelícula lo que lleva a inferir que al haber una fuente de carbono que aporte energía limitada como el acetato (menos de 1 ATP/mol), la biopelícula inmovilizada contendrá bajas cantidades de carbohidratos. La relación SVI/SVT fue de 0.73, más baja que en el experimento anterior y de un valor más cercano al del experimento análogo en mesofilia y al de adaptación a termofilia.

Dados los resultados obtenidos de actividad acetoclástica para ambos lotes de biopartículas, no se determinaron parámetros cinéticos.

#### **4.2.2. Descripción de biopartículas termofílicas observadas en MEB**

Las muestras de ambos lotes mostraron bacterias similares a las del género *Methanosaeta* como predominante. Puede verse que estas bacterias son estructuralmente diferentes a las encontradas en mesofilia, resultando similares a las descritas por Nozhevnikova y Yagodina (1983) y Nozhevnikova y Chudina (1985). En la Figura 4.4.a, se muestra la escasa población de bacilos en la superficie de las partículas alimentadas con acetato. Las flechas indican una estructura bacilar muy fina que no ha sido identificada. Se puede apreciar en la Figura 4.4.b, que las bacterias inmovilizadas tienden a colonizar las cavidades disponibles en un arreglo

de trozos de "spaghetti", en la que los filamentos son cortos y están sobrepuestos entre sí.



**Figuras 4.4.a, b, c y d.** Imágenes de MEB de biopartículas termofílicas inmovilizadas con acetato (a) y con acetato y glucosa (b, c y d). (a) Biomasa adherida después de 30 días de inmovilización alimentando con acetato. Nótese la escasa población y la diferencia entre las estructuras bacilares. (b) Biomasa inmovilizada en el día 60 alimentando con acetato y glucosa, nótese la forma de agrupamiento. (c) Biomasa inmovilizada en el día 90. Nótese a la derecha y en el centro inferior la acumulación de células inmersas en material amorfo, probablemente exopolimérico. (d) Bacterias heterótrofas tipo clostridio después de 30 días de inmovilización.

En la Figura 4.4.c, se observa el mismo arreglo y la acumulación de exopolímero en las biopartículas alimentadas con acetato y glucosa. Las demás estructuras observadas en el inóculo están escasamente presentes, sin embargo, pudieron observarse algunos bacilos esporulados (Figura 4.4.d).

### 4.3. Comparación de resultados entre experimentos

Finalmente se presenta la Tabla 4.1, donde se resumen los resultados más importantes que se obtuvieron en los experimentos descritos en este Capítulo y en el anterior.

En el experimento en mesofilia inmovilizado con acetato y glucosa se obtiene la más alta actividad global, la mayor concentración por g de soporte seco de carbohidratos, proteínas y SVI; la más alta relación SVI/SVT y la más baja relación proteínas/carbohidratos.

La actividad específica para las partículas mesófilas inmovilizadas con acetato es la más alta, debido a la baja concentración de biomasa inmovilizada, de la cual la concentración de proteína entre experimentos es la más baja.

Esta biopelícula de características pobres, una vez adaptada a termofilia, presenta características mejoradas con una composición de biopelícula en la cual lo más sobresaliente es el aumento en la concentración de proteínas, que no se compara a ninguno de los experimentos llevados a cabo en termofilia.

**Tabla 4.1.** Comparación de actividades globales y específicas, de concentración de biomasa inmovilizada y composición de la biopelícula entre condiciones de inmovilización y fuentes de carbono utilizadas.

| Condiciones de Inmovilización               | Mesofilia<br>(35° C)                  |                  | Adaptación<br>(35° → 55° C) | Termofilia<br>(55° C)                 |                  |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|------------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------|
|                                             | acetato + glucosa<br>0.5 g/L cada uno | acetato<br>1 g/L |                             | acetato + glucosa<br>0.5 g/L cada uno | acetato<br>1 g/L |
| Fuente de Carbono                           |                                       |                  |                             |                                       |                  |
| Actividad Global<br>(g acetato/L·d)         | 3.6                                   | 0.47             | 0.55                        | 0.21                                  | 0.08             |
| Actividad Especifica<br>(g acetato/g SVI·d) | 2.0                                   | 5.4              | 3.7                         | 1.3                                   | 0.72             |
| Biomasa<br>(mg SVI/g soporte seco)          | 17.6                                  | 1.23             | 2.95                        | 2.31                                  | 0.93             |
| Proteínas<br>(mg/g soporte seco)            | 8.68                                  | 0.37             | 2.61                        | 1.97                                  | 1.54             |
| Carbohidratos<br>(mg/g soporte seco)        | 8.36                                  | 0.32             | 0.52                        | 1.62                                  | 0.27             |
| mg SVI/mg STI                               | 0.95                                  | 0.62             | 0.65                        | 0.86                                  | 0.73             |
| mg Proteínas/ mg Carbohidratos              | 1.03                                  | 1.15             | 5.01                        | 1.21                                  | 5.7              |

La alta concentración de proteína con respecto a los carbohidratos en los experimentos de adaptación y de inmovilización en termofilia con acetato, indican la naturaleza proteica de estas biopelículas.

Estos resultados son coincidentes con los de Schmidt y Ahring (1994), ya que encontraron una mayor cantidad en la concentración de proteína para lodos de reactores termofílicos alimentados con ácidos grasos volátiles.

Los experimentos alimentados con acetato y glucosa tanto en mesofilia como en termofilia, así como el que se alimentó solamente con acetato en mesofilia tienen fracciones similares de proteínas y carbohidratos, de tal forma que la relación da valores cercanos a 1.

Comparando los dos experimentos de inmovilización en termofilia, es evidente que aún con un inóculo de malas características agregacionales (*i.e.* que perdió la capacidad de granulación), la adición de un carbohidrato mejora también la composición de la biopelícula.

Cabe recordar que muy probablemente debido a la técnica utilizada para la obtención del material exopolimérico para la determinación posterior de proteínas y carbohidratos, se obtienen concentraciones que igualan o rebasan la concentración de biomasa total determinada en el soporte, como se señaló anteriormente.

#### 4.4. Discusión

La inmovilización en termofilia mostró una actividad acetoclástica global y específica baja y al igual que en experimentos anteriores, la bacteria predominante fue de tipo bacilar similar a *Methanosaeta* termófila. Se debe considerar que análogamente a mesofilia, este género tiene una alta afinidad por el acetato, sin embargo, lo consume muy lentamente y solamente tolera bajas concentraciones (Zinder, 1990). La escasa presencia de este microorganismo en las biopartículas es probablemente el factor que retarda el consumo de acetato en las determinaciones de actividad específica, ya que durante la inmovilización la concentración de acetato fue mucho mayor que 1 mg acetato/L, que es la concentración alrededor de la cual se encuentra el umbral de utilización de acetato para este microorganismo (véase la Tabla 1.2, p. 12).

La baja cantidad de biomasa encontrada en ambos lotes, puede ser explicada a partir de las características del lodo utilizado para inocular los reactores que tiene una pobre capacidad de agregación. Se sabe que para obtener lodos completamente adaptados capaces de granular y tolerar altas cargas orgánicas, se requieren en ocasiones hasta 5 años de adaptación, como es el caso de reactores UASB alimentados con vinazas (Vazoller, comunicación personal).

Esta descripción es comparable a las características encontradas en mesofilia por Kamagata y Mikami (1990), quienes describieron dos morfotipos de *Methanosaeta*.

Uno de ellos es del tipo "disperso" que tiende a formar cadenas cortas compuestas de pocas células, las cuales no contribuyen a la formación de gránulos que sedimenten y esto se traduce en el lavado de sólidos de los sistemas de tratamiento. Aparentemente, en termofilia existen características análogas, ya que Uemura y Harada (1993) encontraron que a 55° C las bacterias del grupo *Methanosaeta* del tipo "disperso" proliferan, aunque no hubiera *Methanosarcina* presente en los gránulos. Como una consecuencia, los lodos son susceptibles de "lavarse" debido a que no hay formación de gránulos que sedimenten.

Las estructuras observadas en estos lotes de partículas forman cadenas cortas y probablemente se trate de estructuras del tipo "disperso", similares a las descritas por estos autores.

La naturaleza proteica encontrada en las biopelículas inmovilizadas en termofilia, alimentadas con acetato y glucosa o con acetato solamente, indican que probablemente el metabolismo se dirija hacia la síntesis de proteínas. Estas macromoléculas son probablemente más resistentes a la temperatura, debido a la variedad de moléculas de aminoácidos que las componen y a la variedad en secuenciación y arreglos que pueden formar, en comparación con las cadenas de polisacáridos y tal vez de ahí provenga su abundancia en estas condiciones.

Por otro lado, el lote de partículas alimentado con acetato y glucosa tuvo una relación de sólidos volátiles a totales mayor y un alto contenido de carbohidratos que el lote de partículas alimentado sólo con acetato, como se mostró en la

Tabla 4.1. Esto significa que la adición de glucosa al sistema promueve la síntesis de material orgánico en la biopelícula: exopolímero y microorganismos.

Estos resultados son similares a los de Uemura y Harada (1993) quienes encontraron la formación de gránulos pequeños en reactores termofílicos que fueron alimentados con acetato y sacarosa. Al contrario, cuando los reactores fueron alimentados sólo con acetato, los gránulos formados fueron del tipo "disperso" con *Methanosaeta* como la bacteria predominante.

De la misma manera, los resultados de Schmidt y Ahring (1994) demuestran que la cantidad de exopolímero y la fracción de proteína y polisacáridos en el mismo es mayor en lodos mesofílicos que termofílicos. Se produce menos exopolímero utilizando sustratos metanogénicos, tales como el acetato y otros ácidos grasos de cadena corta. Y en general, la composición del exopolímero de los diferentes lodos analizados por estos autores muestran una alta concentración de proteínas, lo que los lleva a inferir que estas sustancias son principalmente de naturaleza proteica.

Los resultados encontrados en este trabajo son comparables con los de Schmidt y Ahring (1994) y son congruentes aún con los de inmovilización en mesofilia donde la diferencia entre ambos sistemas es notable, ya que la biopelícula fue muy pobre en actividad acetoclástica y contenido de sólidos cuando el reactor fue alimentado sólo con acetato.

#### 4.5. Conclusiones

En este Capítulo, se presentaron los resultados de la inmovilización de biomasa en termofilia, la cuales fueron mucho menos favorables que los obtenidos con los lotes de biopartículas mesofílicas, debido principalmente a la pérdida de la capacidad de granulación del lodo utilizado como inóculo.

En este caso, la alta concentración de acetato alimentada a los reactores rebasó el umbral de concentración tolerable para las bacterias del tipo *Methanosaeta* probablemente presentes en la biopelícula. lo que pudo ser un factor que contribuyera a las bajas velocidades de degradación de acetato obtenidas.

De la magnitud de estas velocidades, se hace evidente que este sistema aún alimentado con una fuente de carbono energética, operaría con bajas cargas orgánicas y probablemente requeriría de tiempos prolongados antes de estabilizarse en un nivel máximo de remoción.

Aunque el lodo no granular termofílico utilizado para inocular los reactores dio una inmovilización pobre, cierta cantidad de biomasa se inmovilizó. Estos resultados sugieren que la inmovilización aún en condiciones termofílicas y con un inóculo floculento es una posibilidad, aunque costosa, para retener los sólidos dentro del reactor y evitar el "lavado" que se tiene en reactores de biomasa suspendida.

# 5 Arranque y operación en continuo del reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) para el tratamiento de agua residual sintética

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos del seguimiento de la operación en continuo de dos reactores alimentados con agua residual sintética donde los principales sustratos fueron acetato y glucosa. Estos se seleccionaron según los resultados obtenidos en los experimentos de inmovilización. Ambas corridas tienen como objetivo comparar la influencia de la altura del lecho sobre la capacidad de conversión, ya que en el primero, RLFI-1, se operó con una relación  $H_0/D_R$  de 6 y el segundo, RLFI-2, de 3.

Se describen los efectos del tipo arranque y la operación en continuo en ambos reactores, a través del análisis de variables tales como la respuesta del reactor a cambios del TRH y cambios en la carga orgánica volumétrica sobre la eficiencia de

一 二 三 四 五 六 七 八 九 十 十一 十二 十三 十四 十五 十六 十七 十八 十九 二十

cambios del TRH y cambios en la carga orgánica volumétrica sobre la eficiencia de remoción del sistema. También se revisa la importancia de la determinación de la relación de alcalinidades para administrar las cargas aplicadas a los reactores, así como la producción de biogás y la evolución de la fracción del metano en el mismo, durante las corridas experimentales.

Se encontrará que ambos sistemas presentan un problema de expansión excesiva, debida a la retención del gas en la fase líquida por el patrón de flujo descendente propio del RLFI.

En este sentido, se calculó la fracción de metano disuelto en el líquido para cada uno de los reactores. Dada la baja cantidad encontrada, se consideró que el efluente se encontraba sobresaturado de metano y que el biogás en general se encontraba en forma de burbujas muy pequeñas retenidas en la fase líquida. Este fenómeno ha sido descrito por medio de correlaciones por Fan *et al.* (1982), Karamanev y Nikolov (1992), Krishnaia *et al.* (1993) y Setiadi (1995), en estudios hidrodinámicos de reactores trifásicos, donde la velocidad superficial del gas,  $U_{sg}$ , es conocida.

En este caso, el efecto más importante de este fenómeno es la evacuación de biopartículas del lecho y la subsecuente disminución de la eficiencia, lo que limita el nivel de las cargas orgánicas aplicadas.

Con estas experiencias se demuestra que este prototipo alcanza altos niveles de remoción de materia orgánica, operando con TRH comparables con otros procesos anaerobios. Sin embargo, el sistema se deberá diseñar para un nivel de expansión

del lecho dado por la capacidad de conversión del sistema de la carga orgánica alimentada a biogás, es decir, la velocidad de producción de biogás por unidad de

volumen de reactor,  $\frac{\text{m}^3 \text{ biogas}}{\text{m}^3 \text{ reactor} \cdot \text{d}}$

## 5.1. Reactor LFI-1 ( $H_0/D_R = 6$ ).

### 5.1.1. Inoculación y Arranque (30 días).

En esta primera etapa el reactor se inoculó con una concentración de lodos de 500 mg SSV/L reactor. Se operó abierto, con un TRH de 1 d y se encontró que el sistema no retenía el inóculo, lavándolo completamente, por lo que tenía que ser renovado diariamente para mantener la concentración de sólidos fijada. Esto provocó grandes variaciones en los sólidos suspendidos del efluente (véase la Figura 5.7), por lo que la concentración de la alimentación se variaba de acuerdo al contenido de sólidos para mantener una relación másica de 0.5 kg DQO/kg SSV-d.

Estas variaciones se ven claramente en la DQO del influente y del efluente y en la carga orgánica volumétrica (véanse las Figuras 5.1 y 5.2), con la subsecuente variación de la eficiencia de remoción, como se muestra en la Figura 5.3.

La producción de biogás fue mínima con un promedio de 0.21 L/d y una composición de metano de 39.6%.

Estas variaciones durante el arranque no son tan notables en el pH del efluente, como se muestra en la Figura 5.6, por lo que la relación de alcalinidades no se siguió desde el principio como puede verse en esta misma Figura. Sin embargo, este parámetro resultó ser de suma importancia en el control de las cargas orgánicas suministradas al sistema, como se verá más adelante.

Durante el arranque se alcanzó una concentración de biomasa de  $0.6 \text{ kg SVI/m}^3$  soporte seco equivalentes a  $0.11 \text{ kg de SVI/ m}^3$  de reactor y se consideró que esta cantidad era suficiente para finalizar la etapa de inoculación y arranque del reactor.

### **5.1.2. Operación en Continuo (154 días).**

5.1.2.1. Evolución de la concentración de la DQO, carga orgánica volumétrica y eficiencia de remoción. Posterior al arranque, se inició la operación del reactor con una carga orgánica volumétrica de  $2 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{d}$  y un TRH de 1 día y se alcanzaron niveles mínimos de DQO en la salida (véase la Figura 5.1) con lo que la eficiencia de remoción se estabilizó en un valor promedio de 85% en 13 días (ver Figura 5.3).

El día 45 de operación hubo una falla eléctrica en la bomba de recirculación que duró alrededor de 12 horas. Debido a esto, el reactor se acidificó y hubo una acumulación de DQO total de  $2325 \text{ mg/L}$ , debido a la acumulación de AGV y al desprendimiento de biopelícula. La eficiencia de remoción decayó completamente, como puede verse en la Figura 5.3.

Como medida emergente, se neutralizó el reactor con  $1 \text{ g/L}$  de  $\text{NaHCO}_3$ , se retiró la alimentación y se operó en lote durante 5 días, hasta obtener una disminución de la DQO a  $867 \text{ mg/L}$ , como puede verse en la Figura 5.1. En este momento se reinició la alimentación con  $500 \text{ mg DQO/L}$  y con el mismo TRH, sin efecto aparente en la eficiencia de remoción, por lo que se aumentó la concentración del influente a

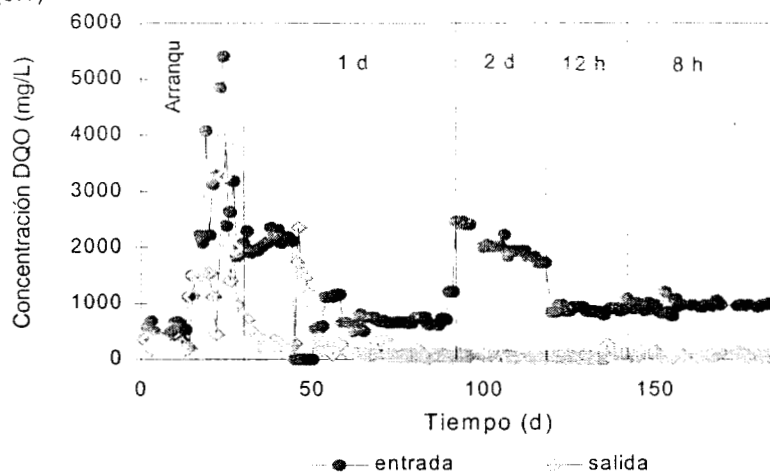
1000 mg DQO/L, que a partir del día 52 hasta el día 70, significó un aumento en la eficiencia de remoción de 38 a 85%.

En el día 71, se tuvo otra falla eléctrica que suspendió la recirculación alrededor de 6 horas y se presentaron las mismas características que en el caso anterior, aunque atenuadas por la menor concentración de la DQO del influente. La DQO del efluente aumentó hasta 300 mg/L y la eficiencia de remoción decayó nuevamente como se ve en la Figura 5.3.

