

CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE GRANULOS ANAEROBIOS  
DE REACTORES UASB INDUSTRIALES OPERADOS EN MESOFILIA



TESIS

Presentada en la Universidad Autónoma Metropolitana

para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

por

GRACIELA FAMÁ BOTTINI

Presentada el 28 de enero de 1998 ante el Jurado  
integrado por:

Dr. Jorge Gómez Hernández (UAM-I)  
Dr. Hervé Macarie (ORSTOM)  
Dr. Adalberto Noyola Robles (UNAM)  
Dr. Héctor Poggi Varaldo (CINVESTAV)  
Dr. Oscar Monroy Hermosillo (UAM-I)

Presidente  
Secretario  
Vocal  
Vocal  
Vocal

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISION CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

---

**CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE GRANULOS ANAEROBIOS  
DE REACTORES UASB INDUSTRIALES OPERADOS EN MESOFILIA**



**TESIS**

Presentada en la Universidad Autónoma Metropolitana

para obtener el grado de:

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

por

**GRACIELA FAMÁ**

ENERO DE 1998

“Las cosas se muestran solas,  
sólo hay que saber mirar”  
Piero

Dedico esta tesis a:



# CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE GRANULOS ANAEROBIOS DE REACTORES UASB OPERADOS EN MESOFILIA

## INDICE

CONTENIDO	i
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
RESUME	viii
NOTACIÓN EMPLEADA	x
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1: ESTUDIO BIBLIOGRAFICO</b>	
1.1. ¿Qué es un gránulo anaerobio?	4
1.2. Características físicas de los gránulos	
1.2.1 Forma	4
1.2.2 Tamaño	6
1.2.3 Densidad y características de sedimentación	8
1.2.4 Resistencia mecánica	11
1.2.5 Porosidad	13
1.3. Conservación de los gránulos	15
1.4. Composición inorgánica y orgánica de los gránulos	
1.4.1 Composición elemental y ubicación de los minerales	16
1.4.2 Composición química de los polímeros extracelulares	18
1.5. Composición microbiana	19
1.6. Formación de los gránulos	24
1.7. Organización microbiana dentro del gránulo	25
1.8. Justificación, Hipótesis y Objetivos	33
Bibliografía	34
<b>Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.2.1. Métodos Analíticos	44
2.1.1 Medición de proteínas totales	44
2.1.2 Medición de nitrógeno amoniacal	45
2.1.3. Medición de azúcares totales	46

2.1.4 Medición de ácidos grasos volátiles	48
2.1.5 Determinación de DQO	49
2.1.6 Determinación de grasas y aceites	50
2.1.7 Determinación de metales totales	51
2.2 Determinación de las propiedades físicas y granulométricas de los lodos	
2.2.1 SST y SSV	52
2.2.2 IVL	53
2.2.3 Granulometría	53
2.3 Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	
2.3.1 Generalidades sobre MEB y la preparación de muestras	54
2.3.2 Metodología de preparación para MEB de los lodos estudiados	58
2.4 Origen de las muestras estudiadas	
2.4.1 Descripción de las plantas de tratamiento de aguas residuales	59
2.4.1.1 Imexa	59
2.4.1.2 Central de Malta	59
2.4.1.3 El Sauz	65
2.4.1.4 La Caperucita	68
2.4.1.5 UAM-I	70
2.4.2 Condiciones de operación de los reactores estudiados	71
Bibliografía	76
<b>Capítulo 3: Resultados y Discusión</b>	
3.1 Características físico-químicas de los influentes analizados	79
3.2 Propiedades físicas y granulométricas de los lodos	
3.2.1 Caracterización física	84
3.2.2 Granulometría	85
3.3 Observaciones con MEB	
3.3.1. Comparación de los diferentes tratamientos	88
3.3.2. Observaciones de los lodos estudiados	93
3.3.3. Síntesis de las observaciones realizadas	110
3.4 Discusión general	114
3.5 Conclusión	117
Bibliografía	118

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), bajo la dirección del Dr Hervé Macarie investigador del “Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération” (ORSTOM), Francia y del Dr. Jorge Gómez Hernández, Profesor de la UAM-I

Este trabajo de investigación fue realizado con una beca otorgada por el Gobierno de México a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores y con un apoyo parcial de ORSTOM.

Deseo expresar mi agradecimiento a los Dres. J. Gómez y H. Macarie por haber dirigido esta tesis. Agradezco también al Dr O. Monroy por haberme brindado la oportunidad de venir a México y a todos los integrantes de su equipo por permitirme trabajar en este laboratorio. A los Dres. Adalberto Noyola y Héctor Poggi Varaldo mi agradecimiento por la corrección de esta Tesis.

Agradezco a todos los empresarios y personal técnico de las diferentes empresas (Ing. Gerardo González, Omar Reyes y Paulino Rivas, de La Caperucita; Ing. Jorge Santos Pacheco de El Sauz; Ing. Pedro Lara Vasconcelos y José L. Alvarez Trejo, de Imexa; Ing. Luis J. Alvarado Kirwan y Adolfo Pérez Anguiano, de Central de Malta) por haber facilitado la obtención de las muestras y por brindar toda la información requerida.

Un particular agradecimiento al personal de los Centros de Microscopía Electrónica de la UAM-I (Ing. Jesús Arenas, Ing. Patricia Castillo y Dr. José Sepúlveda) y de la UNAM (Ing. Jorge Sepúlveda), por su colaboración en el manejo del MEB. Agradezco también a los fotógrafos de la UAM-I (Raúl Ramos Silva y Jorge Lodigiani) por haber realizado diapositivas y copias fotográficas para esta tesis.



## RESUMEN

En reactores del tipo UASB, la acumulación de biomasa se produce por la formación de gránulos cuya composición es esencialmente orgánica, correspondiendo ésta a los microorganismos y a los polímeros extracelulares que les sirven de cemento. Si bien se ha realizado un considerable esfuerzo por comprender la organización del gránulo, ésta aún no se conoce bien. Se han realizado numerosos estudios de gránulos anaerobios empleando técnicas diversas, pero es muy limitado el número de reportes centrados en el aspecto ultraestructural. Además se han propuesto modelos de estructura definida de los gránulos relacionada con la composición del sustrato (Guiot y col., 1992, Fang, 1997). Se sostiene que los gránulos alimentados con sustratos ricos en carbohidratos (sacarosa) presentan tres capas, con las bacterias fermentativas en la capa externa, las acetogénicas e hidrogenofílicas en la intermedia, y las metanogénicas acetoclásticas en el centro del gránulo (Guiot y col., 1992, Fang, 1997), mientras que los gránulos alimentados con sustratos cuya etapa inicial de degradación es lenta (acetogénesis del propionato, hidrólisis de las proteínas, acidogénesis del glutamato) presentan una distribución uniforme de los microorganismos en todo el gránulo (Fang, 1997).