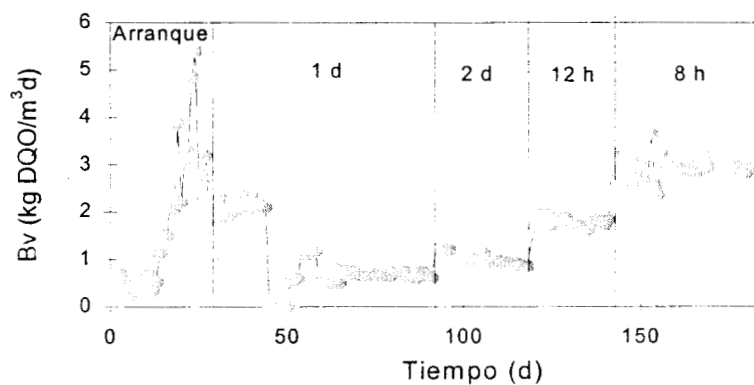
Se continuó la operación del reactor, disminuyendo la carga orgánica volumétrica a 0.5 kg DQO/m<sup>3</sup>·d para estabilizarlo como se muestra en la Figura 5.2 y se alcanzó una eficiencia de remoción promedio de 90%. Posteriormente, en el día 90 se aumentó la concentración de DQO a 2000 mg/L y el TRH a 2 d por un periodo de 32 días. En esta nueva etapa puede verse claramente en la Figura 5.3, que la eficiencia de remoción se mantuvo en promedio en 97.3% y la DQO de salida fue menor a 50 mg/L.

Después de este periodo y para verificar la respuesta del reactor se disminuyó el TRH a 12 h, sin ningún efecto inicial en la eficiencia de remoción que se mantuvo en 95% en promedio. En el día 136, se tuvo una disminución de la eficiencia hasta 66%, debido a que el lecho estaba expandido en exceso y aproximadamente un tercio de las biopartículas no eran retenidas en el ensanchamiento inferior y pasaban al separador donde permanecían estáticas, aunque algunas circulaban por

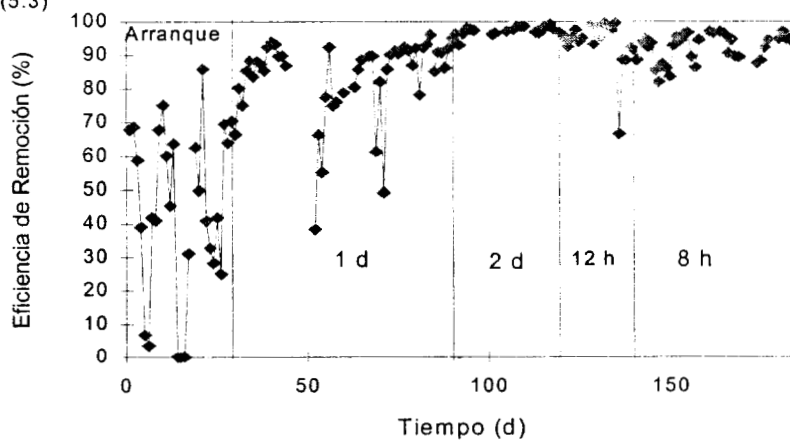
(5.1)



(5.2)



(5.3)



**Figuras 5.1, 5.2 y 5.3.** Evolución de la DQO soluble en influente y efluente, de la carga orgánica volumétrica (Bv) suministrada al sistema y de la eficiencia de remoción de DQO durante el arranque y operación en continuo del RLFI-1.

las tuberías del sistema. Esto cambió el patrón de conversión y de ahí la disminución en la eficiencia.

Para remediar este problema, las biopartículas eran removidas periódicamente del separador y con ello, la eficiencia aumentó nuevamente en los días posteriores sin alcanzar los niveles antes mencionados. Sin embargo, como se observa en la Figura 5.3, a partir de este momento, este parámetro no se mantiene estable debido al grado de expansión y evacuación constante de partículas del lecho. Como se muestra para el último periodo de operación durante el cual el TRH se disminuyó a 8 h y la carga orgánica volumétrica suministrada fue de 3 kg DQO/m<sup>3</sup>·d, la eficiencia de remoción alcanzó un valor promedio de 92.1%.

Finalmente, en la Tabla 5.1, se muestran resumidas las condiciones de operación del reactor junto con algunos parámetros característicos obtenidos, tales como la carga másica a la que se operó durante las diferentes etapas y la actividad específica obtenida.

**Tabla 5.1.** Carga orgánica volumétrica, carga másica, actividad específica y velocidad superficial durante las diferentes etapas de operación del RLFI-1.

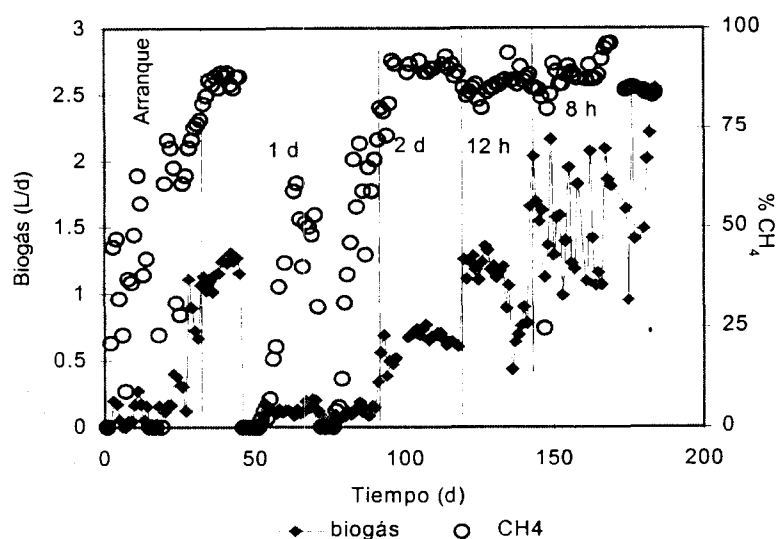
| Etapa    | Día | TRH | Bv                         | Carga másica      | Actividad Específica              | U <sub>sl</sub><br>(m/h) |
|----------|-----|-----|----------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|
|          |     | (d) | (kg DQO/m <sup>3</sup> ·d) | (kg DQO/kg SVI·d) | (kg DQO <sub>rem</sub> /kg SVI·d) |                          |
| Arranque | 30  | 1   | 1.71                       | 5.14              | 2.15                              | 9.0                      |
| Continuo | 44  | 1   | 2.11                       | 1.79              | 1.55                              | 7.0                      |
|          | 51  | 1   | 1.36                       | —                 | 0                                 | 9.0                      |
|          | 90  | 1   | 0.72                       | 3.45              | 2.85                              | 7.0                      |
|          | 118 | 2   | 0.97                       | 0.99              | 0.97                              | 6.0                      |
|          | 141 | 0.5 | 1.77                       | 1.14              | 1.07                              | 4.0                      |
|          | 184 | 0.3 | 2.90                       | 1.88              | 1.73                              | 2.6                      |

5.1.2.2. Producción de biogás y composición. El biogás no fue detectado sino hasta después del arranque ya que el flujo descendente propio del sistema, mantiene el efluente sobresaturado de metano, por lo que no es medible (véase la Figura 5.4). Posteriormente y durante un periodo de 14 días se determinó la cantidad de biogás producido que fue en promedio de 1.13 L/d, con un contenido de  $\text{CH}_4$  de 85%. Cabe mencionar que el metano teórico calculado de acuerdo a la eficiencia de esta etapa fue de 1.59 L/d, como se muestra en la Figura 5.5.

Esta gran producción de biogás hizo que el soporte se expandiera un 180%, ocupando todo el espacio disponible en la zona de fluidificación y sólo fue retenido por el ensanchamiento ubicado en el extremo inferior del reactor. La producción de gas hizo el lecho menos denso y como una medida para controlar la expansión excesiva, el gasto de fluidificación se disminuyó a 9.6 L/h, equivalente a un 27% menos que el gasto inicial.

Después de la primera acidificación, del día 52 al 72 se detectaron solamente 0.13 L de biogás/d con una concentración de metano de 74.1%, cuando el teórico esperado era de 0.49 L/d.

Después de la segunda falla eléctrica, en el día 71, la producción de biogás disminuyó hasta la quinta parte del teórico, alrededor de 0.09 L/d, con una composición de metano de 32.7%.

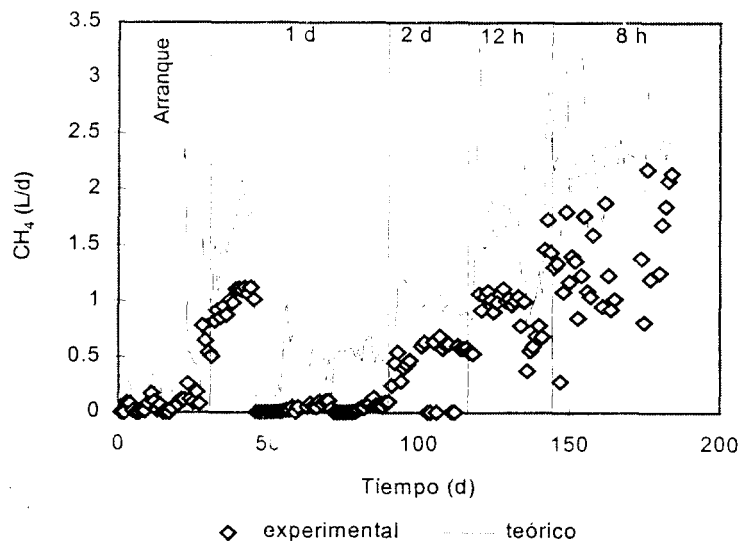


**Figura 5.4.** Evolución de la producción de biogás y composición de metano durante la operación del RLFI-1. Nótese que la pérdida de biopelícula en el sistema por la acidificación desde el día 45 al 90, repercute fuertemente en ambas variables.

Al operar el reactor con 2 d de TRH se obtuvo la mayor producción de biogás que alcanzó un valor promedio de 0.62 L/d, un 34% menos que el teórico, con una composición promedio de metano de 90.2%, como se muestra en la Figura 5.4. En esta etapa efectivamente se recuperó el biorreactor.

Cuando se disminuyó el TRH a 12 h la producción de biogás aumentó a 1.07 L/d, con una composición promedio de metano de 86%. El cambio de carga expandió nuevamente el lecho y la tercera parte de las partículas era retenida en el separador. Este cambio en la capacidad de remoción del reactor se nota también en la producción y composición de biogás como puede verse en la Figura 5.4.

Al disminuir el TRH a 8 h, se produjeron 1.63 L/d de biogás. La proporción de metano obtenida fue de 85.3%, pero la cantidad de metano medida fue de la mitad del valor teórico esperado, es decir, 2.3 L/d. Véase la Figura 5.5.



**Figura 5.5.** Comparación entre la producción de metano teórica y experimental durante la operación del RLFI-1. Nótese que los datos experimentales obtenidos están por debajo de los teóricos, indicando que una fracción del biogás producido no es medible.

En esta misma Figura, se muestra la producción de metano con respecto al teórico esperado y puede verse que los valores experimentales están por debajo de los teóricos. Esto sugiere que una fracción del metano se encuentra en exceso en la fase líquida y ocupa una fracción del lecho. Las burbujas permanecen en el lecho debido al flux descendente del líquido y saldrán por las zonas con menor velocidad o que ofrecen menor resistencia al movimiento ascendente, como serían las paredes del reactor, hecho que se observó repetidamente. Es decir, las burbujas tenderán a

subir a la parte superior del reactor si adquieren un tamaño tal que la fuerza de flotación de las mismas venza el flux de líquido.

Es probable que en este caso, las características del soporte también influyan en este fenómeno, ya que como se observó en las microfotografías mostradas en la Figura 2.2, el soporte tiene formas y superficies irregulares, que pueden proveer intersticios para la adhesión de biomasa así como bordes que dificulten el paso de las burbujas atrapadas.

Al no poderse desplazar hacia la parte superior del reactor, es liberado en el efluente. Dado que el metano tiende a disolverse en el agua y que en aguas residuales municipales la cantidad disuelta representa una fracción importante del metano total (Noyola *et al.*, 1988), se calculó para este caso por la Ley de Henry, que el metano disuelto en el equilibrio en la fase líquida era de 5%. Por lo que se consideró que el resto del biogás esta retenido en la fase líquida en forma de pequeñas burbujas que contribuyen a la expansión que se presentó durante la operación.

Durante este último periodo, la producción de biogás hizo que más del 60% del soporte fuera evacuado del reactor y permaneciera estático en el separador. Debido a esto y como puede apreciarse en las Figuras mostradas en esta sección, en esta etapa la producción de biogás fue errática.

5.1 2.3. Evolución del pH y de la relación de alcalinidades del efluente. Después del arranque, el pH de salida del reactor se estabilizó en un valor alrededor de 7.5 y el valor de la relación de alcalinidades, que se empezó a determinar en esta etapa, fue de 0.72 en promedio.

El día 45, el pH del sistema disminuyó a 5.18, como puede verse en la Figura 5.6, debido a la acidificación. En estas condiciones no es posible determinar la relación de alcalinidades.

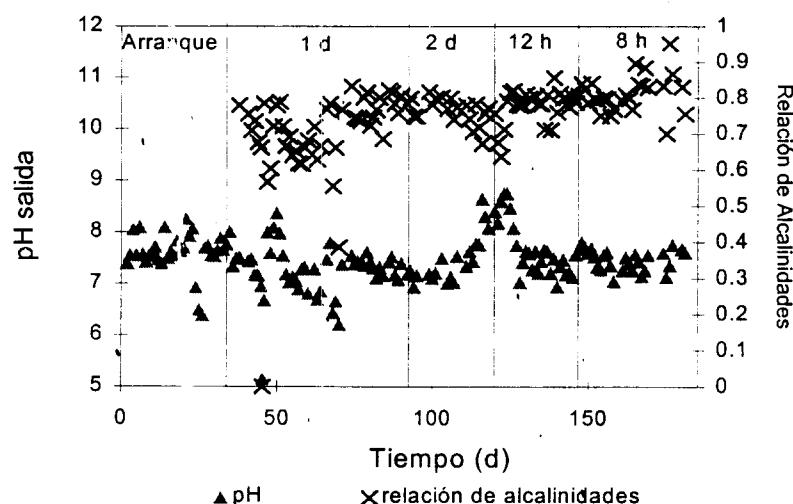
Después de mantener cerrado el reactor por 5 días se tuvo una leve recuperación en la que el pH permaneció inestable, aunque en valores cercanos a la neutralidad y como consecuencia, la relación de alcalinidades también se mantuvo inestable. La estabilidad en los valores de estos parámetros se alcanzó hasta que la concentración de biomasa inmovilizada aumentó nuevamente.

Después de la segunda falla eléctrica, el pH disminuyó hasta un valor aceptable de 6.5, mientras que la relación de alcalinidades cayó hasta un valor de 0.35.

Cuando el TRH fue de 2 d, se alcanzó una alcalinización en el sistema con un pH promedio de 8.5. Posteriormente al disminuir el TRH a 12 y 8 h, el pH se mantiene cerca de la neutralidad.

Durante la operación con un TRH de 2 d y de 12 h, no se observan cambios importantes en los valores obtenidos de la relación de alcalinidades, manteniéndose el sistema alrededor de 0.78.

Cuando el reactor se mantuvo con un TRH de 8 h y durante la expansión excesiva del lecho, estos parámetros también se volvieron variables.



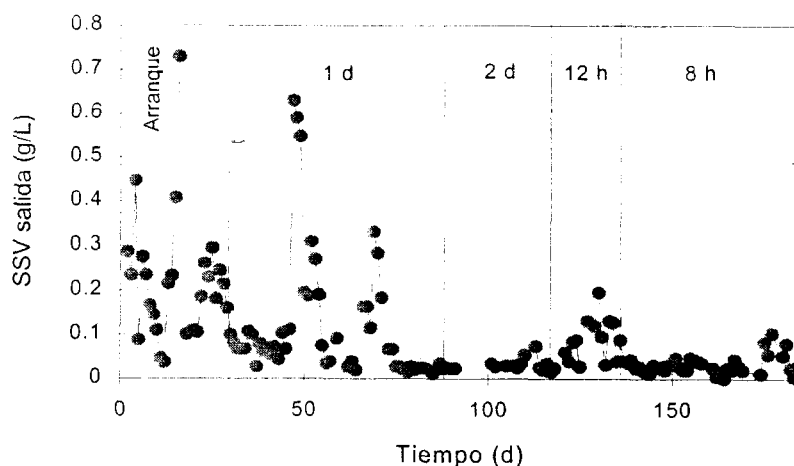
**Figura 5.6.** Evolución del pH y de la relación de alcalinidades en el efluente durante el arranque y operación en continuo del RLFI-1.

#### 5.1.2.4. Evolución de los sólidos suspendidos en el efluente y acumulación de biomasa inmovilizada en el soporte.

En la Figura 5.7, se aprecia que en el periodo posterior al arranque se eliminaron los sólidos alimentados inicialmente al sistema y los sólidos del efluente permanecieron casi constantes, en un valor de 90 mg/L.

Después de 44 días de operación se inmovilizaron 7.86 kg SVI/m<sup>3</sup> de soporte, como se muestra en la Figura 5.8, que equivalen a 1.54 kg SVI/ m<sup>3</sup> reactor, lo que corresponde a una carga másica de 1.79 kg DQO/kg SVI·d. La actividad específica máxima de las biopartículas fue de 1.55 kg DQO removido/kg SVI·d. Cabe mencionar que la concentración de biomasa es baja con respecto a los sistemas

fluidificados tradicionales ( $40$  a  $150 \text{ kg/m}^3$ ), pero la actividad esta dentro de los valores reportados por Heijnen *et al.* (1989).



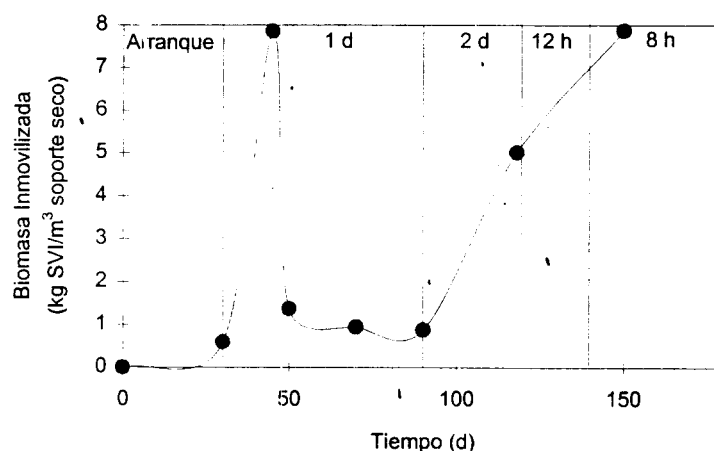
**Figura 5.7.** Evolución de los sólidos suspendidos volátiles durante el arranque y la operación en continuo del RLFI-1. La altas concentraciones de sólidos suspendidos en el efluente alrededor de los días 50 y 70, corresponde a la biopelícula desprendida durante la acidificación del reactor.

En estas mismas Figuras puede verse que después de la acidificación del día 45, la concentración de biomasa disminuyó hasta  $1.37 \text{ kg/m}^3$  soporte seco y los sólidos suspendidos del efluente aumentaron a  $650 \text{ mg SSV/L}$ , debido a la biopelícula desprendida del soporte.

El reinicio de la operación continua del reactor después de la acidificación, provocó un nuevo desprendimiento de biomasa que alcanzó una concentración como sólidos suspendidos en el efluente de  $310 \text{ mg/L}$ .

En el día 71, hubo un nuevo desprendimiento de biopelícula del soporte, debido a una nueva acidificación, quedando solamente  $0.947 \text{ kg SVI/m}^3$  soporte seco y un

aumento puntual 320 mg de SSV/L en el efluente, como se ve en la Figura 5.7. Después de este evento, la concentración de biomasa inmovilizada que se tenía había disminuido hasta 0.877 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco, como se muestra en la Figura 5.8, que es similar a la que se había obtenido al finalizar el periodo de arranque.



**Figura 5.8.** Evolución de biomasa inmovilizada durante la primera corrida del RLFI-1. La pérdida drástica de biopelícula alrededor de los días 50 y 70, es debida a la acidificación del reactor.

Es notable la facilidad de inmovilización de la biomasa en este soporte y en este sistema, ya que después del arranque, en 21 días de operación se obtuvo una de las más altas concentraciones. Posterior a las acidificaciones del día 45 y del día 70, la recuperación de biomasa también fue rápida cuando el reactor se operó a un TRH de 2 d. Al finalizar este periodo, la biomasa inmovilizada había aumentado a 5.02 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco.

Al disminuir el TRH a 12 h, se tuvo una expansión excesiva del lecho que hizo que un tercio de las partículas se quedarán retenidas en el separador y otras circularan por todo el sistema. La agitación producida por la expansión conlleva el aumento de sólidos en el efluente que se muestra en la Figura 5.7. En este momento la cantidad total de biomasa reactiva era de 0.64 kg SVI/m<sup>3</sup> reactor, con lo que se operó con una carga másica de 1.64 kg DQO/kg SVI-d.

Durante el periodo en el que el reactor se operó a TRH de 8 h, la biomasa acumulada en el soporte aumentó a 7.87 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco, con una actividad específica de 1.73 kg DQO removido/kg SVI-d, pero con los mismos problemas de expansión del lecho, evacuación y circulación de algunas partículas por el sistema.

Cabe recordar que durante las etapas de operación en las que hubo expansión excesiva, se disminuyó la velocidad superficial con el objeto de moderar este fenómeno, aunque el factor más importante que produce la expansión es la formación de biogás que esta directamente relacionada a la carga orgánica volumétrica aplicada, por lo que esta medida resultó poco eficaz. Como consecuencia, se favoreció la rápida acumulación de biomasa en el soporte debido a la disminución de fricción entre las partículas y el líquido.

## 5.2. Discusión

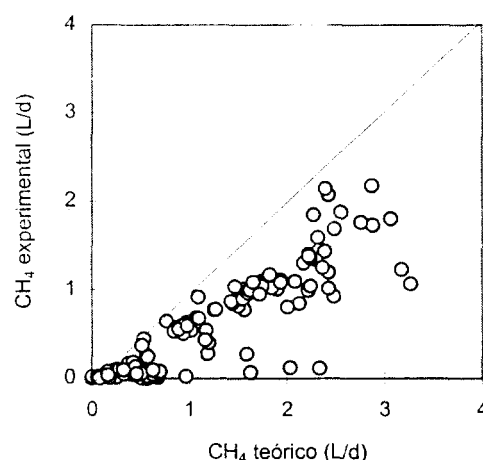
La restricción más importante durante la operación del lecho fluidificado inverso reside en la expansión como consecuencia del biogás retenido. Otros autores han mencionado la retención de gas durante la experimentación con reactores de tres fases (Fan *et al*, 1982, Karamanev y Nikolov, 1992, Krishnaia *et al.*, 1993 y Setiadi, 1995).

En este caso, el gas retenido en el reactor es producido por la película de microorganismos inmovilizados en las partículas de soporte. En principio una fracción estará disuelta saturando la fase líquida y otra fracción se encontrará en forma de burbujas pequeñas, retenidas entre la fase líquida y el soporte, las cuales ocuparán un espacio dentro del lecho. Posteriormente las burbujas aumentarán de tamaño y ejercerán una fuerza de flotación mayor que el flux descendente del líquido y subirán a la parte superior del reactor por donde la velocidad superficial sea menor, como sería la pared del reactor. Este fenómeno, en el que pequeñas burbujas ascendían por la pared del reactor, quedando atrapadas entre las partículas de soporte, se observó en repetidas ocasiones.

En la Figura 5.9, se relacionan el  $\text{CH}_4$  experimental y el teórico como una manera de mostrar la cantidad de biogás atrapado en el lecho.

Los puntos experimentales que caen en la diagonal indican que el metano esperado fue el metano producido, por lo tanto la distancia de los datos experimentales con

respecto a la diagonal, corresponde a la cantidad de metano no detectado que probablemente se encuentra retenido en el sistema.



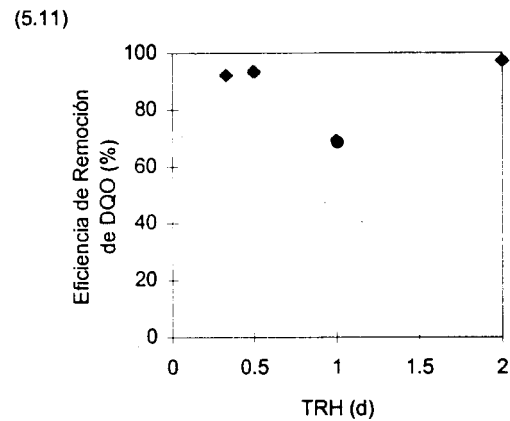
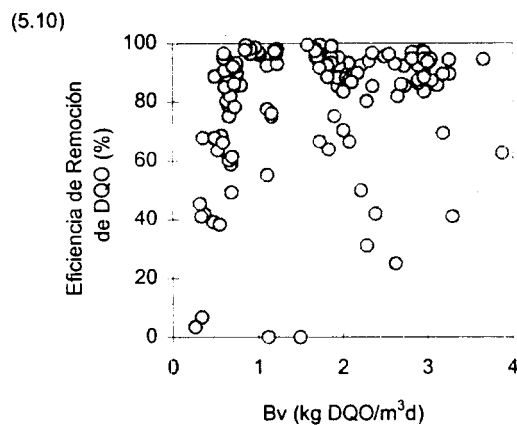
**Figura 5.9.** Relación entre los datos experimentales y teóricos de la producción de metano obtenidos durante la operación del RLFI-1.

Evidentemente, la cantidad de metano producido aumenta conforme a la carga orgánica volumétrica suministrada y es en las etapas de operación con las cargas más altas que se obtiene una cantidad mayor de biogás retenido, como es el caso de los puntos que se encuentran en la parte central derecha de la gráfica. En este caso particular el biogás no cuantificado varía de 12 a 35 % y la Ley de Henry solamente explica 5% del metano en disolución.

Esto provoca que el soporte sea desplazado de la zona de fluidificación ya que es más denso que el biogás, disminuyendo así la biomasa reactiva en el lecho, lo cual repercute directamente en la eficiencia del sistema. El resultado global es una restricción operacional de este tipo de biorreactores.

En este caso, una incógnita que presenta el sistema es la velocidad superficial del biogás durante su ascensión por el lecho, pues como se describió anteriormente, el gas se produce en la biopelícula.

En la Figura 5.10 se muestra la relación que existe entre la eficiencia de remoción de materia orgánica con respecto a la carga orgánica aplicada.



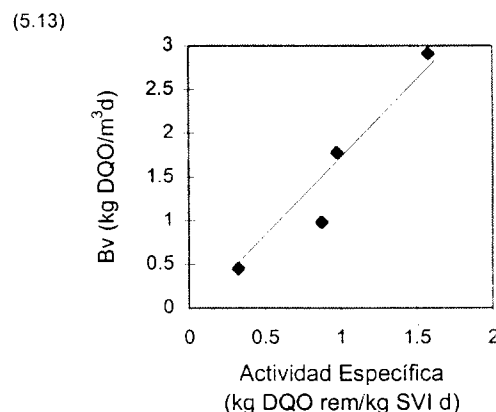
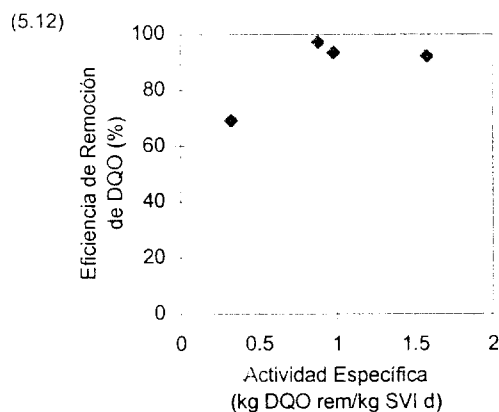
**Figuras 5.10 y 5.11.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la carga orgánica aplicada y a los TRH utilizados durante la corrida del RLFI-1.

En esta corrida el reactor se operó con cargas orgánicas por debajo de las usuales en reactores de lecho fluidificado, por lo que aún con los problemas de acidificación que se tuvieron, las eficiencias de remoción son muy altas. Se observa que para cualquiera de las cargas aplicadas, la mayoría de los puntos se encuentran en eficiencias del 80 al 100%.

Igualmente, la manipulación de los tiempos de retención no tiene un efecto sobre la eficiencia de remoción, como se muestra en la Figura 5.11. Para el TRH de 1 d las eficiencias de remoción están alrededor del 80%, ya que como se describió

anteriormente, durante este periodo de operación se tuvieron problemas de acidificación lo que provoco la disminución de este parámetro.

Relacionando la actividad específica de las biopartículas con la eficiencia de remoción, se obtienen mayores eficiencias cuando se alcanzan las más altas actividades, como se muestra en la Figura 5.12.



**Figuras 5.12 y 5.13.** Relación entre la eficiencia de remoción y las cargas orgánicas aplicadas con respecto a la actividad específica de las biopartículas durante la primera corrida del RLFI-1.

Las actividades tienen una relación lineal con las cargas orgánicas aplicadas (coeficiente de correlación de 0.96) como puede verse en la Figura 5.13, pues a mayor carga aplicada mayor actividad específica alcanzada, a través de la inmovilización de biomasa, que es la pendiente de esta recta. En este caso se tiene una acumulación de biomasa de  $2.1 \text{ kg SVI/m}^3$  reactor durante todo el periodo de operación.

Cabe señalar que de los parámetros evaluado para analizar el comportamiento del reactor, la relación de alcalinidades es un parámetro que no se relaciona a ninguna de estas variables, ya que es un indicador de la capacidad de amortiguamiento del sistema con respecto a la carga orgánica aplicada. Es decir, la alcalinización es debida a la producción de bicarbonatos e indica que la conversión de los sustratos se esta llevando a cabo, por lo que es aplicable como un parámetro de control de la alimentación del reactor.

### 5.3. Reactor LFI-2 ( $H_0/D_R = 3$ )

#### 5.3.1. Inoculación y Arranque (32 días).

En esta nueva corrida experimental se fijó el TRH del reactor durante el arranque en lote en 1 d. Fue alimentado diariamente reemplazando con 1 L de medio mineral fresco (Balch *et al.*, 1979) el mismo volumen de líquido del reactor. Se inoculó con 500 mg SSV/L de lodos y aunque se mantuvo cerrado durante el arranque, al alimentar el medio fresco, se perdían sólidos que se restituyeron diariamente para mantener la concentración mencionada. Como en la corrida anterior, también se tuvieron variaciones importantes en la concentración de SSV en la salida (ver Figura 5.21); la concentración promedio fue de 351 mg/L.

La concentración de los sustratos a lo largo del arranque se aumentó de 1000 a 1700 mg de DQO/L en promedio, conforme la eficiencia de remoción alcanzaba

valores superiores a 80% como puede verse en las Figuras 5.14 y 5.18. La carga másica aplicada varió de 2.8 a 4.8 kg DQO/kg SSV·d.

Puede verse también en la Figura 5.17 que durante el arranque, la producción de biogás es apenas detectable y después de los primeros 12 días aumenta paulatinamente hasta un valor promedio de 0.15 L/d. Durante todo este tiempo la producción de metano experimental siempre fue equivalente a un 50% de los valores teóricos calculados. Sin embargo, en esta misma Figura, puede verse que la fracción de metano en el biogás permanece alrededor de 80%.

Con respecto al pH no se alcanza un valor estable, sin embargo, se encuentra cerca de la neutralidad, pero la relación de alcalinidades se estabilizó alrededor de 0.7 después de 10 días de haber iniciado el arranque del reactor, como puede verse en la Figura 5.19.

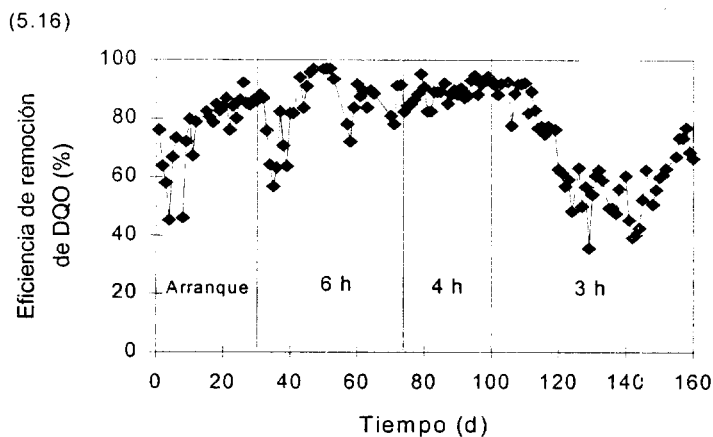
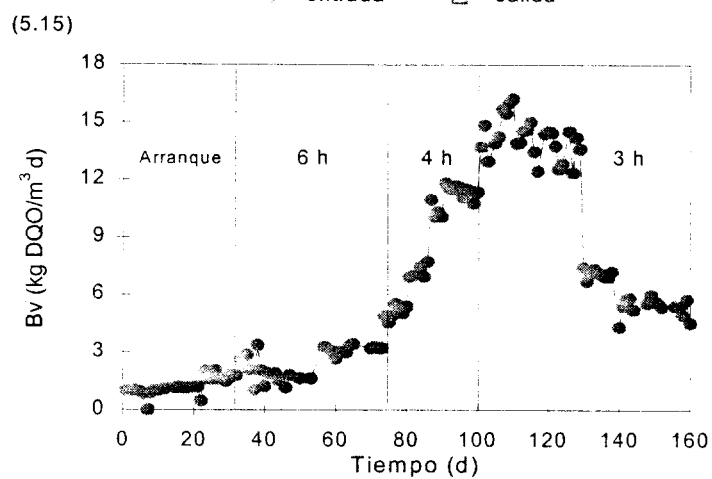
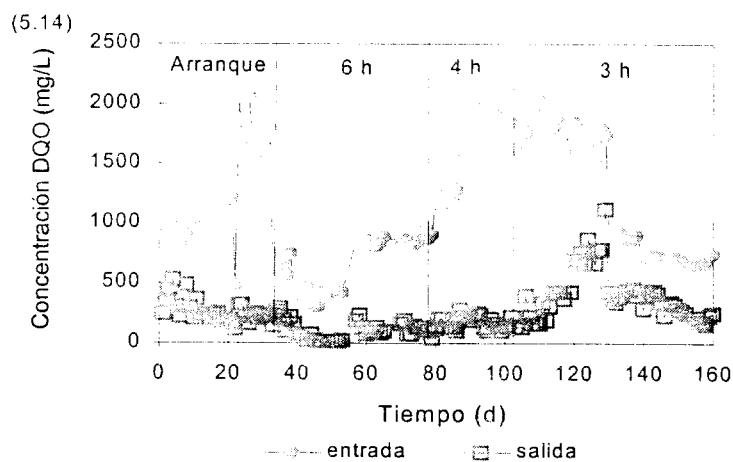
La biomasa inmovilizada se determinó periódicamente durante el arranque y varió de 1.4 a 5.2 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco (véase la Figura 5.20). En esta etapa la máxima actividad específica que el sistema alcanzó fue de 3.51 kg DQO removido/kg SVI·d cuando se operó con 1.7 kg DQO/m<sup>3</sup>·d (ver la Tabla 5.2).

### 5.3.2. Operación en Continuo (128 días).

5.3.2.1. Evolución de la concentración de la DQO, carga orgánica volumétrica y eficiencia de remoción. La operación en continuo se inició con un TRH de 6 h y la carga aplicada fue de 2 kg DQO/m<sup>3</sup>·d. Durante los primeros días puede notarse que el sistema presentó una disminución importante en la eficiencia de remoción, probablemente debido a la falta de adaptación de las biopartículas al régimen continuo. Igualmente, la actividad específica de las biopartículas disminuyó como puede verse en la Tabla 5.2. Sin embargo, el reactor se recuperó en pocos días y alcanzó la máxima eficiencia en el día 53.

En el día 57 se aumentó la concentración de DQO al doble, como puede verse en la Figura 5.14, con el aumento respectivo en la carga orgánica a 3.37 kg DQO/m<sup>3</sup>·d (véase la Figura 5.15). El aumento de carga produjo nuevamente una disminución en la eficiencia de remoción la cual se recuperó paulatinamente, como se muestra en la Figura 5.16.

En el día 80, se determinaron 17.71 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco y se observó que el sistema se había estabilizado, por lo que se disminuyó el TRH a 4 h y se aumentó la concentración de DQO a 1200 mg/L. Dada la buena respuesta del reactor en términos de eficiencia de remoción, esta concentración se mantuvo pocos días y se aumentó nuevamente a 1790 mg/L, lo que representa una carga orgánica de 11.6 kg DQO/m<sup>3</sup>·d, nuevamente sin detrimento en la eficiencia de remoción. Sin embargo,



**Figuras 5.14, 5.15 y 5.16.** Variación en el influente y efluente de la concentración de DQO, de la carga orgánica volumétrica (Bv) suministrada y de la eficiencia de remoción durante la operación del RLFI-2.

dados los aumentos de carga al sistema, se presentó la expansión del lecho por lo que la velocidad superficial se disminuyó inicialmente a 6 y después a 3.7 m/h.

La última etapa de operación del reactor se inició en el día 102 con una velocidad superficial de 1.65 m/h debido a la expansión excesiva del lecho. El TRH fue de 3 h con la misma concentración de DQO, lo que da como resultado un aumento en la carga orgánica volumétrica a 15.8 kg DQO/m<sup>3</sup>·d, la cual durante los primeros 12 días, no afectó la eficiencia de remoción, como se muestra en la Figura 5.15.