Puesto que todos esos experimentos han sido realizados con influentes sintéticos conteniendo una sola fuente de carbono y energía, en este trabajo nos propusimos analizar cómo es la distribución de los microorganismos en el gránulo cuando éstos son alimentados con una mezcla de sustratos orgánicos, como lo son las aguas residuales industriales.

Para ello se realizó, con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), un estudio comparativo de gránulos anaerobios de cinco reactores UASB industriales que operan con influentes de composición química compleja (aguas residuales urbanas: UAM-I, del proceso de levaduras: Imexa, malta: Central de Malta y lácteos: La Caperucita y El Sauz) y presentan diferentes diseños de construcción. Se determinó la composición química de cada agua residual (concentraciones de azúcares, proteínas, grasas y aceites, ácidos grasos volátiles, iones y metales), las características físicas de los lodos (SSV, SST, granulometría, IVL, Vmax) y se observaron con MEB gránulos enteros y criofracturados con nitrógeno líquido.



All the wastewaters studied contained a very low concentration of sugars and three of them a high concentration of protein (Imexa, Central de Malta and UAM-I). Volatile fatty acids represented a significant amount of the COD (40%) only in the case of Central de Malta. The wastewaters contained also a low amount of suspended solids with respect to COD, except in the case of El Sauz and UAM-I. Due to their composition, all these wastewaters can present a hydrolytic/fermentative rate-limiting step during their anaerobic degradation.

The observations with SEM showed that for two of the sludges studied (Central de Malta, El Sauz) the biogranules presented a layered microstructure with a core almost exclusively composed of bamboo-shaped bacteria similar to *Methanosaeta*. Caperucita's granules showed a uniform microstructure and those of UAM-I an inorganic core. In the case of Imexa's sludge, both layered and uniform granules were found.

Based on the model developed by Fang (1997) and the fact that the anaerobic degradation of the five wastewaters could present a hydrolytic-fermentative rate limiting step, all the granules should have presented an homogenous distribution of the microorganism. On the contrary, in all cases, except La Caperucita, a stratified distribution of the microorganism has been observed. As a consequence, it seems that the distribution of the microorganisms in the granules is not only due to the substrate chemical nature but that other factors such as loading rate, compounds concentration, temperature among others may be also important.

## CARACTERISATION ULTRASTRUCTURALE DE GRANULES ANAEROBIES PROVENANT DE REACTEURS UASB INDUSTRIELS OPERES EN MESOPHILIE

### Résumé

Dans les réacteurs de type UASB, l'accumulation de biomasse se produit grâce à la formation de granules dont la composition est essentiellement organique puisqu'il s'agit d'un agglomérat de bactéries cimenté par des polymères exocellulaires. Bien qu'un grand effort de recherche ait été réalisé afin de comprendre les facteurs qui gouvernent la formation des granules, cette dernière est encore mal comprise. Le nombre d'étude portant sur leur ultrastructure est de plus limité. A l'heure actuelle, deux modèles visant à expliquer l'organisation bactérienne dans les granules ont toutefois été élaborés (Guiot et al., 1992; Fang, 1997). Ces modèles indiquent que les granules alimentés avec des substrats facilement fermentescibles comme les sucres vont présenter une structure en couche, chaque couche étant colonisée par une population spécifique (par exemple, dans le cas du saccharose, les bactéries fermentaires sont localisées à la surface des granules, les méthanogènes acétoclastes de type *Methanosaeta* au centre et les bactéries acétogènes et les méthanogènes hydrogénotrophes entre les deux), alors que les granules cultivés sur des substrats présentant une étape d'hydrolyse ou de fermentation limitante (acétogénèse du propionate, hydrolyse des protéines, fermentation du glutamate...) auront une structure homogène, tous les micro-organismes étant répartis au hasard.

Etant donné que les modèles précédant résultent d'expériences réalisées avec des effluents synthétiques contenant une seule source de carbone et d'énergie, dans ce travail nous nous sommes proposés de déterminer qu'elle serait l'organisation bactérienne dans des granules alimentés avec un mélange de substrats organiques comme le sont les eaux usées industrielles et urbaines.

Pour cela, la structure des granules de cinq digesteurs UASB de taille industrielle traitant des effluents de composition chimique complexe (eau usée urbaine: UAM-I, effluents de levurerie: Imexa, malterie: Central de malta et fromagerie: El Sauz et La Caperucita) a été observée au microscope électronique à balayage. La composition chimique des différentes eaux usées (concentration en sucres, protéines, graisses, acides gras volatils, métaux, ions) ainsi que les caractéristiques physiques (MES, MVES, granulométrie, Indice volumique et vitesse de sédimentation) de toutes les boues ont été également déterminés. Les observations au microscope électronique quant à elles, ont été réalisées sur les granules entiers, mais aussi après cryofracture de manière à pouvoir avoir accès à leur partie interne.

Tous les effluents analysés ont présenté de faibles concentrations en sucre. Trois d'entre eux ont par contre présenté une forte proportion de protéines (Imexa, Central de Malta, UAM-I). Le contenu en acide gras volatil s'est avéré important seulement dans le cas de Central de Malta où ces derniers représentaient 40% de la DCO. Alors qu'avec un rapport MES/DCO de l'ordre de 1, les eaux d'Imexa, Central de Malta et La Caperucita étaient essentiellement solubles, celles de la UAM-I et de la Caperucita présentaient un fort caractère particulaire.

Les observations au microscope électronique ont montré que les granules de deux des boues étudiées (Central de Malta et El Sauz) présentaient une distribution en couche avec un centre uniquement colonisé par des bactéries similaires à *Methanosaeta*. Les granules de la Caperucita présentaient quant à eux une structure homogène et ceux de la UAM-I un centre inorganique. Enfin, les boues d'Imexa contenaient aussi bien des granules à structure en couche qu'homogène.