El grado de expansión del lecho alcanzado en estas condiciones, hizo que las partículas fueran evacuadas del reactor, lo que disminuyó la cantidad de biomasa y provocó la caída en los valores de las demás variables, incluyendo pH y relación de alcalinidades.

En este momento, se inició la adición de 0.5 g/L de bicarbonato de sodio en la alimentación para evitar la acidificación del sistema y se disminuyó la concentración de la DQO del influente a 900 mg/L y posteriormente a 700 mg/L. Esto disminuyó la carga orgánica volumétrica del reactor de 15.82 a 7.1 y finalmente a 5.4 kg DQO/m<sup>3</sup>·d.

Debido a la reducción del volumen del lecho y para alcanzar una expansión del 50%, la velocidad superficial se aumentó nuevamente a 4.6 m/h.

Con esta medidas se logró estabilizar el reactor y la eficiencia de remoción aumentó, como se muestra en la Figura 5.16, a partir del día 140 en que se fijó la última carga orgánica.

Cabe puntualizar que cuando la carga orgánica fue de 15.8 kg DQO/m<sup>3</sup>·d, se operó con una carga másica de 5.15 kg DQO/kg SVI·d, como se detalla en la Tabla 5.2. En esta misma Tabla se muestra que la actividad específica y la carga másica alcanzan para el último periodo de operación los valores más bajos de todo el experimento.

**Tabla 5.2.** Carga orgánica volumétrica, carga másica, actividad específica y velocidad superficial durante las diferentes etapas de operación del RLFI-2.

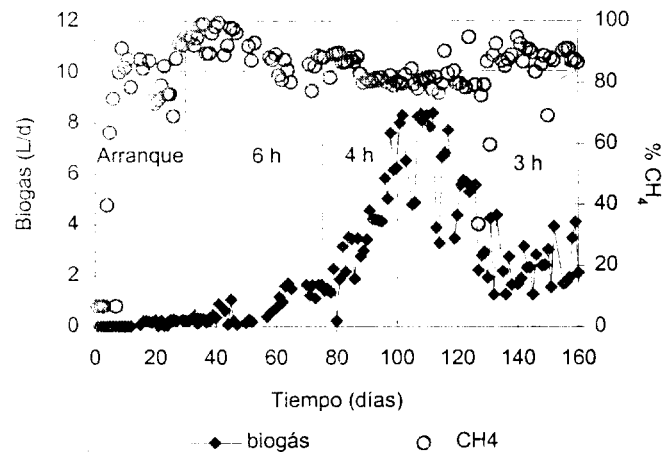
| Etapas   | Día | TRH (h) | Carga orgánica volumétrica | Carga másica      | Actividad Específica                   | Usl (m/h) |
|----------|-----|---------|----------------------------|-------------------|----------------------------------------|-----------|
|          |     |         | (kg DQO/m <sup>3</sup> ·d) | (kg DQO/kg SVI·d) | (kg DQO <sub>removido</sub> /kg SVI·d) |           |
| Arranque | 1   | 24      | 1.05                       | 1.88              | 1.55                                   | 7.3       |
|          | 19  |         | 1.26                       | 2.32              | 1.95                                   | 7.3       |
|          | 24  |         | 1.47                       | 2.59              | 2.27                                   | 7.3       |
|          | 30  |         | 1.68                       | 3.88              | 3.50                                   | 7.3       |
| Continuo | 33  | 6       | 1.68                       | 1.14              | 0.87                                   | 7.3       |
|          | 57  |         | 3.37                       | 2.23              | 1.56                                   | 7.3       |
|          | 80  | 4       | 7.91                       | 2.68              | 2.22                                   | 6.0       |
|          | 87  |         | 11.86                      | 4.50              | 3.85                                   | 3.7       |
|          | 102 | 3       | 15.82                      | 5.15              | 4.48                                   | 1.6       |
|          | 129 |         | 7.10                       | 3.94              | 2.07                                   | 4.6       |
|          | 138 |         | 5.38                       | 1.14              | 0.67                                   | 4.6       |

5.3.2.2. Producción y composición del biogás. Posterior al arranque se incrementó lentamente la producción de biogás, en particular a partir del día 57 y hasta que finalizó esta etapa en que se operó con un TRH de 6 h, como se muestra en la Figura 5.17. En este periodo puede verse que la composición de metano disminuye desde un valor máximo de 99.3% a valores alrededor de 85%.

Un patrón semejante se presentó durante el periodo siguiente (TRH de 4): cuando se aumentó la carga orgánica aumentó la producción de biogás, aunque en esta etapa, la composición de metano en el mismo no rebasó el 85%.

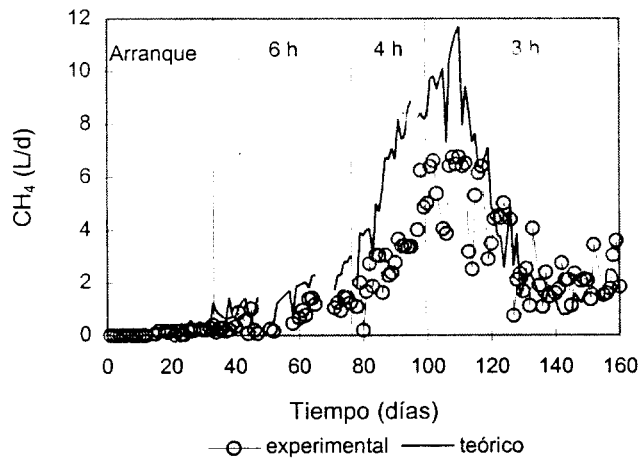
La producción de biogás en esta etapa y en la siguiente, en la que se operó el reactor con un TRH de 3 h, provocó nuevamente la expansión del lecho, el cual ocupó todo el espacio disponible en la zona de fluidificación. Para contrarrestar este efecto, la velocidad superficial con que se inició el experimento se disminuyó a 6.09 m/h en el día 80 y posteriormente a 3.77 en el día 87. Finalmente, cuando las biopartículas eran evacuadas constantemente del lecho y circulaban por todo el sistema o eran expulsadas de este junto con el efluente, la velocidad se disminuyó a 1.67 m/h. Estos cambios de velocidad superficial también están detallados en la Tabla 5.2.

En el periodo del día 102 al 110, se obtuvo la máxima producción de biogás, 8 L/d en promedio, sin modificación en el contenido de metano. Posteriormente, debido a la expansión y evacuación de biopartículas, la producción de biogás se volvió errática así como la composición de metano, como se muestra en la Figura 5.17.



**Figura 5.17.** Evolución de la producción de biogás y de la proporción de metano respectiva durante la operación del RLFI-2. La línea punteada indica el valor promedio de la composición de metano.

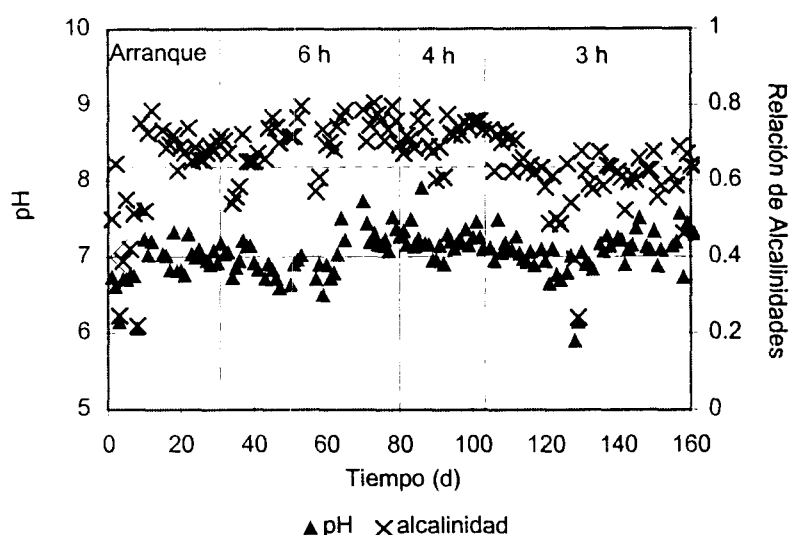
En la Figura 5.18 se muestra que durante la operación de este reactor, se obtuvieron nuevamente valores experimentales de metano por debajo de los valores teóricos esperados, variando entre 23 y 55%.



**Figura 5.18.** Comparación de la producción de metano detectado con respecto al metano esperado durante la operación del RLFI-2.

**5.3.2.3. Evolución del pH y de la relación de alcalinidades del efluente.** Al inicio de la operación en continuo se presentó una disminución en la relación de alcalinidades que se estabilizó en un lapso de 7 días aproximadamente, como se muestra en la Figura 5.19. Posteriormente, con el aumento de DQO en la alimentación en el día 57, se presentó una nueva disminución de la relación de alcalinidades así como del pH, niveles en los que el sistema se mantuvo en los días posteriores. El pH del efluente del reactor en esta etapa y en la siguiente (TRH de 4 h) aumentó a 7.2 y la relación de alcalinidades permaneció en un valor superior a 0.6.

Durante la última etapa de operación del reactor, cuando el TRH fue de 3 h, la relación de alcalinidades y el pH fueron disminuyendo lentamente y en el día 114 la relación de alcalinidades alcanzó un valor de 0.5 y el pH se volvió inestable.



**Figura 5.19.** Evolución del pH y de la relación de alcalinidades del efluente durante la operación del RLFI-2. Las líneas punteadas indican los valores promedio de ambos parámetros.

La estabilización de los valores de la relación de alcalinidades se presentó en el día 129, después de que se disminuyó la concentración de la alimentación y se adicionó bicarbonato, pero ya el 60% de las biopartículas habían sido desplazadas y evacuadas. Puede verse en la Figura 5.19 que los niveles de alcalinidad disminuyeron y no se recuperaron los que se habían alcanzado anteriormente.

Los problemas detectados en las demás variables debido a la expansión del lecho pasan prácticamente inadvertidos en los valores de pH; sin embargo, en la relación de alcalinidades son más notorios. De aquí la utilidad en el uso de este parámetro para llevar a cabo el seguimiento de la capacidad de conversión del reactor.

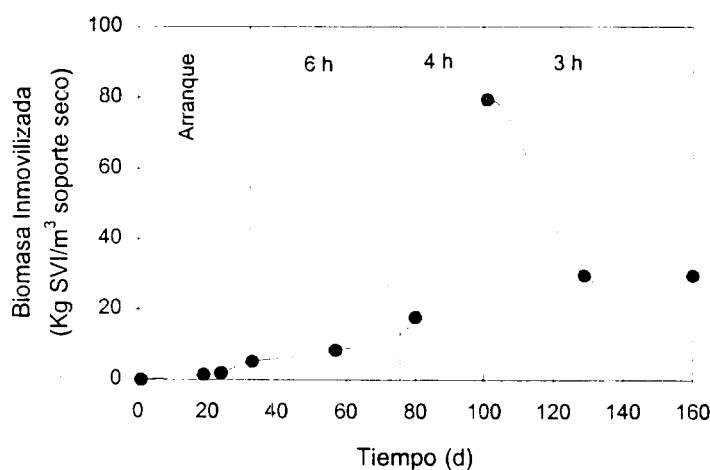
5.3.2.4. Evolución de los sólidos suspendidos en el efluente y acumulación de biomasa inmovilizada en el soporte. La operación posterior al arranque se inició con una concentración de biomasa en el soporte de  $1.9 \text{ kg SVI/m}^3$  soporte seco, que aumentó rápidamente a 5.2 en un lapso de 10 días (véase la Figura 5.20). En el día 53 la concentración de biomasa había aumentado a  $8.43 \text{ kg SVI/m}^3$  soporte seco, lo que permitió un aumento de la concentración de DQO en la alimentación, como se indicó anteriormente, para operar con cargas másicas superiores a  $2.0 \text{ kg DQO /kg SVI-d}$ . La actividad específica de las biopartículas calculada para esta etapa fue de  $1.56 \text{ kg DQO removido/kg SVI-d}$ .

Al iniciar la etapa en la que el TRH se disminuyó a 4 h, la cantidad de biomasa era de  $17.7 \text{ kg SVI/ m}^3$ .

El aumento respectivo de la carga orgánica volumétrica, incrementó la producción de biogás y expandió el lecho, por lo que la velocidad superficial se disminuyó de 6 a 3.7 m/h como se detalló en la Tabla 5.2.

El efecto sobre la concentración de biomasa fue un aumento de 4.5 veces, es decir, se acumularon 79.48 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco, como se muestra en la Figura 5.20, equivalentes a 13.8 kg/m<sup>3</sup> reactor, debido probablemente a la disminución de la fricción entre las partículas. Tal acumulación de biopelícula cambió la densidad de algunas de ellas haciendo que sedimentaran.

Durante este periodo la actividad específica fue de 3.85 kg DQO removido/kg SVI-d, que es prácticamente el doble de lo reportado por Heijnen *et al.* (1989).

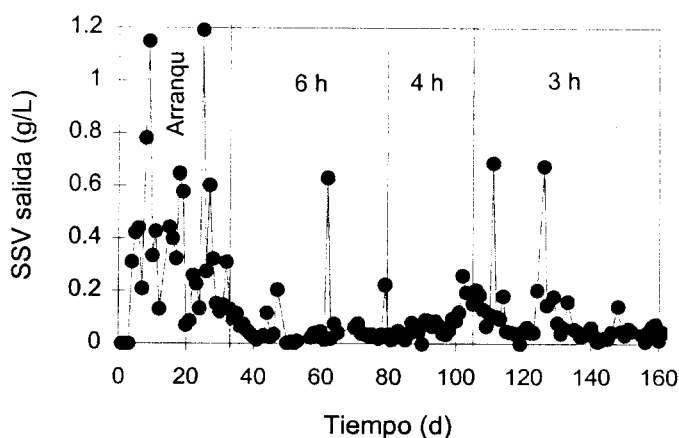


**Figura 5.20.** Variación de la concentración de biomasa inmovilizada durante la operación del RLFI-2.

La última etapa de operación del reactor se inició en el día 102 con una velocidad superficial de 1.65 m/h. Para este periodo de 27 días, se operó con una carga

másica de 5.15 kg DQO/kg SVI-d y la actividad de las biopartículas fue de 4.5 kg DQO removido/kg SVI-d. Las cargas aplicadas produjeron problemas de expansión y evacuación de biopartículas junto con el efluente, lo que provocó perturbaciones en el sistema, como se detalló en las secciones anteriores. Entre ellas, la disminución de la biomasa, como se ve en la Figura 5.20, ya que se determinó que la total inmovilizada remanente era 4.4 kg SVI/m<sup>3</sup> reactor, pues se había perdido el 62.6 % del soporte inicial. Consecuentemente, la carga orgánica volumétrica y por ende la carga másica y la actividad específica, disminuyeron como se detalló en la Tabla 5.2.

En cuanto a la evolución de los SSV en el efluente, mostrada en la Figura 5.21, se encontraron aumentos esporádicos de la concentración. Esto es debido a que el sistema expulsa sólidos acumulados dentro del reactor que se produjeron con los aumentos en la concentración de sustrato.



**Figura 5.21.** Evolución de los sólidos suspendidos volátiles del efluente durante la operación del RLFI-2.

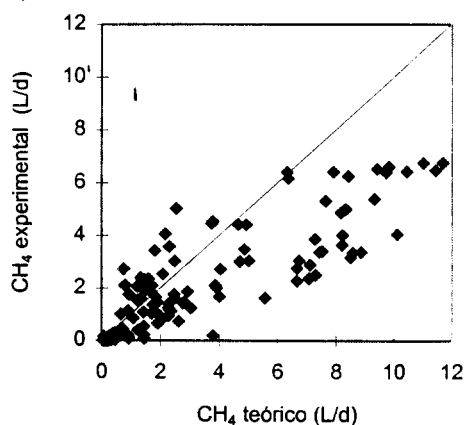
Puede observarse que durante el periodo de mayor producción de biomasa inmovilizada (del día 80 al 102), hubo un aumento en la concentración de sólidos suspendidos en el efluente, que son expulsados posteriormente.

#### 5.4. Discusión.

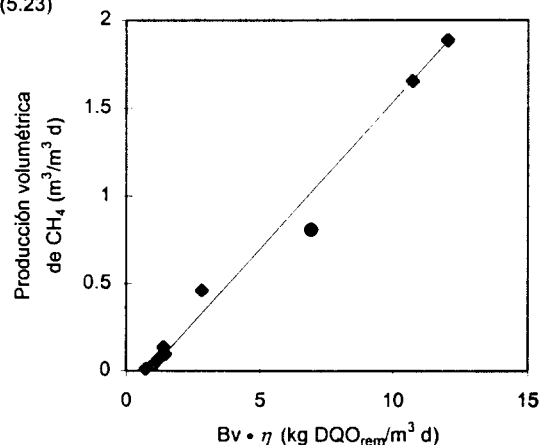
La relación del biogás experimental y el teórico esperado esta representado en la Figura 5.22. Al igual que en la Figura 5.9, la línea diagonal denotaría los puntos en los cuales el sustrato consumido es convertido a metano, considerando la eficiencia de remoción del sistema.

Los puntos que caen abajo de la diagonal corresponden al metano experimental detectado y la distancia a la diagonal representa la cantidad de metano no detectada.

(5.22)



(5.23)



**Figuras 5.22 y 5.23.** Comparación entre el metano producido y el metano esperado y la relación entre la producción de metano con respecto a la carga orgánica volumétrica removida durante la operación del RLFI-2.

Se obtuvieron algunos puntos experimentales que caen arriba de la diagonal, que representan la producción de metano en la última etapa de operación del sistema, en la ésta disminuyó y el patrón de producción fue errático (véase también la Figura 5.18, en el periodo de 130 a 160 días de operación).

La Figura 5.23 muestra la relación entre la producción de metano y la carga orgánica volumétrica multiplicada por la eficiencia del sistema la cual es lineal ( $r = 0.992$ ).

La pendiente de la relación de ambos parámetros es equivalente a  $0.16 \frac{\text{m}^3 \text{CH}_4}{\text{kg DQO}}$ ,

que comparado con el valor teórico de  $0.34 \frac{\text{m}^3 \text{CH}_4}{\text{kg DQO}}$ , indica que se detectó el 47%

del metano producido y que el 53% restante es retenido en el interior del reactor como se ha señalado anteriormente.

Del análisis de ambas Figuras se infiere el efecto adverso que provoca la sobreexpansión y evacuación de partículas de la zona de fluidización, las cuales se estancan en el separador o son evacuadas junto con el efluente, como se discutió en la sección 5.2.

En el caso específico de este reactor, debe considerarse también la influencia de la concentración de biomasa en el soporte, ya que se obtuvo la mayor concentración al disminuir la velocidad superficial del líquido para contrarrestar la expansión. Tal cantidad de biomasa cambió la densidad de las biopartículas, haciendo que algunas de ellas sedimentaran, como se mencionó anteriormente. Este efecto sobre el soporte esta reportado por García-Calderon *et al.* (1997), quienes encontraron que la

velocidad terminal para partículas con densidad aparente de  $213 \text{ kg/m}^3$  cubiertas con biopelículas de 72 micras de espesor, disminuía hasta en un 58% con respecto a la velocidad terminal de partículas de soporte sin biomasa adherida.

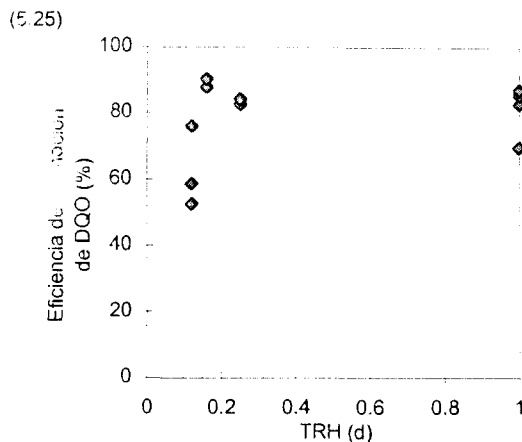
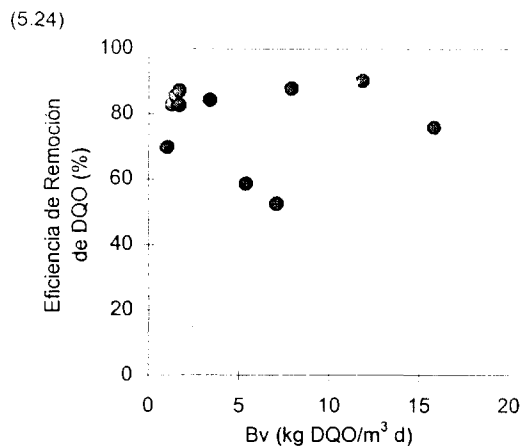
Considerando que para partículas con menor densidad que la del líquido, la velocidad terminal está dada en parte por la fuerza de flotación, la acumulación de biomasa disminuye este factor ya que cambia la densidad de la partícula y por lo tanto se vuelve más susceptible de ser arrastrada fuera del reactor por el flujo de líquido.

En este caso deben considerarse ambos fenómenos como responsables de la evacuación de partículas y de la subsecuente disminución en la capacidad de conversión obtenida posterior a la expansión.

En ambos reactores se conoce la cantidad de biogás retenida, sin embargo, no es posible determinar la fracción de gas que ocupa el lecho por medio de relaciones propuestas como la de Fan *et al.* (1982), pues se desconoce la velocidad superficial del gas,  $U_{sg}$ , ya que éste es producido dentro del lecho por la biopelícula.

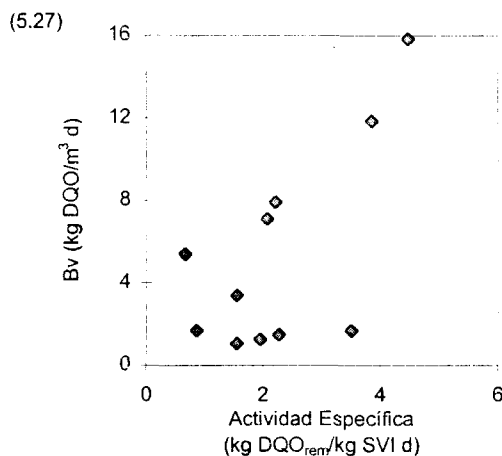
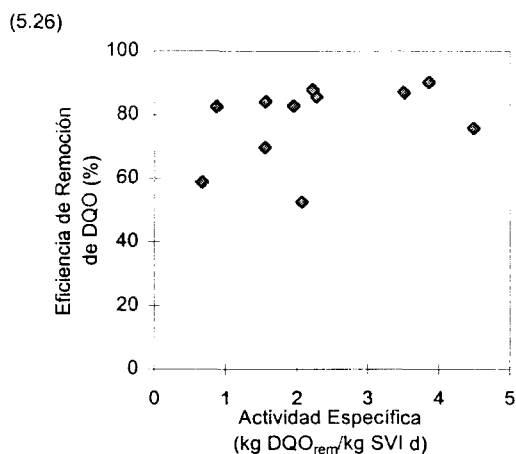
En la Figura 5.24, puede verse la relación que existe entre la eficiencia de remoción y la carga orgánica, en donde la mayoría de los datos corresponden a eficiencias arriba de 70%. Lo mismo sucede con la Figura 5.25, en la que se muestra que pueden obtenerse altas eficiencias con cualquier TRH, aunque para los tiempos de retención más bajos también se tienen datos de eficiencias menores a 60%, que

corresponden a la etapa en la cual la evacuación de partículas del lecho limitó la capacidad de conversión del sistema.



**Figuras 5.24 y 5.25.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la carga orgánica aplicada y a los TRH utilizados durante la operación del RLFI-2.

En la Figura 5.26, se muestra que las eficiencias de remoción están alrededor del 80% y que las actividades específicas fueron mucho mayores que las reportadas por Heijnen *et al.* (1989).



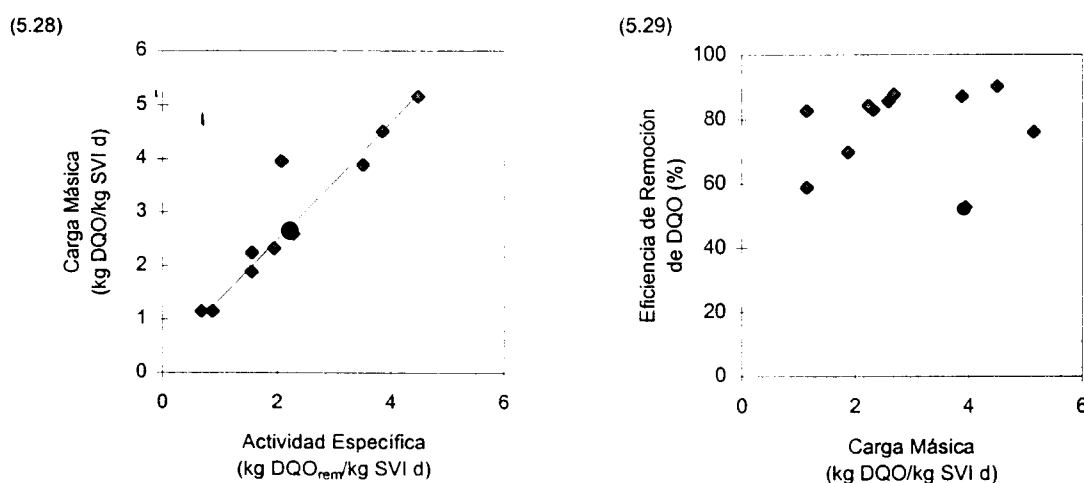
**Figuras 5.26 y 5.27.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO y las cargas orgánicas aplicadas con respecto a la actividad específica de las biopartículas del RLFI-2.

La Figura 5.27, muestra que se alcanzaron las más altas actividades específicas cuando se operó el reactor a las mayores cargas orgánicas volumétricas.

Aparentemente existe una relación lineal entre ambos parámetros, pero no debe considerarse precisa ya que resulta en un coeficiente de correlación de 0.75, debido a la dispersión de los datos en la porción de bajas cargas y bajas actividades de la gráfica.

En la Figura 5.28 se muestra la relación lineal que existe entre la carga másica aplicada al sistema y la actividad específica. Esto es predecible, si se considera que la actividad específica representa la capacidad de remoción de las biopartículas y por ende del sistema.

Igualmente, en la Figura 5.29, se muestra que la eficiencia de remoción no disminuye del 60% por efecto de las cargas másicas. La disminución fue debida a los problemas de expansión.



**Figuras 5.28 y 5.29.** Relación entre las cargas másicas aplicadas y la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la actividad específica de las biopartículas durante la operación del RLFI-2.

La carga másica es un parámetro poco reportado en sistemas anaerobios con biomasa inmovilizada, debido al desconocimiento de la concentración de biomasa. Se ha reportado comúnmente que los reactores anaerobios con biomasa granular operan con cargas másicas máximas de 1.5 a 2.0. En este caso se alcanzaron cargas másicas cercanas a 6.0 kg DQO/kg SVI·d. La explicación más probable, es la que considera que en estos sistemas, las biopelículas son compactas, la penetración de los sustratos en las biopelículas es completa, es decir, no existen problemas difusionales como en los gránulos, ya que la agitación a que están sujetas las biopartículas por la tasa de recirculación utilizada para lograr la expansión del lecho, mejora estos procesos.

Finalmente, en la Tabla 5.3 se comparan algunos resultados obtenidos para los RLFI que se estudiaron en este trabajo y para los lechos fluidificados ascendentes reportados por Heijnen *et al.* (1989).

**Tabla 5.3.** Comparación entre datos experimentales de este estudio y los datos reportados para reactores de lecho fluidificado ascendente por Heijnen *et al.* (1989).

| Sistema                                                  | RLFI-1      | RLFI-2      | RLF ascendente   |
|----------------------------------------------------------|-------------|-------------|------------------|
| Tipo de soporte                                          | Polietileno | Polietileno | GAC, arena, etc. |
| Diámetro promedio del soporte (mm)                       | 0.4         | 0.4         | 0.2-0.8          |
| Velocidad superficial (m/h)                              | 2.6-9.0     | 1.6-7.3     | 5-35             |
| Concentración de biomasa (kg SVI/m <sup>3</sup> reactor) | 5.2         | 13.8        | 40-150           |
| Actividad específica (kg DQO/kg SV·d)                    | 1.0-2.8     | 0.8-4.4     | 0.7-2.0          |

Los valores de actividad obtenidos en este trabajo en comparación con el lecho fluidificado de flujo descendente, superan a los reportados por estos autores, aún cuando la concentración de biomasa en  $\text{kg SVI/m}^3$  reactor sean menores.

La variable más distintiva entre el sistema ascendente y el descendente, es la velocidad superficial de operación, que en el RLFI representa una ventaja para minimizar el tamaño y por lo tanto los costos de los equipos de bombeo.

Es posible considerar que, debido al mezclado proporcionado por el régimen hidrodinámico se alcanzan actividades específicas que rebasan a las reportadas, aún con las bajas concentraciones de biomasa obtenidas.

La dependencia de estos sistemas con el mezclado proporcionado por la tasa de recirculación es definitiva en la operación. Como se mostró en el caso de la acidificación del RLFI-1, en el que la suspensión de la recirculación provocó la falta de dilución de los ácidos producidos por las bacterias fermentativas, presentándose una acumulación local de ácidos en el lecho, lo que inhibió el proceso acetoclástico. Se considera también que el fuerte desprendimiento de biomasa, posterior a la acidificación y posterior al reinicio de la alimentación, es probablemente debido a la muerte celular de los microorganismos de la biopelícula.

La influencia de la altura del lecho y por consecuencia, de la relación  $H_0/D_R$ , que para el RLFI-1 fue del doble que para el segundo, es crucial en las cargas orgánicas volumétricas aplicables a este sistema, ya que las máximas alcanzadas en uno y otro reactor fueron de 3.45 y de 15.8  $\text{kg DQO/m}^3 \cdot \text{d}$  respectivamente, debido al

momento en que la expansión alcanzada por ambos afectó directamente la operación del sistema.

Finalmente cabe señalar que, los niveles de inoculación utilizados resultaron ser adecuados, ya que este sistema no puede operarse con niveles altos de inoculación, debido a que la densidad y viscosidad de los lodos cambian la viscosidad de la fase líquida. Esto provoca que el soporte, que es casi 4 veces más ligero que el agua, sea arrastrado fuera del reactor.

Una concentración de lodos tal como el 30% del volumen del reactor, hace que queden atrapados en el soporte y este sea arrastrado, lo que provoca taponamientos y problemas de bombeo. Esto coincide con lo reportado por Stephenson y Lester (1986), que encontraron problemas operacionales en lechos fluidificados cuando se utilizaban niveles de inoculación superiores a 12%.

Debe recordarse que Guiot (1992); Chen *et al.* (1988); Balguier *et al.* (1992); Zellner (1994) y Borja y Banks (1995) recomiendan altos niveles de inoculación para el arranque de reactores inmovilizados, entre 15 y 20%. Al contrario, Gorris *et al.* (1989) demuestran que con 200 mg/L de biomasa metanogénica suministrada de manera constante en la alimentación a reactores fluidificados, es posible llevar a cabo la inmovilización en el soporte, manipulando las cargas orgánicas. Estos resultados son coincidentes con los de este trabajo.

## 5.5. Conclusiones

La limitada recuperación de metano en fase gaseosa ha sido reportada en tratamientos en los cuales la concentración del influente es baja. De acuerdo a la Ley de Henry del equilibrio gas-líquido, el metano disuelto representa una fracción importante del metano total producido en estos casos (Noyola *et al.*, 1988).

Para ambos reactores la Ley de Henry explica una pequeña parte del metano no detectado. Pero el patrón hidrodinámico de flujo descendente con el que opera el sistema, sugiere que una gran parte del biogás se mantiene en la fase líquida en forma de microburbujas, incrementando la fracción de gas y expandiendo el lecho.

En el caso del RLFI-1, el problema de expansión puede atribuirse completamente a la retención de biogás en el reactor, pues en este caso la concentración de biomasa aparentemente, no dio lugar al cambio en densidad de las partículas. En el caso del RLFI-2, debe considerarse que la expansión y el desplazamiento de partículas fue debida a la combinación de la acumulación de biomasa en el soporte que cambió la densidad del mismo y a la retención del biogás que evacuó a las biopartículas del lecho.

El proceso de acumulación de biogás en el lecho aparentemente es un proceso lento, ya que para que se presentara la etapa más aguda de este fenómeno se requirieron cerca de 40 días para que ambos reactores mostraran la mayor

diferencia entre el metano cuantificado y el teórico esperado (véase la Figuras 5.5 en la etapa de 150 a 200 días y la Figura 5.18 en el periodo de 80 a 120 días).

La saturación de la fase líquida con metano favorece su evacuación en el efluente debido al transporte por gradiente de concentración hacia la fase gaseosa del medio ambiente.

Las actividades específicas obtenidas rebasan las reportados para lechos fluidificados ascendentes y el patrón que sigue la relación de alcalinidades indica que los reactores son capaces de producir suficientes bicarbonatos con las cargas orgánicas suministradas. Se considera que el sistema tiene capacidad para cargas orgánicas mucho más altas, pero los problemas de expansión evitan cualquier incremento posterior.

Es notable el hecho de que la relación  $H_0/D_R$  es fundamental para la estabilidad y capacidad de conversión del sistema. Aparentemente estos reactores deberán diseñarse para un nivel de expansión del lecho dado por la carga orgánica volumétrica aplicada.

Finalmente, cabe mencionar que resulta ventajoso el inocular reactores con niveles bajos, ya que no siempre se tienen lodos anaerobios disponibles. Lo anterior sugiere que el mecanismo de adhesión no es completamente dependiente de un alto nivel de inoculación y probablemente sigue los pasos descritos por Guiot (1992) para llevar a cabo la inmovilización de células.

# 6 Tratamiento de aguas residuales municipales en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI)

A la fecha, se estima en México una descarga de  $232 \text{ m}^3/\text{s}$  de agua residual municipal, de la cual solamente el 20% recibe tratamiento en aproximadamente 946 plantas. De estas, el 40% son lagunas de estabilización y otro 40% lodos activados, zanjas de oxidación, lagunas aireadas y filtros percoladores. Del total, sólo el 79% opera; aproximadamente la mitad con eficiencias del 75% y la otra mitad con eficiencias menores a 50%.

Por otro lado, existen 75 digestores anaerobios en México, de los cuales casi la mitad trata aguas residuales de origen doméstico y corresponden a reactores pequeños: 27% con volúmenes menores a  $40 \text{ m}^3$  y 39% con volúmenes entre 40 y  $100 \text{ m}^3$  (Monroy *et al.*, 1997).



De las aguas municipales descargadas sin tratamiento en el Valle de México, alrededor de  $60 \text{ m}^3/\text{s}$  son llevados al Valle del Mezquital, en donde son usados para riego, en una zona de cultivo intensivo en donde se requiere agua y enriquecimiento de la tierra por medio de la materia orgánica contenida en la misma.

Los reactores de lecho fluidificado inverso o de flujo descendente, han sido reportados para el tratamiento aerobio de aguas municipales (Karamanev y Nikolov, 1996), como se describió en los Antecedentes, por lo que representan una opción viable para el tratamiento de aguas de baja concentración o de origen doméstico, debido a la baja retención de sólidos y a las altas eficiencias que pueden alcanzar.

En este Capítulo se muestran los resultados obtenidos de una año de operación del RLFI con aguas residuales provenientes de la descarga de la UAM Unidad Iztapalapa.

Se comprobó la utilidad del prototipo en el tratamiento de este residuo, ya que la baja concentración de las aguas no conlleva una alta producción de biogás y por lo tanto, no se presentan problemas de expansión.

Dado que en el Capítulo anterior se encontró que estos reactores son capaces de tolerar cargas orgánicas volumétricas y másicas muy altas, en este experimento se disminuyeron los TRH a valores menores a 1 hora, para aumentar el nivel de estos parámetros.

En las Figuras de este Capítulo se encontrarán discontinuidades en las series de resultados, que señalan los periodos vacacionales de verano y de invierno.

Igualmente, los periodos de muy baja concentración (menores a 100 mg/L), corresponden a las vacaciones intertrimestrales en las que disminuye la población estudiantil.

Es importante señalar que después de 250 días de operación se adicionó soporte, con el objeto de inmovilizar más biomasa y poder disminuir la carga másica para aumentar la eficiencia de remoción, conservando 36 minutos de TRH.