L'étape d'hydrolyse/fermentation pouvant être l'étape limitante lors de la fermentation méthanique des cinq eaux usées étudiées, les granules auraient du, selon le modèle de Fang (1997), présenter une distribution homogène des microorganismes. A l'opposé, dans tous les cas moins La Caperucita, une distribution stratifiée des microorganismes a été observée. Ceci semble indiquer que la distribution des micro-organismes dans les digesteurs n'est pas seulement due à la nature chimique du substrat, mais qu'elle dépend également d'autres facteurs tels que, entre autres, la charge organique appliquée, la concentration des composés organique présents dans l'eau et sa température. Le modèle de Fang ne peut pas par conséquent être directement extrapoler au cas de granules se développant sur un mélange complexe de substrats.

## NOTACIÓN EMPLEADA

AGV: Ácidos Grasos Volátiles

BSR: Bacterias Sulfato Reductoras

IVL: Índice Volumétrico de Lodos

MEB: Microscopio Electrónico de Barrido

MET: Microscopio Electrónico de Trasmisión

MO: Microscopio Óptico

NMP: Número Más Probable

SEP: Sustancias Exopoliméricas

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles

SST: Sólidos Suspendidos Totales

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Bed



**CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE GRÁNULOS  
ANAEROBIOS DE REACTORES UASB INDUSTRIALES  
OPERADOS EN MESOFILIA**



## INTRODUCCION

En los últimos veinte años, la digestión anaerobia se ha vuelto una tecnología atractiva para el tratamiento de aguas residuales, tanto de origen industrial como urbano, dado sus bajos costos comparada con los sistemas de tratamiento biológicos aerobios así como con los sistemas de tratamiento fisicoquímicos (Eckenfelder y col., 1988). Los bajos costos están típicamente asociados a la reducción del consumo energético (ausencia de aireación, producción de metano), de la producción de lodo y también de los insumos (N, P, floculantes, para citar algunos ejemplos).

Actualmente, por lo menos 776 digestores de alta tasa están operando en el mundo (Macarie, 1996), de los cuales 187 han sido construidos en America Latina (Borzaconi y López, 1994) y 75 en México (Monroy y col., 1997). De todos los tipos de reactores que existen (contacto anaerobio, filtro anaerobio de flujo ascendente o descendente, UASB (upflow anaerobic sludge blanket, por sus siglas en inglés), reactor híbrido, reactor de lecho fluidificado) es el reactor UASB, desarrollado por Lettinga y colaboradores (1980), el que ha presentado mayor éxito comercial, constituyendo el 62% de todos los reactores construidos en el mundo, el 93% de los construidos en America Latina y el 73% de los construidos en México (Borzaconi y López, 1994; Macarie, 1996; Monroy y col., 1997).

El éxito del reactor UASB se debe a su capacidad para retener la biomasa sin necesidad de soporte, puesto que su diseño permite la selección de una biomasa que flocula dando gránulos compactos que presentan buenas propiedades de sedimentación (Lettinga y col., 1980). Esta ventaja, sin embargo, es también su principal limitante, dado que la formación de los gránulos es un fenómeno lento que puede tardar hasta seis meses cuando el reactor es inoculado con una biomasa no granular como lodos de digestores urbanos. (Lettinga, 1995). La formación de gránulos es además difícil de lograr con ciertos tipos de efluentes. Es el caso, por ejemplo, de las aguas residuales compuestas por ácidos grasos volátiles (AGV) que contienen también altas concentraciones de amonio (1000 mg N-  $\text{NH}_4/\text{l}$ ) (Hulshoff-Pol y col., 1983). Otros tipos de aguas residuales, tales como las de mataderos, queserías o las que resultan del tratamiento térmico de los lodos, no sólo inhiben la formación de los gránulos, sino que inducen también su desagregación cuando el reactor es inoculado con un lodo ya granulado (Grotenhuis y col.,



1991a; Hickey y col., 1991; Carozzi, 1993). Al contrario, la granulación procede rápidamente sobre los efluentes de la industria del almidón (Alibhai y Forster, 1986; Dubourguier y col., 1988a y b; Harada y col., 1988; Wijbenga y Bos, 1988; Howgrave-Graham y col., 1991; Alphenaar, 1994); de la producción de azúcar de remolacha (Lettinga y col., 1980, 1984; Alibhai y Forster, 1986), de las fábricas de papel (Hulshoff-Pol, 1989; Chen y col., 1988); de las destilerías (Adebowale y Kiff, 1988; Harada y col., 1988; Ramos y col. 1994); cervecería (Wu y col., 1991; Fang y col. 1995c; Bhatti y col., 1995a), de la fabricación de citrato (Wu y col., 1987); de la producción de levaduras (Hulshoff-Pol y col., 1983; Lettinga y col., 1984), de ácido tereftálico (Hickey y col., 1991; Macarie y col., 1992) y de aguas domésticas (Collivignarelli y col., 1990; Barbosa y Sant'Anna, 1989; Lettinga, 1994).

La granulación también ha sido observada con una variedad de sustratos sintéticos tales como etanol (Dolfing y Mulder, 1985; Grotenhuis y col., 1991a); metanol (Bhatti y col., 1995b); propionato (Fukusaki y col., 1991a; Grotenhuis y col., 1991a; Fang y col., 1995a); acetato (Wiegant y de Man, 1986; Harada y col., 1988); mezclas de AGV (ten Brummeler y col., 1985; Thiele y col., 1990; Macario y col., 1991; Visser y col., 1991; Wu y col., 1992; van Lier y col., 1992; Schmidt y Ahring, 1993); formato (Chui y col., 1994); benzoato (Li y col., 1995); fenol (Chang y col., 1995); glucosa (Chang y col., 1993; Yizhang y col., 1997); sacarosa (Sierra Alvarez, y col., 1988; Mac Leod y col., 1990; Guiot y col., 1992a; Fang y col., 1994); glutamato (Fang y col., 1994); gelatina (Alphenaar, 1994); acetona y butanol (Yizhang y col., 1997).

Durante los últimos 15 años, se ha realizado un gran esfuerzo de investigación para determinar los parámetros operacionales que permiten la obtención de un lodo granular, a partir de un lodo no granular. Entre los factores primordiales identificados se encuentran la concentración de calcio y magnesio (Mahoney y col., 1987; Schmidt y col., 1992; Schmidt y Ahring, 1993), la presencia de metales trazas (Fe, Co, Ni, etc) en cantidad suficiente para favorecer el crecimiento de los microorganismos metanogénicos (Guiot y col., 1988; Speece, 1994); la velocidad ascensional del líquido (Guiot y col., 1992b; Noyola y Moreno, 1994; Ramos y col., 1994) y del gas (Tilche y Vieira, 1991); la concentración y naturaleza del sustrato (Kosaric y col., 1990 b; Grotenhuis y col., 1991d; Pereboom, 1994; Thaveesri y col., 1995a); el nivel de preacidificación del agua (Vanderhaegen y col., 1992; Alphenaar, 1994); su temperatura

(Lettinga 1994) y tensión superficial (Thaveesri y col. 1995b); la carga específica aplicada (Hulshoff-Pol, 1989; Fang y Chui, 1993a) así como los niveles de la presión parcial de hidrógeno en la cama de lodo (Sam-Soon y col., 1987; Min y Ahn, 1997).

A pesar de todos estos estudios, los mecanismos íntimos de la granulación todavía son poco conocidos así como también la estructura de los gránulos y necesitan ser más profundizados.

Para contribuir al estudio de la granulación aprovechando las ventajas que ofrece el microscopio electrónico de barrido (MEB), resulta interesante hacer un estudio comparativo de gránulos anaerobios de diferentes reactores UASB industriales que operan con diversos sustratos y presentan diferentes diseños de construcción. Este estudio toma como referencia las observaciones de gránulos que se han realizado hasta el momento, y concluye con las premisas teóricas que surgen de las comparaciones y análisis efectuados. El principal interés es sentar las bases teóricas para futuras investigaciones en este campo.

Esta tesis se presenta dividida en tres capítulos. En el primero se presenta un análisis bibliográfico sobre el tema del gránulo anaerobio y la granulación, principalmente en reactores UASB. Se incluye una discusión de donde surgen los objetivos y alcance de este trabajo.

En el segundo capítulo se describe el trabajo experimental realizado, a partir del cual se seleccionaron las condiciones más adecuadas para el estudio de gránulos anaerobios con MEB y se analizaron las condiciones de operación de los reactores seleccionados.

En el tercer capítulo se presentan los resultados, discusión general y conclusión.



Capítulo 1:

**ESTUDIO BIBLIOGRAFICO**



### 1.1. ¿Qué es un gránulo anaerobio?

En esencia un gránulo es una forma particular de biopelícula, el cual corresponde a una asociación de varios microorganismos que están en interdependencia mutua. Diversos tipos de consorcios han sido descritos como flóculos, “pellets”, lodo floculento y gránulos. Según Dolfing (1987) “pellets” y gránulos son aglomerados con una estructura densa, que aún luego de sedimentar presentan una apariencia bien definida. En cambio, flóculos y lodo floculento presentan una estructura menos compacta y después de sedimentar forman una capa macroscópicamente homogénea.

El lodo granular no es exclusivo del UASB, sino que también se forma en otros tipos de reactores anaerobios tales como: el filtro de flujo ascendente (Young and Dahab, 1983); los diferentes tipos de reactores híbridos (Guiot y van den Berg, 1985; Tilche y Yang, 1988); los reactores compartimentalizados, tanto vertical (“Multiplate Anaerobic Reactor”) como horizontalmente (“Baffled Reactor”) (Tilche y col., 1988; El Mamouni y col., 1992; Van Lier y col., 1996), los reactores tipo “Gas Lift” (Beefink y van den Heuvel, 1988; Zoutberg y col., 1988), EGSB (“Expanded Granular Sludge Bed”) (Lettinga y col, 1995), IC (“Internal Circulation”) (Pereboom y Vereijken, 1994), de lecho fluidificado (Iza y col., 1988), pero también en reactores alimentados de manera discontinua como el SBR (“Sequential Batch Reactor”) (Kennedy y col., 1991; Banik y col., 1997).

### 1.2. Características físicas de los gránulos

Algunas de las principales características físicas de los lodos de varios reactores, de laboratorio e industriales, alimentados con influentes de composición diferente, se encuentran resumidas en la Tabla 1.1.

#### 1.2.1 Forma

Los gránulos pueden presentar diversas formas: oval o piriforme (Alibhai y Forster, 1986) aunque generalmente se suponen esféricos (Schmidt y Ahring, 1996). Pueden ser regulares o irregulares, presentando estos últimos protuberancias (Bhatti y col., 1995a). Observaciones con microscopía

Tabla 1.1 Características físicas lodos de varios reactores UASB industriales y de laboratorio, operados en mesofilia.

Sustratos	Bv (kg DQO/ m <sup>3</sup> .día)	Bx (g DQO/ g SSV.día)	Densidad (g/ml)	Diámetro promedio (mm)	Velocidad de Sedimentación (m/h)	IVL (ml/g)	SSV (g/l)	Cenizas (%)	SEP (mg/ g SSV)	Referencias
<b>Reactores de laboratorio</b>										
Acetato	17	-	-	0.46	-	18	-	-	-	Harada y col., 1988
AGV	70	-	-	1.12	-	16.9	-	-	-	
Almidón+Sacarosa	33	-	-	2.61	-	19.2	-	-	-	
Melazas	13	-	-	1.53	-	33.5	-	-	-	
Sacarosa	14.5	-	-	1.2	-	20.9	-	-	-	
Lactato	58.5	-	1.17 - 1.33	0.55 - 1.83	1.98 - 127.4	-	47 - 56	44 - 53	100 - 170	Fukusaki y col., 1991b
Propionato	85	-	1.355	0.48 - 0.73	32 - 40	-	41.4	48.2	-	Fukusaki y col., 1991a
Acido Tereftálico	2.8 - 3.2	0.3 - 0.5	-	0.22 - 0.31	3.2 - 3.5	26 - 30	26 - 30	47 - 53	-	Macarie y col., 1992
Glucosa	17.6	-	0.97 - 1.19	0.4 - 0.5	33 - 35	-	30	11 - 13	-	Chang y col., 1993
Metanol	15	-	-	1 - 4	91	-	93	13.2	12.9	Bhatti y col., 1995b
Fenol	5.2	-	1.075 - 1.078	0.66 - 0.75	31 - 33.3	-	6	8.7 - 11.9	-	Chang y col., 1995
Glucosa	-	0.2	-	0.3	3.2	12	102	16	216.5	El Mamouni y col., 1995
Acetato/ Etanol	-	0.2	-	0.4	10.5	20.4	37	30	35.2	
Metanol	-	0.2	-	0.7	8.7	23.3	36	40	42.2	
Acetato	-	0.2	-	0.8	11.3	14.1	70	60	26.6	
Propionato	23	-	-	1 - 2	-	-	-	-	-	Fang y col., 1995a
Almidón	9	-	1.065	2.1	81	-	95	34 - 40	19.4	Fukusaki y col., 1995
Sacarosa	12.2	-	1.063	1.82	92.16	-	96	29 - 35	17.2	
Etanol	36.5	-	1.058	0.87	58.68	-	89	24 - 29	11.7	
Butirato-Propionato	46	-	1.223	0.55	41.04	-	129	56 - 63	8.4	
<b>Reactores Industriales</b>										
Refinería de azúcar	-	-	1 - 1.05	-	18 - 108	-	-	10 - 20	1 - 2	Dolfing y col., 1985
Azúcar de remolacha	-	-	-	1.6	-	-	-	30.3	-	Alibhai y Forster, 1986
Remolacha/papas	-	-	-	2.2	-	-	-	21.7	-	
Maiz	-	-	-	1	-	-	-	24.3	-	
Destilería	11 - 14.5	-	1.039	1.5	52.9	-	-	17.5	-	Hulshoff-Pol, 1989;
Azúcar de remolacha	15 - 20	0.6	1.038 - 1.044	1.89 - 2.17	83.3	-	54.29	11.8	-	Pereboom, 1994
Proceso de papas	8 - 11	0.35	1.039 - 1.057	1.07 - 1.76	97.8	-	40	20 - 29	-	
Reciclado de papel	10 - 25	0.25	1.042 - 1.07	1.52 - 2.2	98.9	-	56.7	18 - 19	-	
Azúcar de remolacha	11 - 17.5	0.52	1.082 - 1.095	0.62 - 0.8	53.6	-	44.7	55 - 70	-	
Papel	5.7	0.1	1.065	1.17	-	-	59.2	26	-	Pereboom, 1994
Cervecería	6.8	0.2	1.054	1.13	-	-	58.4	20	-	
Regaliz	13	0.44	1.045	1.21	-	-	38.4	20	-	
Cervecería	16.8	-	-	1 - 4	150	-	97	20.6	17.4	Bhatti y col., 1995a
Cervecería	6.4	-	-	1 - 5	75.6	-	105	11	24.1	