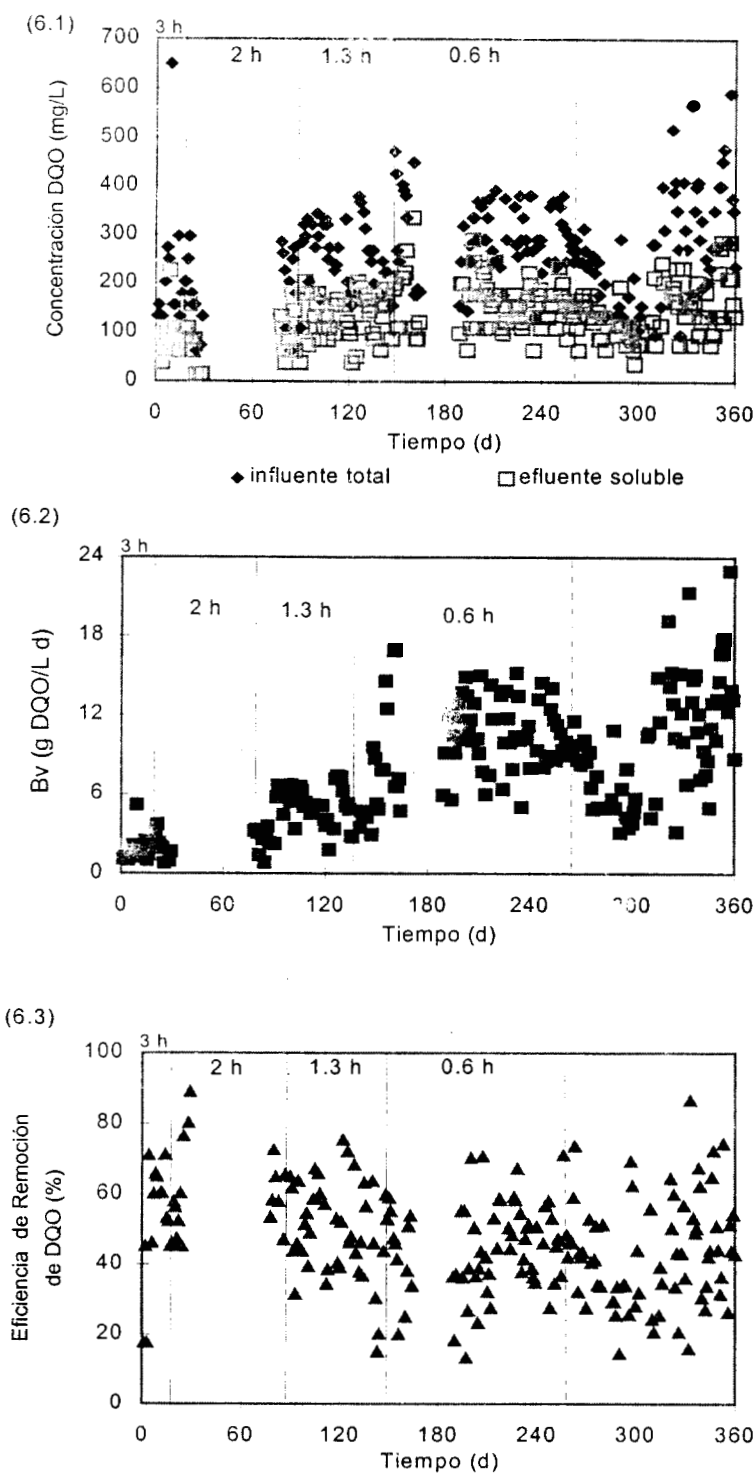
Finalmente, en la Discusión se presenta un análisis del conjunto de los parámetros que están relacionados.

### 6.1. Arranque (16 días)

El arranque del reactor se inició con un volumen de soporte ya colonizado de 0.377 L con una concentración de biomasa de 3.47 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco, equivalentes a 0.52 kg SVI/m<sup>3</sup> de reactor. El TRH durante este periodo fue de 3 horas y la DQO promedio del influente fue de  $218.8 \pm 141.3$  mg/L. Cuando el reactor alcanzó eficiencias de remoción promedio de 53%, se disminuyó el TRH a 2 h para iniciar la operación en continuo.

### 6.2. Operación en continuo (344 días)

6.2.1. Evolución de la concentración de DQO, carga orgánica volumétrica y eficiencia de remoción. En la Figura 6.1 se muestra la evolución de la concentración del agua residual con respecto al tiempo. El sistema se mantuvo con un TRH de 2 h por un periodo de 20 días efectivos, debido al periodo vacacional de verano. Para este lapso, la concentración de DQO del influente disminuyó a  $185.5 \pm 73.0$  mg/L. A partir del día 90 el reactor fue operado a un TRH de 1.3 h y la DQO fue de  $272.3 \pm 78.0$  mg/L. Finalmente el TRH se redujo a 0.6 h con una DQO promedio en el influente de  $280.6 \pm 99.0$  mg/L. En la Figura 6.2 se muestran las cargas orgánicas volumétricas suministradas de acuerdo con los TRH operados. Las eficiencias de remoción alcanzadas después del arranque se muestran en la Figura 6.3 y puede verse como disminuyen conforme disminuye el TRH.



**Figuras 6.1, 6.2 y 6.3.** Evolución de la concentración de DQO total en el influente y soluble en el efluente, de la carga orgánica volumétrica (Bv) y de la eficiencia de remoción, durante el periodo de operación del reactor. La línea punteada indica el momento en el cual se adicionó soporte.

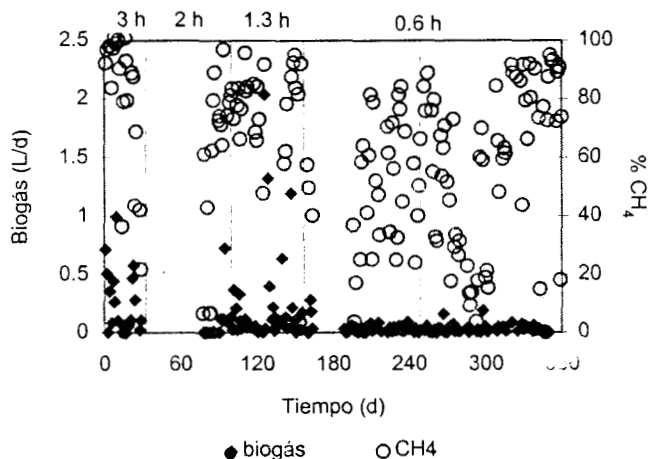
Las bajas eficiencias de remoción son debidas a los cortos TRH utilizados, pues no hay tiempo suficiente para una mayor remoción de materia orgánica disuelta. La actividad específica también se ve afectada por la disminución de este parámetro, como se muestra en la Tabla 6.1.

En el día 253 se adicionaron 0.379 L de soporte para un volumen final del lecho de 0.756 L. Al momento de adicionar el soporte, se operó con la misma carga másica y se obtuvo una actividad específica similar, ya que la eficiencia de remoción promedio para el periodo anterior y posterior a la adición de soporte era de 44%. Posteriormente, aún con la acumulación de biomasa (alrededor de 3.6 kg SVI/m<sup>3</sup> reactor), no hay un aumento perceptible en la eficiencia de remoción como se ve en las Figuras 6.1 y 6.3, pero la carga másica disminuyó de 10.6 a 9.2 kg DQO/kg SVI-d. Los valores promedio de las cargas orgánica volumétricas y las cargas másicas aplicadas durante cada periodo están indicados en la Tabla 6.1, donde se detallan algunos resultados de la operación del reactor.

**Tabla 6.1.** Cargas orgánicas volumétricas, cargas másicas, actividades específicas y velocidades superficiales obtenidos durante la operación del RLFI para tratamiento de aguas residuales de la UAM-I.

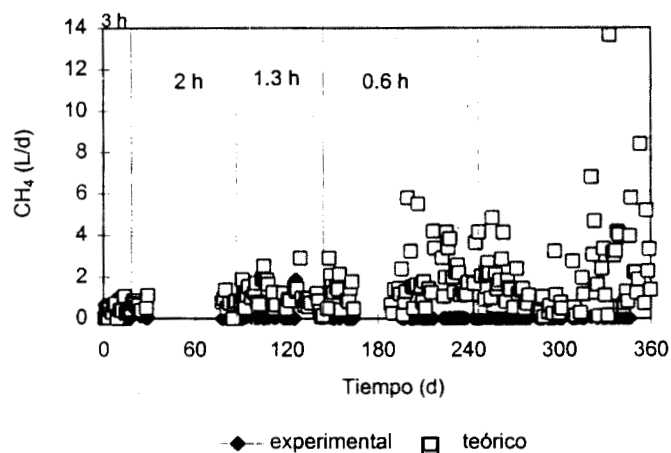
| Día | TRH (h) | Gasto (L/d) | Carga orgánica volumétrica (kg DQO/m <sup>3</sup> -d) | Carga Másica (kg DQO/kg SVI-d) | Actividad Específica (kg DQO <sub>removido</sub> /kg SVI-d) | U <sub>sl</sub> (m/h) |
|-----|---------|-------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1   | 3.0     | 19.0        | 1.7                                                   | —                              | —                                                           | 10.9                  |
| 17  | 2.0     | 32.0        | 2.3                                                   | 4.4                            | 2.6                                                         | 10.6                  |
| 90  | 1.3     | 48.0        | 5.2                                                   | 6.9                            | 2.9                                                         | 10.7                  |
| 155 | 0.6     | 92.0        | 10.4                                                  | 10.6                           | 4.2                                                         | 11.9                  |
| 255 | 0.6     | 92.0        | 10.3                                                  | 9.2                            | 4.1                                                         | 7.6                   |

6.2.2. Producción y composición del biogás. En este caso, la cantidad de biogás obtenida durante el periodo de operación del reactor fue cercana a cero, aunque la fracción del metano es muy variable, como se muestra en la Figura 6.4. Los valores promedio para el arranque y las etapas posteriores son 89.6, 55, 78 y 55.6%. Para el TRH de 1.3 h, se obtuvo un alto valor en la composición del metano, debido a que es un periodo en el cual la concentración de materia orgánica del agua residual se mantuvo estable y cercana a los 300 mg/L.



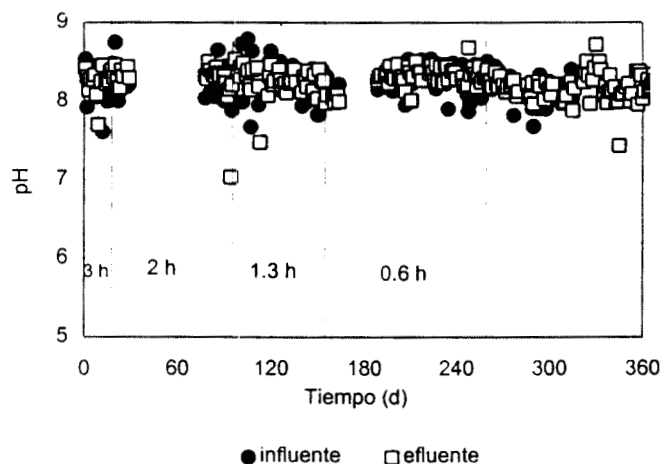
**Figura 6.4.** Producción de biogás y fracción de metano durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I en el RLFI.

El metano detectado fue en promedio del 10% del teórico esperado, como se muestra en la Figura 6.5. La fracción del mismo disuelto en el agua residual bajo condiciones de equilibrio es de alrededor de 12%, aunque es probable que en el efluente se encuentre un exceso de este producto y sea liberado a la atmósfera.



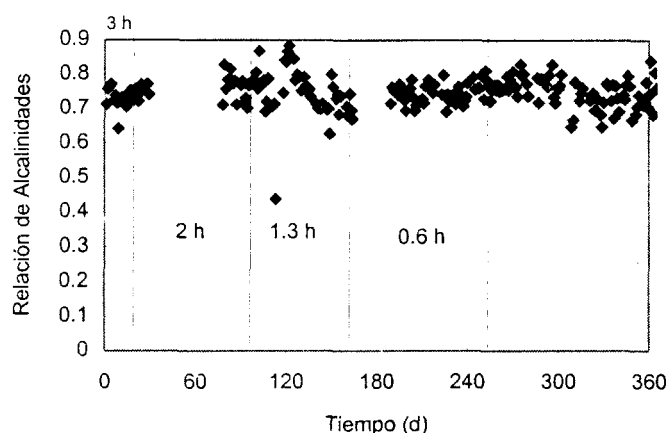
**Figura 6.5.** Comparación entre el metano producido y el teórico durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I en el RLFI.

6.2.3. Evolución del pH y de la relación de alcalinidades. El pH varió poco y se mantuvo en un nivel alcalino para influente y efluente, con valores de  $8.21 \pm 0.23$  y  $8.24 \pm 0.18$ , respectivamente, por la capacidad de conversión del reactor debida a los cortos tiempos de retención utilizados.



**Figura 6.6.** Evolución del pH durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-i en el RLFI.

Como se aprecia en la Figura 6.7, durante la operación del reactor la relación de alcalinidades se mantuvo en un valor promedio de 0.74, indicando que el reactor operó de manera estable en cuanto a que no se acumularon ácidos volátiles, aún con cargas másicas superiores a las tolerables por sistemas anaerobios, como se detalló en la Tabla 6.1.



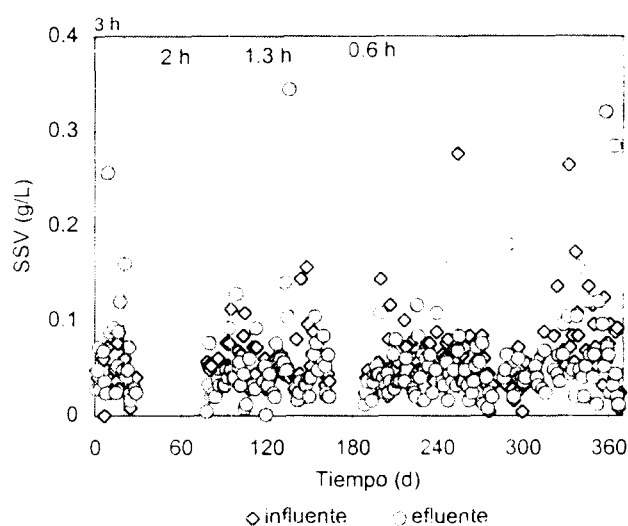
**Figura 6.7.** Evolución de la relación de alcalinidades durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I en el RLFI.

En esta Figura se distinguen alrededor de los días 130 y 300, disminuciones en este parámetro. En ambas etapas hubo una concentración de detergentes en el agua residual, debido a la disminución del caudal durante los periodos vacacionales y a actividades de limpieza propias del *campus*.

Algunos puntos muy bajos en ambas Figuras, son debidos probablemente a sustancias químicas no identificadas presentes en el agua residual.

#### 6.2.4. Evolución de los sólidos suspendidos y acumulación de biomasa inmobilizada.

El reactor no presentó retención de sólidos suspendidos, debido a que el flujo descendente y los TRH tan cortos con los que fue operado, no permiten que estos sean removidos o permanezcan dentro del sistema como puede verse en la Figura 6.8.

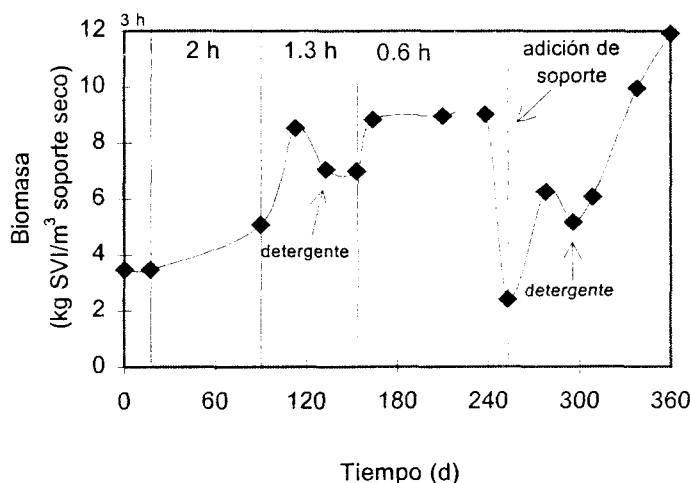


**Figura 6.8.** Evolución de los sólidos suspendidos volátiles en influente y efluente, durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I en el RLFI.

En la Figura 6.9 se muestra la evolución de biomasa en el soporte durante la experimentación. Puede verse que una de las más altas concentraciones de biomasa alcanzadas se obtuvo durante el periodo de operación a un TRH de 1.3 h.

Es necesario señalar que las disminuciones de biomasa presentadas en esta Figura, coinciden y probablemente se hayan debido a detergentes (surfactantes, germicidas y cloro) descargados que se concentran por disminución del caudal del agua residual del *campus* que se presentan en periodos intertrimestrales.

Aunque el efecto pudiera deberse también a que el aumento de carga consecuente a la disminución del TRH implica un aumento en la concentración de otros compuestos, como desechos propios de actividades de investigación o reactivos químicos.



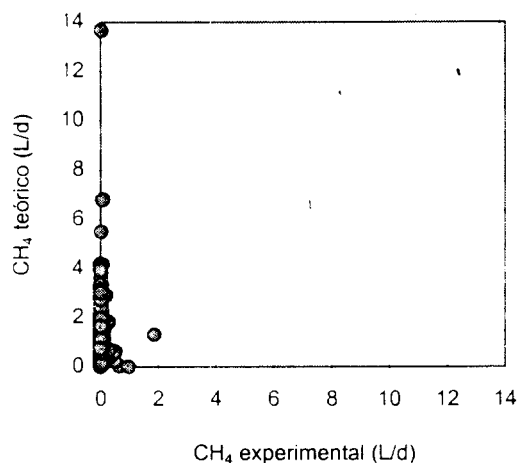
**Figura 6.9.** Evolución de la biomasa inmovilizada al soporte durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I en el RLFI.

En la línea punteada se tiene la disminución consecuente de la concentración de biomasa inmovilizada al adicionar soporte limpio, equivalente a  $0.73 \text{ kg SVI/m}^3$  de reactor. Sin embargo en los parámetros revisados anteriormente, no se nota tal disminución, pues la carga orgánica volumétrica y másica fue la misma.

### 6.3. Discusión

Como se mostró en la sección 6.2.2, no se detectó el gas producido debido probablemente a que una fracción del mismo se encuentra disuelto y el flujo descendente mantiene el efluente con un exceso de este compuesto.

Esto se aprecia claramente en la Figura 6.10, donde puede verse que los datos graficados corresponden casi en su totalidad a los teóricos calculados ya que la mayoría de los datos experimentales son cercanos o iguales a cero.

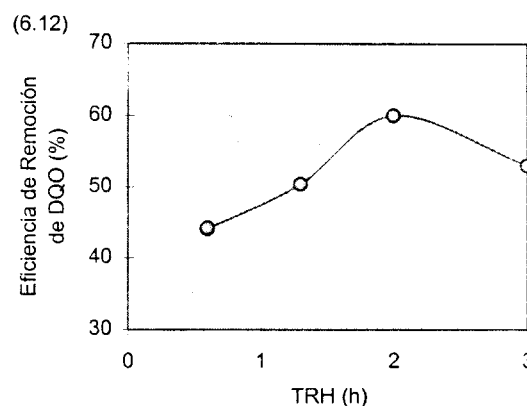
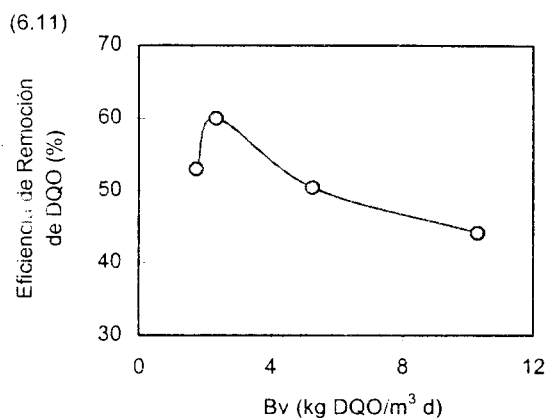


**Figura 6.10.** Comparación entre la producción teórica y experimental de metano durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I con el RLFI.