Bx: Carga másica; Bv: Carga volumétrica; SEP: Sustancias exopoliméricas; IVL: Índice volumétrico de lodos; SSV: Sólidos suspendidos volátiles

electrónica de barrido (MEB) han revelado que algunos gránulos pueden presentar una superficie rugosa con numerosas aberturas de diferentes tamaños y formas. Es el caso, por ejemplo, de gránulos que tratan aguas residuales de cervecería (Hickey y col., 1991), de la producción de helado (Anderson y col., 1991), sacarosa (Anderson y col., 1991) o fenol (Chang y col., 1995) en condiciones mesofílicas, o bien acetato en condiciones termofílicas (Wiegant y de Man, 1986). Por estas aperturas podría ser liberado el biogás y conducirse los nutrientes hacia el interior del gránulo.

### **1.2.2 Tamaño**

El diámetro de los gránulos puede variar de 0.1 a 8 mm (Hickey y col., 1991). La cama de lodo de un reactor UASB normalmente no está constituida por gránulos uniformes, sino que presenta una distribución muy amplia de gránulos de diferentes tamaños. Han sido empleadas varias técnicas para determinar esta distribución, entre las cuales se destaca el análisis de imágenes (Grotenhuis y col., 1991d; Dudley y col., 1993). Las distribuciones obtenidas muestran generalmente que el número de gránulos disminuye a medida que aumenta el diámetro, es decir que los gránulos pequeños (< 0.5 mm) son los más numerosos (Grotenhuis y col., 1991d; Pereboom, 1994). Estas distribuciones permiten calcular un diámetro promedio característico de un lodo granular determinado. Dependiendo de si la distribución está representada por número de gránulos o por masa, los diámetros promedios son diferentes (Grotenhuis y col., 1991d). El segundo es generalmente mayor puesto que aun si los gránulos de mayor diámetro son poco numerosos, su impacto sobre la masa es importante.

Tanto para reactores UASB industriales como de laboratorio, el diámetro promedio se sitúa en la mayoría de los casos entre 0.2-1.15 mm cuando está basado en el número y entre 0.5-2.2 mm cuando está calculado a partir de la masa (Dubourguier y col., 1988b; Hulshoff-Pol, 1989; Grotenhuis y col., 1991d; Pereboom, 1994; Chang y col., 1995). Varios experimentos de laboratorio con influentes sintéticos (a base de glucosa, sacarosa, propionato, lactato, fenol) o de la industria (vinazas de alcohol de caña) han mostrado además que puede existir un gradiente de tamaños de gránulos entre la base y la superficie de la cama de lodo (Fukusaki y col., 1991 a y b; Guiot y col., 1992b; Chang y col., 1993; Ramos y col., 1994; Chang y col., 1995). En casi todos los casos, los gránulos más grandes se localizan en la parte inferior y los más chicos en la parte



superior. Sin embargo también ha sido encontrada la distribución inversa (Chang y col., 1993) la cual corresponde, probablemente al caso de gránulos huecos flotantes (Yoda and Nishimura, 1997). Tal segregación se establece tanto a velocidades ascensionales bajas (0.25 m/h) como altas (6 m/h) (Guiot y col., 1992b; Ramos y col., 1994).

Contrariamente a lo observado a escala de laboratorio, la cama de lodo de varios reactores industriales no presentó segregación de tamaños, indicando que a esta escala aparentemente se obtiene un mejor mezclado del lodo (Pereboom, 1994).

Hay muy poca información disponible con respecto a la evolución de la granulometría de los lodos en función del tiempo. No obstante es evidente que la distribución de tamaño cambia durante el arranque cuando el reactor es inoculado con un lodo no granular o el lodo de otro UASB tratando un tipo de aguas diferentes. Sin embargo, observaciones realizadas sobre una variante del reactor UASB, el reactor de circulación interna, parecen indicar que una vez que el sistema está en fase estacionaria, la granulometría del lodo se mantiene constante por períodos largos (Pereboom y Vereijken, 1994).

El tamaño promedio de los gránulos resulta de múltiples factores tales como el tipo de nutrientes, la presencia de sólidos en suspensión en el influente, el crecimiento de los microorganismos, la limitación de sustrato hacia dentro de los gránulos, las fuerzas de ruptura y de abrasión ligadas en parte a las velocidades superficiales del líquido y del gas, así como también a la producción de sustancias exopoliméricas (SEP) (Grotenhuis y col., 1991b; Pereboom, 1994). De acuerdo con datos de la literatura, parece ser que gránulos alimentados con sustratos acidificados son generalmente más pequeños que aquellos crecidos sobre sustratos no acidificados (Beefink y van den Heuvel, 1988; Guiot y col., 1988; Harada y col., 1988; Fukusaki y col., 1991 a y b; 1995). Harada y col. (1988) y Fukusaki y col. (1995) observan por ejemplo que gránulos crecidos sobre almidón, sacarosa, etanol, butirato-propionato, lactato y acetato tienen diámetros promedios que disminuyen de 2.1-2.6 a 1.2-1.82, 0.87, 0.55 y 0.46 mm, respectivamente. Dado que estos autores

trabajaron con distintas velocidades de cargas orgánicas y tiempo de retención hidráulica para cada sustrato, las diferencias observadas podrían ser debidas a otros factores además del sustrato.

Los efluentes diluídos tienden también a dar gránulos más pequeños que los concentrados (Grotenhuis y col., 1991d; Lettinga, 1994). Sobre este punto, Grotenhuis y col. (1991d) mostraron que el diámetro promedio de gránulos alimentados con propionato, a la misma velocidad de carga másica (o específica), pasó de 0.22 a 0.40 mm cuando la concentración de este último aumentó de 2400 a 6900 mg DQO/l. Por otro lado, Pereboom (1994) mostró que existía una correlación inversa entre la concentración de sólidos en suspensión del agua residual y el diámetro de los gránulos. Una alta concentración de sólidos en suspensión favorece entonces la selección de gránulos chicos, mientras que una baja concentración de sólidos permite el desarrollo de gránulos de diámetro grande. El efecto de la velocidad ascensional del agua respecto al diámetro no es concluyente. Mientras algunos autores encuentran una relación positiva entre el aumento de la velocidad ascensional hasta 6 m/h y el tamaño de los gránulos (Guiot y col., 1992b; Ramos y col., 1994), otros encuentran una relación negativa cuando supera 1 m/h (Kosaric y col., 1990a).

### **1.2.3 Densidad y características de sedimentación**

Los gránulos anaerobios tienen generalmente densidades del orden de 1 a 1.095 g/ml, no obstante, en el caso de reactores de laboratorio alimentados con lactato o una mezcla de butirato-propionato, densidades de hasta 1.33 g/ml han sido encontradas (Tabla 1.1). Como era de esperarse, existe una correlación positiva entre la densidad de los gránulos y su contenido en material inorgánico (Hulshoff-Pol, 1989; Pereboom, 1994). Algunos autores (Beefink y van der Heuvel, 1988) han encontrado además que, aparentemente, en una misma cama de lodo la densidad de los gránulos disminuye con el incremento de diámetro. Esta distribución puede ser atribuida a limitaciones de sustrato en el centro de los agregados de gran tamaño, lo cual daría lugar a la lisis de los microorganismos ubicados en esa región, resultando en la formación de gránulos huecos con baja densidad. Han sido encontrados resultados similares por Pereboom y Vereijken (1994) para lodos de reactores UASB industriales. Sin embargo, esta relación entre

diámetro y densidad no se encuentra cuando se comparan camas de lodos de reactores que tratan diversos tipos de aguas residuales y que operan en condiciones diferentes (Hulshoff-Pol, 1989; Pereboom, 1994).

Los lodos granulares se caracterizan también por índices volumétricos (IVL) muy bajos, del orden de 12 a 34 ml/g, lo que indica una buena compactabilidad, así como por velocidades de sedimentación muy altas que pueden alcanzar hasta 150 m/h (Tabla 1.1). Evidentemente, de la misma forma que una cama de lodo es heterogénea, en cuanto al tamaño y forma de los gránulos que la componen, también está constituida por gránulos que sedimentan a diferentes velocidades y entonces puede ser caracterizada sólo por una velocidad máxima o promedio de sedimentación. Las diferentes técnicas empleadas para determinarla no dan necesariamente el mismo resultado. La técnica propuesta por Andras y col. (1989) que consiste en aplicar varias velocidades ascensionales a una cama de lodo y en determinar la cantidad de sólido arrastrado para cada velocidad, da información práctica con respecto al comportamiento del lodo en condiciones de operación de los reactores UASB. Esta técnica confirma que se requieren velocidades ascensionales tan altas como 24-55 m/h para arrastrar completamente los sólidos de la mayoría de los lodos y que, por lo tanto, la velocidad de sedimentación de los gránulos es del mismo orden.

Estas velocidades, las cuales están muy por encima de las velocidades ascensionales del líquido (1-2 m/h) impuestas a los digestores UASB, y por lo tanto responsables de la buena retención de biomasa en estos sistemas, no están relacionadas con un aumento de la densidad de los gránulos con respecto a las células libres, puesto que tanto los gránulos como las células en suspensión tienen densidades similares y cercanas a la del agua (Dolfing y col., 1985). Por lo tanto no es sorprendente que no se haya encontrado ninguna relación entre estos parámetros. Hulshoff-Pol (1989) observó, por ejemplo, durante un estudio de caracterización física del lodo de varios reactores UASB, que el lodo tratando los efluentes de un ingenio azucarero, el cual tenía la mayor densidad (1.08 g/ml) y el mayor contenido de cenizas (55%) también presentaba la velocidad de sedimentación más baja (Tabla 1.1). De hecho, las velocidades observadas están más bien relacionadas con las propiedades de sedimentación de los sólidos esféricos en un líquido, las cuales dependen no solamente de la densidad de las partículas, sino también de su diámetro.

La velocidad de sedimentación ( $V_s$ ) de las partículas, en función del régimen hidráulico, se relaciona con el diámetro de la siguiente manera (Sakiadis, 1984; Hulshoff-Pol, 1989):

$$* \text{ Régimen laminar (Número de Reynolds} = Re = D_p \cdot \rho \cdot V_s / \nu < 0.1) \quad [1]$$

$$V_s = \frac{g \cdot D_p^2 (\rho_p - \rho)}{18 \mu} \quad (\text{Ley de Stokes})$$

$$* \text{ Régimen transitorio entre laminar y turbulento (} 0.1 < Re < 1000) \quad [2]$$

$$V_s = 0.153 \cdot \frac{D_p^{1.13} \cdot g^{0.71} \cdot (\rho_p - \rho)^{0.71}}{\mu^{0.42} \cdot \rho^{0.29}}$$

En donde:

$g$  = aceleración gravitacional ( $m/s^2$ )

$D_p$  = diámetro de la partícula (m)

$\rho_p$  = densidad de la partícula ( $kg/m^3$ )

$\rho$  = densidad del líquido ( $kg/m^3$ )

$\mu$  = viscosidad del líquido ( $N \cdot s/m^2$ )

Estas ecuaciones indican que la velocidad de sedimentación incrementa con el cuadrado del diámetro de las partículas, en régimen laminar y aproximadamente de forma lineal, en el régimen transitorio. Las ecuaciones 1 y 2 también explican por qué la densidad influye poco, lo que es congruente con lo expresado en el párrafo anterior.