Noyola *et al.* (1988) señalaron que para aguas residuales de baja concentración, la producción de metano es muy baja y la fracción que esta disuelta en el líquido es proporcionalmente importante, mayor a 50% a temperatura ambiente. En este caso, sucede el mismo fenómeno: se detectaron bajas cantidades de metano. Se considera que otros factores que intervienen en la baja producción, tales como los

cortos TRH utilizados durante la experimentación, las bajas concentraciones y a la variabilidad de las mismas en el influente, que en valor promedio considerando todos los días de experimentación fue de  $266.3 \pm 99.6$  mg DQO/L.

La disminución de la eficiencia de remoción se ve claramente con el aumento de las cargas orgánicas aplicadas, como se detalló anteriormente en la Tabla 6.1 y como se muestra en la Figura 6.11. Tal disminución no es debida al nivel de las cargas orgánicas volumétricas en sí, como puede verse en la Figura 6.12, donde se muestra el efecto del TRH sobre la eficiencia de remoción.



**Figuras 6.11 y 6.12.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO con respecto a la carga orgánica aplicada y a los TRH utilizados durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I con el RLFI.

El TRH tan corto impide que la materia orgánica particulada permanezca en contacto con la biopelícula el tiempo suficiente para ser degradada, por lo que las eficiencias de remoción se refieren a la materia orgánica disuelta.

El aumento de biomasa inmovilizada posterior a la adición de soporte, disminuyó la carga másica como se mencionó anteriormente, pero no mejoró substancialmente la eficiencia de remoción.

Al aplicar al sistema cargas másicas arriba de 10 kg DQO/kg SVI·d, disminuyó la eficiencia de remoción. Este puede ser un factor que influya en la conversión de la materia orgánica, ya que los valores de carga másica máxima reportados para reactores UASB son de 3 a 7 kg DQO/kg SSV·d, pero se operan generalmente entre 0.5 y 2.0 (Viñas, 1994). Para los RLF no se tienen valores reportados.

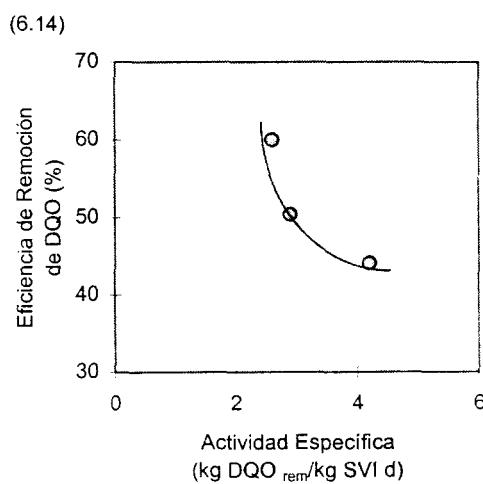
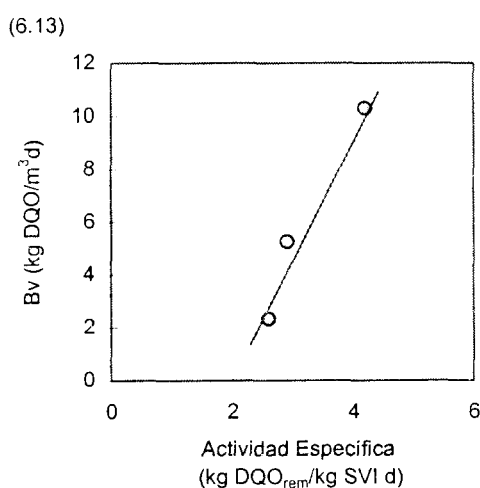
Sin embargo, es probable que el reactor resista las altas cargas másicas aplicadas sin problemas, debido a que existe un mezclado intenso en el lecho, por lo que probablemente las limitaciones de transporte de sustrato a la biopelícula hayan sido minimizadas.

En las Figuras 6.13 y 6.14, se muestra la relación que existe entre la eficiencia de remoción, la carga orgánica volumétrica y la actividad específica de las biopartículas. Cada punto representa el valor promedio del parámetro correspondiente para cada TRH probado.

En este caso puede verse en la Figura 6.13, que existe una relación ascendente de la actividad específica con respecto a la carga orgánica. La biomasa inmovilizada corresponde a 4.65 kg SVI/m<sup>3</sup> reactor, calculada a través de la pendiente de la relación lineal de estos parámetros, cuyo coeficiente de correlación es de 0.98.

Sin embargo, este valor es mayor que la concentración de biomasa determinada experimentalmente que resulta en  $3.62 \text{ kg SVI/m}^3$  reactor.

Con respecto a la eficiencia de remoción la relación es descendente, como se muestra en la Figura 6.14, ya que disminuyó con el TRH, como se mostró en la Figura 6.12. La actividad específica se mantuvo igual en promedio antes y después de la adición de soporte, como se mencionó anteriormente.



**Figuras 6.13 y 6.14.** Relación entre la eficiencia de remoción de DQO, la carga orgánica volumétrica (Bv) y la actividad específica durante el tratamiento de aguas residuales de la UAM-I con el RLFI.

Esto demuestra que la capacidad de remoción del reactor dependería en cierta medida de la cantidad de biomasa presente en el sistema aunque no es independiente del tiempo que las biopartículas se mantengan en contacto con la materia orgánica para que esta sea degradada.

Sin embargo, la operación con un TRH de apenas 36 minutos permite el tratamiento de 37 unidades de volumen por día de agua residual en un volumen unitario de

reactor, es decir, 92.0 L/d de agua residual en un equipo de 2.5 L de volumen. Aunque la eficiencia es baja, permanece en el agua residual una concentración apreciable de materia orgánica, como se muestra en la Tabla 6.2, lo que permitiría el uso del agua tratada para riego.

**Tabla 6.2.** Concentración de DQO remanente del tratamiento de aguas residuales en el RLFI, durante las diferentes etapas de operación.

| Día | TRH<br>(h) | Gasto<br>(L/d) | Eficiencia de Remoción<br>de DQO<br>(%) | Concentración de<br>DQO remanente<br>(kg/m <sup>3</sup> ) |
|-----|------------|----------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 17  | 2.0        | 32.0           | 60.0                                    | 84.3                                                      |
| 90  | 1.3        | 48.0           | 50.4                                    | 135.2                                                     |
| 155 | 0.6        | 92.0           | 44.0                                    | 163.1                                                     |
| 255 | 0.6        | 92.0           | 44.2                                    | 141.8                                                     |

Para el tratamiento anaerobio de las aguas residuales municipales se han utilizado diferentes prototipos entre los que se encuentra el reactor de película fija con empaque rotatorio. Las condiciones de operación fueron variadas (temperatura y velocidad del eje rotatorio) y el TRH fue de 6 h. La eficiencia de remoción obtenida a 29° C y con una carga orgánica volumétrica de 1.7 kg DQO/m<sup>3</sup>·d fue de alrededor del 65%, resaltando que a temperaturas menores a 16° C la transferencia masa-líquido es la etapa limitante (Noyola *et al.*, 1988).

El reactor de lecho de lodos granulares expandido (ESGB) reportado por de Man *et al.* (1988) fue operado a una temperatura de 12° a 20° C, con TRH de 2 a 3 h y una concentración de DQO de 150 a 600 mg/L. La eficiencia de remoción promedio fue

del 60%. Concluyeron que una de las ventajas de estos reactores es la expansión del lecho causado por las altas velocidades de circulación de líquido (6.5 m/h), que se traduce en altos volúmenes de recirculación los cuales permiten que las bajas concentraciones de sustratos alimentados permanezcan más tiempo en contacto con los lodos granulares. Sin embargo, los altos flujos provocan el fraccionamiento y la expulsión de los gránulos y la consecuente pérdida de sólidos.

El reactor de lecho fluidizado de flujo ascendente con soporte de arena y cuarzo empleado por Collivingnarelli *et al.* (1990), presentó varias dificultades en su operación, como alta retención de sólidos, grandes variaciones en la concentración de biomasa y valores mínimos en la expansión de lecho, del orden de 10 al 15%. Todo lo anterior fue reflejado en la eficiencia de remoción de la DQO que fue del 5%.

Los reactores anaerobios UASB han sido los más empleados para el tratamiento de aguas residuales municipales. Vieira (1988) utilizó reactores UASB de 160 L y 120 m<sup>3</sup> para el tratamiento de aguas residuales municipales con concentraciones variables de alrededor de 300 mg DQO/L, encontrando eficiencias de remoción de 65% en DQO y de 61% en sólidos suspendidos, así como la disminución de la carga de patógenos. El TRH mínimo utilizado fue de 1.6 h.

Una revisión realizada por Monroy *et al.* (1997), muestra que México cuenta con un total de 34 plantas tratadoras de estas aguas, en su mayoría de tipo UASB. Los TRH

a las que son operadas se encuentra entre 6 y 20.8 h. En 10 de ellas la eficiencia de remoción es de 50 a 55% y en las restantes entre el 75 y 80 %.

Aunque los reactores UASB, han dado buenos resultados, la magnitud de las descargas de las grandes ciudades conducen al desarrollo de otras alternativas tecnológicas con la capacidad de mejorar las condiciones sanitarias de las ciudades y dar al agua tratada el reuso necesario ya sea para riego o fines recreativos.

En este caso, el agua tratada obtenida con este prototipo, tiene una cierta concentración de materia orgánica disuelta que es útil en la irrigación de tierras de cultivo intensivo. Sin embargo, este tratamiento no remueve sólidos suspendidos y esto lleva a inferir que tampoco remueve patógenos ni parásitos, por lo que debe someterse a un postratamiento, ya sea por lagunas de oxidación, donde los patógenos serían removidos por la acción de la luz solar y los parásitos y sólidos suspendidos por sedimentación, con lo que el agua tendría una mejor calidad.

El problema que representa este tipo de postratamientos es la necesidad de grandes superficies disponibles por los caudales de agua que se manejarían. Otras alternativas más costosas serían la filtración seguida de desinfección por cloración o radiación con luz ultravioleta.

#### 6.4. Conclusiones

La principal ventaja que se tiene con este prototipo y debido a los cortos TRH con los fue operado, es que se pueden tratar grandes volúmenes de agua residual en equipos muy compactos, con eficiencias de remoción similares a las obtenidas con otros sistemas. La desventaja reside en la calidad del agua descargada, ya que el flujo descendente evita la acumulación de sólidos suspendidos en el interior del sistema, caso contrario a lo que ocurre en los reactores UASB en donde son acumulados sin tener ninguna función, ya que en su mayoría son inertes.

La falta de retención de sólidos suspendidos así como la falta de retención de patógenos y parásitos por este sistema es un inconveniente en cuanto a la calidad del agua descargada. Por lo que para considerar este efluente como agua de riego, debe considerarse su postratamiento, respecto al cual se discutieron brevemente las alternativas.

Se concluye que el RLFI puede ser considerado como una posible alternativa de tratamiento anaerobio de aguas residuales municipales. Sin embargo, este sistema debe estar acoplado a sistemas de postratamiento para obtener el agua con las características deseadas.

# 7

## Conclusiones generales y recomendaciones

Al final de cada uno de los Capítulos anteriores, se presentaron conclusiones acerca de aspectos puntuales de los resultados obtenidos. En esta sección se presentan las conclusiones principales derivadas del trabajo experimental y del análisis de los datos reportados.

Se presentan también algunas recomendaciones sobre los aspectos que requieren un estudio posterior más profundo, relacionados a este trabajo que pudieran derivar en un diseño mejorado del prototipo y en una calidad sanitaria apropiada para el agua descargada.



### 7.1. Conclusiones Generales

Se encontró que los tiempos de inmovilización de biomasa sobre la superficie de partículas plásticas coinciden con los reportados por otros autores para sistemas de inmovilización por lotes y continuos que indican que se requieren de 45 a 90 días para que estos sistemas alcancen una condición estable de remoción de carga orgánica y biopelículas completamente formadas.

La predominancia de bacterias bacilares tipo *Methanosaeta* en los lotes de biopartículas obtenidos cuya fuente de carbono durante la inmovilización fue acetato, se explicó como debida a la capacidad de este microorganismo para colonizar el soporte debido a su estructura filamentosa y a la baja carga orgánica con la que los reactores fueron alimentados, las cuales permiten que este microorganismo predomine.

La inmovilización con un sustrato como la glucosa de mayor rendimiento energético, que el acetato, ya sea en mesofilia o termofilia, da como resultado mayor concentración de biomasa. Por otra parte con un sustrato de bajo rendimiento energético la inmovilización en cualquiera de estas condiciones, da como resultado una biopelícula con baja concentración de biomasa. En ambos casos el proceso controlante es la dispersión de células y la formación de matrices exopoliméricas sobre la superficie plástica. Esta adhesión se realiza dentro de cavidades de la superficie del soporte, lo cual fue demostrado por medio de secuencias temporales

de fotografías de MEB. Dichas cavidades permiten que las células permanezcan el tiempo suficiente para la colonización del soporte, ya que provee protección contra los esfuerzos cortantes entre el líquido y las partículas debidos al mezclado propio de los sistemas fluidificados.

En este sentido, la selección del soporte en cuanto a tamaño, rugosidad o porosidad y densidad es central para obtener una operación ventajosa en este tipo de biorreactores.

Un procedimiento de inmovilización, donde la biopelícula es fijada en condiciones mesofílicas para posteriormente llevarla mediante un proceso de aclimatación a condiciones termofílicas, conduce a la síntesis de material orgánico y un aumento en biomasa. En este caso, puede verse que la biopelícula funciona efectivamente como matriz acarreadora de microorganismos y es estable al cambio de temperatura, sugiriendo una metodología para la retención de biomasa en sistemas en adaptación a termofilia.

La falta de fijación de biomasa en condiciones termofílicas se explica a partir de la pérdida de granulación del lodo utilizado como inóculo. En este caso es posible que la matriz de inmovilización sea un sistema más sensible a efectos cortantes producidos por las corrientes de la fase líquida, aunque también es probable que los microorganismos que permanecieron en el inóculo adaptado, no produzcan grandes cantidades de sustancias exopoliméricas y de ahí la baja concentración de la biomasa inmovilizada. Esto sugiere que el paso previo de inmovilización en mesofilia

conlleve mejores condiciones de estabilización de biopelículas adaptadas a termofilia.

Durante la operación en continuo de este prototipo, se observó que existe una relación estrecha entre la capacidad de expansión máxima tolerable en este sistema con respecto a la relación  $H_0/D_R$ , ya que cuando la relación era mayor, la expansión total se alcanzaba con cargas muy bajas ( $3 \text{ kg/m}^3\cdot\text{d}$  en el Reactor 1). En este fenómeno debe considerarse la expansión y la agitación producida por la formación de biogás y su tendencia a subir a la parte alta del reactor, la cual se ve contrarrestada por el flujo descendente que lo mantiene atrapado en la zona del lecho.

Aún con estas limitantes, ambos reactores mostraron altos niveles de conversión y la capacidad de alcalinizar el sistema, lo que implica la posibilidad de aumentar las cargas orgánicas arriba de  $16 \text{ kg/m}^3\cdot\text{d}$ , que fue la máxima alcanzada con alimentación sintética, con la que se alcanzaron cargas máxicas hasta de  $5.1 \text{ kg DQO/kg SVI}\cdot\text{d}$ , con una concentración de DQO en el influente de  $2000 \text{ mg/L}$  y un TRH de 3 h. Dichas cargas máxicas son superiores a las típicas utilizadas en reactores anaerobios.

Los problemas de expansión no fueron tan graves cuando el prototipo se utilizó para el tratamiento de aguas residuales municipales que contenían una baja concentración de materia orgánica. En este caso se alcanzaron cargas máxicas superiores a las de corridas experimentales anteriores ( $11 \text{ kg DQO/kg SVI}\cdot\text{d}$ ), por

medio de la disminución del TRH a valores menores a 1 hora. Debido a esto, la eficiencia de remoción alcanzada fue de 44% y la actividad específica de las partículas fue baja, ya que probablemente no se prolongaba suficientemente el tiempo de contacto entre la biopelícula y la materia orgánica disuelta.

El uso de este prototipo para el tratamiento de aguas residuales municipales es ventajoso, ya que se tratan grandes volúmenes de agua en equipos muy compactos con tiempos de residencia del orden del 25% de los comunmente usados en reactores con biomasa suspendida que predominan en México, como los UASB.

## 7.2. Recomendaciones

Es necesario recordar que el lecho fluidificado inverso no tiene la capacidad de retener sólidos suspendidos, parásitos o patógenos, por lo que debe considerarse para esta opción de tratamiento de aguas con alta o baja carga orgánica, pre y postratamiento que constituyan un sistema que resulte en una descarga apropiada.

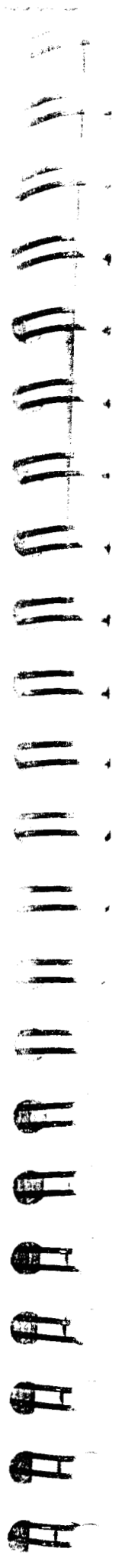
Son necesarios estudios donde se distinga entre la contribución de la cantidad de biomasa inmovilizada y la contribución del régimen de mezclado en este prototipo, que hacen posible que el sistema sea capaz de tolerar cargas másicas mucho mayores a las reportadas para reactores anaerobios.

Igualmente, es necesario conocer la magnitud de la fracción de gas retenida en el interior del reactor por medio de estudios hidrodinámicos, para encontrar la forma de

corregir los problemas de sobreexpansión y poder operar los reactores con cargas más altas o para determinar los límites de aplicación de este sistema. De este modo también se recuperaría el biogás perdido en el efluente, el cual es una fuente de energía.

Se requiere el diseño de un soporte con las mismas características del polietileno utilizado en este trabajo, con una geometría que facilite los procesos hidrodinámicos y con mejores características de inmovilización.

Se sugiere para estudios posteriores, el desarrollo de metodologías de control ante perturbaciones inesperadas en la alimentación de estos reactores, para lo cual son necesarios experimentos dinámicos para identificar el comportamiento del biorreactor. Este es un problema de estrategias de control de la digestión anaerobia similar al trabajo de Monroy (1998).



## REFERENCIAS

- Ahring, B. y Westermann, P. (1984) Isolation and characterization of a thermophilic, acetate-utilizing methanogenic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 47-52.
- APHA-AWWA-WPCF (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. A.D Eaton, L.S. Clesceri y A.R. Greenberg (eds.) Ed. United Book Press, 19ª ed. USA.
- Balaguer, M.D., Vincent, M.T. y Paris, J.M. (1992) Anaerobic fluidized bed reactor with sepiolite as support for anaerobic treatment of vinasse. *Biotech. Lett.* **14** (5): 433-438.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. y Wolfe, R.S. (1979) Methanogens: Reevaluation of a unique group. *Microbiological Rev.*, **43** (2): 260-296.
- Barbosa, R. y Sant'Anna Jr., G. (1989) Treatment of raw domestic sewage in a UASB reactor. *Wat. Res.* **23**(12): 1483-1490.
- Boone, D.R. (1991) Strain GP6 is proposed as the neotype strain of *Methanothrix soehngenii*<sup>vp</sup> pro synonym. *Methanothrix concillii*<sup>vp</sup> and *Methanosaeta concillii*<sup>vp</sup>. *Int. J. Sys. Bact.* **41** (4): 588-589.
- Borja, R. y Banks, C.J. (1995) Response of an anaerobic fluidized bed reactor treating ice-cream wastewater to organic, hydraulic, temperature and pH shocks. *J. Biotech.* **39**: 251-259.
- Bryant, M., Wolin, E., Wolin, M. y Wolfe, R. (1967) *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.* **59**: 20-31.
- Chen, S. J., Li, C. T. y Shieh, W. K. (1988) Anaerobic fluidized bed treatment of an industrial wastewater. *JWPCF* **60** (10): 1826-1832.
- Collivignarelli, C., Urbini, C., Farneti, A., Bassetti, A. y Barbaresi, U. (1990). Anaerobic-aerobic treatment of municipal wastewaters with full-scale upflow anaerobic sludge blanket and attached biofilm reactors. *Wat. Sci. Tech.* **22** (1/2): 475-482.
- Cord-Rudwisch, R., Seitz, H-J. y Conrad, R. (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **149**: 350-357.

- Costerton, J.W., Irvin, R.T. y Cheng, K.-J. (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.
- de Man, A., van der Last, A. y Lettinga, G. (1988) The use of EGSB and anaerobic systems for low strength soluble and complex wastewaters at temperatures ranging from 8° to 30° C. *Proceedings of the 5th International Conference on Anaerobic Digestion*, pp. 197-209.
- Dolfing, J., Griffioen, A., Neerven, A.R.W. y van Zevenhuizen, L. (1985) Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.* **31**: 744-750.
- Dubois, M., Gilles, K.A. y Hamilton, J.K. (1956) Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Ehlinger, F., Audic, J.M. y Faup, G.M. (1987) Relationship between the concentration of acetate in the feed and the composition of a biofilm in an anaerobic reactor. *Env. Tech. Lett.* **8**: 197-207.
- Ehlinger, F. (1994) Anaerobic biological fluidized beds: operating experiences in France. *Proc. 7th Int. Symposium on Anaerobic Digestion*, pp. 315-323.
- Fajardo, C. "Producción de inóculos para reactores anaerobios". Tesis de Maestría en Biotecnología, DCBS, UAM-Iztapalapa, 1997.
- Fan, L-S., Muroyama, K. y Chern, S-H. (1982) Hydrodynamic characteristics of inverse fluidization in liquid-solid and gas-liquid-solid systems. *The Chem. Eng. J.* **24**: 143-150.
- Ferry, J.G. (1993) Fermentation of acetate en *Methanogens. Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Parte II, Cap. 6 J.G. Ferry (ed.) Ed. Chapman & Hall, NY, USA.
- Garcia, J.L. (1990) Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 297-308.
- García-Calderón, D., Buffière, P., Moletta, R. y Elmaleh, S. (1997) Influence of biomass accumulation on bed expansion characteristics of a down-flow anaerobic fluidized-bed reactor. *Biotech. Bioeng.* **57**(2): 136-144.
- González, G., Ramírez, F. y Monroy, O. (1992) Development of biofilms in anaerobic reactor. *Biotech. Letters*, **14** (2): 149-154.

- Gorris, L.G.M., Van Deursen, J.M.A., van der Drift, C. y Vogels, G.D. (1989) Biofilm development in laboratory methanogenic fluidized bed reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 687-693.
- Ghosh, S., Ombregt, J.P. y Pypin, P. (1985) Methane production from industrial wastes by two-phase anaerobic digestion. *Wat. Res.* **19** (9): 1083-1088.
- Grotenhuis, J.T.C., Smit, M., van Lammeren, A.A.M., Stams, A.J.M. y Zehnder, A.J.B. (1991) Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotech.* **36**: 115-119.
- Guiot, S.R., Lavoie, L., Rocheleau, S., MacLeod, F.A. y Costerton, J.W. (1991) Extracellular polymeric substances in anaerobic granules. *6th Int. Symposium on Anaerobic Digestion*, pp. 31-35.
- Guiot, S. (1992) Bioimmobilization in anaerobic reactors. *Bioprocesos Anaerobios para el Tratamiento de Efluentes Industriales*. UAM/ORSTOM/IMP, México.
- Guiot, S. Comunicación personal a M.C. Meraz. Instituto de Investigación en Biotecnología, Consejo Nacional de Investigación, Montreal, Canadá, Mayo (1993).
- Guyot, J. P., Noyola, A. y Monroy, O. (1990) Evolution of microbial activities and population in granular sludge from an UASB reactor. *Biotechnol. Lett.* **12**: 155-160.
- Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W. y Hoeks, F. (1989) Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in waste-water treatment. *The Chem. Eng. J.* **41**: B37-B50.
- Henze, M. y Harremoës, P. (1983) Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors- A literature review. *Wat. Sci. Tech.* **15**: 1-101.
- Holst, T.C., Truc, A. y Pujol, R. (1997) Anaerobic fluidized beds: ten years of industrial experience. *Proc. 8th Int. Conf. Anaerobic Digestion*, **2**: 142-149.
- Horan, N.J. y Eccles, C.R. (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Wat. Res.* **20**: 1427-1432.
- Howgrave-Graham, A.R., Wallis, F.M. y Steyn, P.L. (1991) A bacterial population analysis of granular sludge from an anaerobic digester treating a maize-processing waste. *Bioresource Tech.* **37**: 149-156.

- Hungate, R. E. (1969) A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes en *Methods in Microbiology*. J. R. Norris y D.W. Robbons (eds.) Academic Press Inc. N.Y. USA. pp, 117-132.
- Jeris, J.S, y McCarty, P.L. (1965) The biochemistry of methane formation using  $^{14}\text{C}$  tracers. *JWPCF* **37**: 178-192.
- Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M. y Zehnder, A.J.B. (1992) Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Rev.* **88**: 181-198.
- Jones, W.J., Nagle, D.P. y Whitman, W.B. (1987) Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev.* **51**: 135-177.
- Kamagata, Y. y Mikami, E. (1990) Some characteristics of two morphotypes of *Methanotherix soehngenii* from mesophilic anaerobic digester. *J. Ferm. Bioeng.* **70**: 272-274.
- Kamagata, Y. y Mikami, E. (1991) Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanosaeta* strain. *Int. J. of Sys. Bacteriol.* **41** (2): 191-196.
- Karamanev, D.G. y Nikolov, L.N. (1992) Bed expansion of liquid-solid inverse fluidization. *AIChE J.* **38** (12): 1916-1922.
- Karamanev, D.G. y Nikolov, L.N. (1996) Application of inverse fluidization in wastewater treatment: from laboratory to full-scale bioreactors. *Environ. Progress* **15** (3): 194-196.
- Kitsos, H., Roberts, R., Jones, W. y Tornabee, T.G. (1992) An experimental study of mass diffusion and reaction rate in an anaerobic biofilm. *Biotech. Bioeng.* **39**: 1141-1146.
- König, H. y Stetter, K.O. (1989) Archaeobacteria en *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* Secc. 25., **3**: 2171-2189. J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig (eds.) Ed. Williams & Wilkins, USA.
- Krishnaia, K., Guru, S. y Sekar, V. (1993) Hydrodynamic studies on inverse gas-liquid-solid fluidization. *The Chem. Eng. J.* **51**: 109-112.
- Kuba, T.; Furumai, H. y Kusuda, T. (1990). A kinetic study on methanogenesis by attached biomass in a fluidized bed. *Wat. Res.* **24** (11): 1365-1372.

- Kunii, D. y Levenspiel, O. (1991) Fluidization Engineering. Series in Chemical Engineering. 2<sup>a</sup> ed. Ed. Butterworth-Heinemann, USA.
- Lee, M. y Zinder, S. (1988) Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (6):1457-1461.
- Lowe, S.E., Mahendra, K.J. y Zeikus, G. (1993) Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiol. Rev.* **57** (2): 451-509.
- Meier-Schneiders, M., Busch, C. y Diekert, G. (1993) The attachment of bacterial cells to surfaces under anaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 667-673.
- Mendoza, S. y García, D. "Estudio del arranque de reactores UASB alimentados con varias clases de efluentes e inoculados con lodos activados adaptados a estiércol de vaca". Tesis de Licenciatura, ENEP-Iztacala, UNAM, 1990.
- Min, H. y Zinder, S. (1989) Kinetics of acetate utilization by two thermophilic acetotrophic methanogens: *Methanosarcina* sp. strain CALS-1 and *Methanothrix* sp. strain CALS-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (2): 488-491.
- Monroy, O. "Modelamiento y control de un sistema de digestión anaerobia en dos etapas". Tesis Doctoral, Fac. de Química, UNAM, 1998.
- Monroy, O., Meraz, M., Montoya, L., Famá, G. y Macarie, H. (1997) Anaerobic digestion in Mexico: State of the technology, limitations and potential for its development. *Proc. 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, **2**: 272-284.
- Morgan, J.W., Foster, C.F. y Evison, L. (1990) A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludge. *Wat. Res.* **6**: 743-750.
- Müller, V., Blant, M. y Gottschalk, G. (1993) Bioenergetics of Methanogens en *Methanogens. Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Parte III, Cap. 8. James G. Ferry (ed.) Ed. Chapman & Hall, NY, USA.
- Muroyama, K. y Fan, L. S. (1985) Fundamentals of gas-liquid-solid fluidization. *AIChE J.* **31**: 1-34.
- Nikolov, L. y Karamanev, D. (1987) Experimental study of the inverse fluidized bed biofilm reactor. *The Canadian J. Chem. Eng.* **65**: 214-217.

- Noyola, A., Capdeville, B y Roques, H. (1988) Anaerobic treatment of domestic sewage with a rotating-stationary fixed-film reactor. *Wat. Res.* **22** (12): 1585-1592.
- Noyola, A. (1994) Diseño, inoculación y arranque de reactores UASB en *Memorias del III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales"*. M. Viñas, L. Borzacconi, M. Soubes y L. Muxi (eds.) Montevideo, Uruguay, pp. 133-143.
- Nozhevnikova, A.N. y Yagodina, T.G. (1983) A thermophilic acetate methane-producing bacterium. *Microbiol.* **51**: 534-541.
- Nozhevnikova, A.N. y Chudina, V.I. (1985) Morphology of the thermophilic acetate methane bacterium *Methanothrix thermoacetophila* sp. nov. *Microbiology* **53**: 618-624.
- Patel, G.B. y Sprott G.D. (1990) *Methanosaeta concilli* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilli") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *Int. J. Sys. Bact.* **40** (1): 78-92.
- Pavlostathis, S. G. y Giraldo-Gómez, E. (1991) Kinetics of anaerobic treatment en *Anaerobic Treatment Technology for Municipal and Industrial Wastewater*. M.S. Switzenbaum (ed.) International Association on Water Pollution Research and Control. Pergamon Press, Inc. GB, pp. 35-60.
- Prensier, G., Roustan, J.L., Dubourguier, H.C. y Albagnac, G. (1987) Presence of viruses and other potential bacterial predators in granular methanogenic sludge en *Granular Anaerobic Sludge; microbiology and technology. Gas-mat Workshop, Lunteren, The Netherlands*. G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grothenuis y L.N. Hulshoff (eds.) Ed. Pudoc Wageningen, pp. 25-27.
- Ramírez, F., Meraz, M., Fajardo, C. y Monroy, O. (1994) Técnica para la determinación de actividad metanogénica en lodos anaerobios. *Memorias del III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales"*. M. Viñas, L. Borzacconi, M. Soubes y L. Muxi (eds.) Montevideo, Uruguay, pp. 443-446.
- Rintala, J., Lepistö, S. y Ahring, B. (1993) Acetate degradation at 70° C in Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactors and temperature response of granules grown at 70° C. *Appl. Env. Microbiol.* **59** (6): 1742-1746.

- Robinson, R.W., Akin, D.E., Nordstedt, R.A., Thomas, M.V. y Aldrich, H.C. (1984) Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **48** (1): 127-136.
- Sánchez, J.M., Arijó, S., Muñoz, M.A., Moriñigo, M.A. y Borrego, J.J. (1994) Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 480-486.
- Sato, T. y Ose, Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solutions. *Wat. Res.* **14**: 333-338.
- Schmidt, J.E. y Ahring, B.K. (1994) Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 457-462.
- Sedmark, J.J. y Grossberg, S.E. (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* **79**: 544-552.
- Segel, I. H. (1982) *Enzimas en Cálculos de Bioquímica*, Cap. 4, Seccs. B, C y D. Ed. Acribia. 2ª ed., Zaragoza, España.
- Seris, J.S. (1983) Industrial wastewater treatment using anaerobic fluidized bed reactors. *Wat. Sci. Tech.* **15**: 169-176.
- Setiadi, T. (1995) Predicting the bed expansion of an anaerobic fluidized bed bioreactor. *Wat. Sci. Tech.* (9): 181-191.
- Shapiro, M. y Switzenbaum, M.S. (1984) Initial anaerobic biofilm development. *Biotech. Lett.* **6** (11): 729-734.
- Shen, C.F., Kosaric, N. y Blaszczyk, R. (1993) The effect of selected heavy metals (Ni, Co and Fe) on anaerobic granules and their extracellular polymeric substance (EPS). *Wat. Res.* **27**: 25-33.
- Smith, P.H. y Mah, R.A. (1966) Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.* **14**: 368-371.
- Smith, P.H. y Mah, R.A. (1980) Acetate as sole carbon and energy source for growth of *Methanosarcina* strain 277. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 993-999.
- Speece, R.E. (1996) *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. R.E. Speece (ed.), Ed. Archae Press, TN, USA.

- Stephenson, T. y Lester, J.N. (1986) Evaluation of start-up and operation of four anaerobic processes treating a synthetic meat waste. *Biotech. Bioeng.* **28**: 372-378.
- Stronach, M.S., Díaz-Báez, M.C., Thomasine, R. y Lester, N.J. (1987) Factors affecting biomass attachment during start-up and operation of anaerobic fluidized beds. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 611-620.
- Sundaram, T.K. (1986) Physiology and growth of thermophilic bacteria en *Thermophiles: General Molecular and Applied Microbiology*. T.D. Brock (ed.) Ed. Chapman and Hall, NY, USA, pp. 129-206.
- Sutton, P.M. y Mishra, P.N. (1991) Biological fluidized beds for water and wastewater treatment: a state-of-the-art review. *Environ. Tech.*, **3** (8): 52-56.
- Touzel, J.P.; Petroff, D. y Albagnac, G. (1985) Isolation and characterization of a new thermophilic *Methanosarcina*, the strain CHTI 55. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 66-71.
- Uemura, S. y Harada, H. (1993) Microbial characteristics of methanogenic sludge consortia developed in thermophilic UASB reactors. *Appl. Microb. Biotech.* **39**: 654-660.
- Urbain, V., Block, J.C. y Manem, J. (1993) Bioflocculation in activated sludge: an analytical approach. *Wat. Res.* **27** (5): 829-838.
- van Lier, J.B., Grolle, K.C.F., Stams, A.J.M., de Macario, E.C. y Lettinga, G. (1992) Start up of a thermophilic UASB reactor with mesophilic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotech.* **37**: 130-135.
- van Lier, J.B., Hulsbeek, J., Stams, A.J.M. y Lettinga, G. (1993) Temperature susceptibility of thermophilic methanogenic sludge: implications for reactor start-up and operation. *Bioresources Tech.* **43**: 227-235.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. y Zehnder, A.J.B. (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54** (1): 75-87.
- Vazoller, R. Comunicación personal a Dr. Monroy y M.C. Meraz. Escuela de Ingeniería de São Carlos-Universidad de São Paulo. São Paulo, Brasil (1994).
- Verrier, D., Mortier, B., Dubourguier, H.C. y Albagnac, W. (1988) Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilm en *Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion*.

E.R. Hall y P.N. Hobson (eds.) Bologna, Italia. Ed. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 61-69.

Vieira, S. (1988) Anaerobic treatment of domestic sewage in Brazil-research results and full-scale experience en *Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion*. E.R. Hall y P.N. Hobson (eds.) Bologna, Italia. Ed. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 185-196.

Viñas, M. (1994) Criterios de diseño y escalado de reactores anaerobios. *Memorias del III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales"*. M. Viñas, L. Borzacconi, M. Soubes y L. Muxi (eds.) Montevideo, Uruguay, pp. 111-123.

Vogels, G.D., Keltjens, J.T. y van der Drift, C. (1988) Biochemistry of methane production en *Biology of anaerobic microorganisms*. Cap. 13. A.J.B. Zehnder (ed.) 1ª ed. Ed. John Wiley & Sons. USA.

Wayne, L.G. (1994) Actions of the judicial commission of the International Committee on Systematic Bacteriology on requests for opinions published between January 1985 and July 1993. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **44** (1): 177-178.

Yu, H. y Rittmann, B. E. (1997) Predicting bed expansion and phase holdups for three-phase fluidized-bed reactors with and without biofilm. *Wat. Res.* **31** (10): 2604-2616.

Zeikus, J.G. (1979) Thermophilic bacteria: ecology, physiology, and technology. *Enzyme Microb. Technol.* **1**: 243-252.

Zellner, G., Diekman, H., Austermann-Haun, U. y Seyfried, C.F. (1994) Scanning electron microscopy of biofilm development in anaerobic fixed-bed reactors: influence of the inoculum. *Biotech. Letters.* **16** (3): 315-320.

Zinder, S. y Mah, R. (1979) Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use  $H_2$ - $CO_2$  for methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **38** (5): 996-1008.

Zinder, S.H. y Koch, M. (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* **138**: 263-272.

Zinder, S., Sowers, K. y Ferry, J. (1985) *Methanosarcina thermophila* sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane -producing bacteria. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **35** (4): 522-523.

- Zinder, H.S., Anguish, T. y Lobo, A.L. (1987) Isolation and characterization of a thermophilic acetotrophic strain of *Methanotherix*. *Arch. Microbiol.* **146**: 315-322.
- Zinder, H.S. (1990) Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**: 125-138.
- Zinder, S.H. (1993) Physiological ecology of methanogens en *Methanogens. Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Parte I, Cap. 3. J.G. Ferry (ed.) Ed. Chapman & Hall, NY, USA.