Parece lógico entonces que Pereboom y Vereijken (1994) hayan encontrado, por lo menos cualitativamente, una buena relación entre velocidades de sedimentación medidas y calculadas a partir del diámetro de los gránulos; pudiendo explicarse las diferencias por el hecho de que los gránulos no son esferas perfectas y que, por lo tanto, se tendría que aplicar algún factor de corrección de esfericidad en las ecuaciones anteriores (Sakiadis, 1984). Fukusaki y col. (1991 a y b) también mencionan correlaciones positivas entre la velocidad de sedimentación y el diámetro

de los gránulos desarrollados sobre propionato y lactato, por lo menos hasta diámetros de 1.6 mm. Para gránulos de mayor tamaño, otros factores podrían intervenir, como centros huecos, abundancia de gas en el interior, favoreciendo la flotación de los gránulos, lo que haría difícil correlacionar sus propiedades de sedimentación con el diámetro (Pereboom, 1994; Yoda y Nishimura, 1997).

#### 1.2.4 Resistencia mecánica

En un reactor UASB los gránulos están sometidos a fuerzas de corte que se traducen en una erosión de su superficie o en su ruptura, resultando ambos procesos, en una disminución de su tamaño. Las fuerzas de abrasión se deben esencialmente a los flujos de gas y de líquido, que crean una agitación responsable, por ejemplo, de colisiones entre los gránulos. La retención de la biomasa en los reactores UASB se debe principalmente al tamaño de los gránulos que la componen, por lo tanto estos reactores deben ser diseñados para que las fuerzas de abrasión que se generan en ellos no superen la resistencia mecánica de los gránulos.

Experimentos de abrasión en tanques agitados o en vasos de tipo "Couette", a varias velocidades de rotación, han mostrado que la resistencia mecánica de los gránulos es relativamente baja. A partir de fuerzas de corte del orden de  $78.5 \times 10^{-3} \text{ N/m}^2$ , los gránulos se desintegran completamente (Tramper y col. 1994). La resistencia de los gránulos a la compresión también ha sido determinada. Esta medida ha permitido poner en evidencia que los lodos granulares de digestores industriales, cualquiera que sea el tipo de agua tratada y las cargas volumétricas aplicadas, son más resistentes que los lodos granulares cultivados en reactores de laboratorio sobre una mezcla de ácidos grasos volátiles. Mientras que los primeros se rompen a presiones críticas de  $0.26$  a  $2.5 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ , presiones diez veces inferiores ( $0.07$  a  $0.13 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ ) son suficientes para romper los segundos (Hulshoff-Pol, 1989). Este recurso ha sido empleado también para evaluar la evolución de la resistencia de los gránulos en función de cambios en la alimentación o condiciones de operación de los reactores. Se ha observado por ejemplo que la resistencia de los gránulos crecidos sobre el agua residual de una procesadora de papas disminuía cuando se alimentaban con glucosa o cuando la fuerza iónica del medio incrementaba (Hulshoff

Pol, 1989). Este tipo de información puede, en consecuencia, ser muy útil para seleccionar los inóculos de los reactores en función del tipo de agua a tratar.

No obstante, tanto la técnica de abrasión en tanques agitados como la compresión, no permiten obtener resultados que se puedan relacionar directamente con los parámetros de operación de los reactores. Es obvio, por ejemplo, que la resistencia a la presión en sí misma, no representa físicamente nada concreto, dado que la compresión a la cual deben resistir los gránulos en estos sistemas, y que corresponde a la suma de la presión hidrostática (4 a 6 metros de columna de agua) y de la presión de gas (20 cm de columna de agua) es mínima, y que las fuerzas de ruptura son diferentes. Por su lado, los resultados de abrasión en tanques agitados podrían ser correlacionados directamente con las fuerzas cortantes de los digestores, sin embargo, estas últimas no son fácilmente accesibles pues requieren de un cálculo complejo en el cual intervienen varios parámetros no siempre disponibles (Pereboom y Vereijken, 1994).

Pruebas de abrasión en columnas de burbuja con diferentes flujos de gas, dan una información más fácilmente interpretable con respecto a los parámetros de operación de los digestores, como es la velocidad superficial del gas (flujo de gas dividido por la sección del reactor). Además, corresponde a un modo de abrasión mucho más cercano a lo que ocurre en los digestores en donde la agitación es en gran medida el resultado de la producción de gas. Esto evita el efecto de ruptura de los gránulos que se observa en los tanques agitados y que resulta de la interacción directa de los gránulos con el agitador en movimiento (Pereboom, 1997). Empleando esta técnica con lodos granulares de dos reactores diferentes (tratando aguas de una fábrica de papel y de un ingenio azucarero), se ha mostrado que no existe ruptura y que hay muy poca erosión de la superficie de los gránulos, a velocidades superficiales de gas de hasta 1041 m/h, mantenidas durante toda una semana (Pereboom, 1994). Estas velocidades son muy elevadas comparadas con las que son mantenidas normalmente en reactores UASB (0.36-1.8 m/h) y, por lo tanto, causan fuerzas cortantes mayores que las soportadas habitualmente por los gránulos.

Dado que en los reactores la producción de gas proviene directamente de los gránulos, se ha estudiado también como evoluciona la integridad de éstos en presencia de una fuerte concentración de sustrato, asegurando de esta manera una producción interna de gas elevada.

Después de tres semanas, no se observó ninguna ruptura de los gránulos (Pereboom, 1994). Estos resultados indican que la resistencia mecánica de los gránulos, aún siendo baja, es más que suficiente para asegurar su integridad en las condiciones de operación de los reactores. Pereboom (1997) calcula por ejemplo, que para una velocidad superficial extrema de 3.6 m de biogás por hora, serían necesarios más de 300 días para erosionar el 50% de la masa de los gránulos de un reactor UASB. Este tiempo corresponde a varias veces el tiempo de residencia de la biomasa en estos sistemas. Por lo tanto, la velocidad de crecimiento es mayor a la de erosión y cabría pensar que este último fenómeno no es de mucha importancia.

Todavía no se conocen bien los factores responsables de la resistencia mecánica de los gránulos. Por lo menos, dado que no se ha encontrado ninguna correlación con el contenido en material inorgánico, se sabe que éste no desempeña un papel significativo (Hulshoff-Pol, 1989). Aparentemente los exopolímeros que sirven de adhesivo entre las bacterias, podrían ser la causa de la resistencia mecánica (Tramper y col., 1984). Correlaciones positivas han sido encontradas también con el tiempo de residencia celular de la biomasa, mientras que se encontraron correlaciones negativas con la carga másica aplicada a los reactores y con el diámetro de los gránulos (Pereboom, 1997).

### **1.2.5 Porosidad**

Contrariamente a lo que se puede imaginar, los gránulos no están únicamente constituídos por microorganismos densamente empaquetados, uno junto al otro, sin espacio entre ellos. La presencia de poros observados en la superficie de varios gránulos, como ya se mencionó anteriormente, sugiere por ejemplo la existencia de numerosos canales en su interior, que conectan la parte central con el medio ambiente que lo rodea (Wiegant y de Man, 1986; Anderson y col., 1991; Wu y col., 1991). Otras observaciones han mostrado directamente que el interior de gránulos crecidos sobre sacarosa (Mc Leod y col., 1990) o fenol (Chang y col., 1995) presenta una estructura muy floja con varias cavidades, y que incluso algunos gránulos de varios orígenes tenían una gran cavidad central (Dolfing y col., 1985; Kosaric y col., 1990b; Alphenaar y col., 1993; Bhatti y col., 1995a). Todo esto indica que los gránulos tienen una estructura porosa, la

cual juega probablemente un papel muy importante en los fenómenos de transporte de los sustratos hacia los microorganismos y de los productos del metabolismo.

Con técnicas de cromatografía de exclusión, usando lodo granular como soporte y moléculas de diferentes tamaños (dextran, proteínas), Alphenaar y colaboradores (1992) evaluaron el volumen vacío interno de los gránulos así como el tamaño máximo de las moléculas que pueden penetrar en su interior. Los resultados obtenidos con esta técnica, han mostrado que, dependiendo del tipo de agua sobre el cual se desarrollan los gránulos, algunos de ellos tienen una porosidad muy alta (96% del volumen es vacío) contrariamente a otros (por ejemplo el lodo de un reactor EGSB tratando aguas urbanas), que tienen un volumen interno vacío de apenas 7%. El tamaño de las moléculas que pueden penetrar al interior de los gránulos varía también mucho de un lodo a otro, y puede pasar de casi 81000 Dalton a menos de 1300. Estos resultados sugieren que las moléculas demasiado grandes para pasar por los poros (ej.: celulosa, proteínas) de los gránulos, deberán ser degradadas en su superficie y que sólo los productos podrán penetrar en su interior. En todos los casos, aún cuando el tamaño máximo de las moléculas que pueden entrar en los gránulos es tan bajo como 1300 Dalton, este valor queda muy por encima del tamaño del acetato (60 g/mol), propionato (74 g/mol) y butirato (88 g/mol), los cuales deberían difundir en el gránulo sin mayor problema.

La técnica de cromatografía de exclusión no da exactamente el coeficiente de vacío de los gránulos. En efecto, de todos los gránulos probados por Alphenaar y colaboradores (1992), el que presentaba el volumen poroso más bajo tenía un centro hueco muy importante. De hecho, esta técnica indica más bien el volumen de los gránulos realmente accesible. Gracias a ella, se ha observado que la porosidad de los gránulos de un mismo lodo disminuye cuando el diámetro de los gránulos aumenta (Alphenaar y col., 1993). En el caso, por ejemplo, de un lodo que trata los efluentes del procesamiento de papas, la porosidad pasó de casi 100% para los gránulos de 0.5 a 1 mm de diámetro, a menos de 60-70% para los gránulos de más de 2 mm. Aparentemente, el tamaño de las moléculas que pueden penetrar los gránulos, disminuye también con el aumento del diámetro. Esto significa que las moléculas de alto peso molecular que podrían difundir en los gránulos pequeños, no lo pueden hacer en los grandes y que, por lo tanto, problemas importantes de transferencia de masa deben esperarse para gránulos de más de 2 mm de diámetro. Esto se



sustenta en el hecho de que en el mismo experimento, la disminución de porosidad con el diámetro fue correlacionada con una disminución de la actividad acetoclástica de los gránulos.

Cabe resaltar que un gránulo anaerobio no es obligatoriamente homogéneo a través de todo su radio. Es probable, por ejemplo, para gránulos grandes, que las capas externas tengan una gran porosidad idéntica a la de los gránulos pequeños y que la porosidad de las capas internas se haya vuelto más baja, resultando en un centro inactivo hueco que se puede llenar de gas y hacer flotar los lodos (Alphenaar y col., 1993).

A partir de los comentarios anteriores, parece que de manera general es preferible operar los reactores UASB con gránulos inferiores a 2 mm. Esto se puede lograr mediante un método mecánico de abrasión, como el propuesto por Yoda y Nishimura (1997).

### **1.3. Conservación de los gránulos**

A medida que se instalan mayor cantidad de reactores UASB, se hace necesario almacenar el lodo granular para su posterior uso como inóculo. Por otra parte, hay reactores industriales que operan intermitentemente o estacionalmente. Por lo tanto, resulta de gran importancia encontrar las condiciones más adecuadas de conservación, en particular respecto a la temperatura y el tiempo. A pesar de ello, existen muy pocos trabajos centrados en este aspecto. Los resultados disponibles, no obstante, son muy alentadores e indican que el lodo granular presenta buenas características de preservación, tanto desde el punto de vista microbiológico, como físico. Se ha demostrado, por ejemplo, que el gránulo puede conservar su forma y viabilidad aún después de un año sin alimentación, a una temperatura de 4 ó 22°C (Shin y col., 1993; Wu y col., 1995). Esta alta resistencia puede ser atribuída a la baja velocidad de muerte de los metanógenos, especialmente a bajas temperaturas, y a la alta resistencia relativa de la matriz exopolimérica del lodo granular. También se ha mostrado que el lodo granular puede recuperar su actividad metabólica original en 3 días luego de 31 días de almacenamiento, y en 15-25 días luego de 9 meses de almacenamiento a 4 ó 22°C.

## 1.4. Composición inorgánica y orgánica de los gránulos

### 1.4.1 Composición elemental y ubicación de los minerales

El contenido mineral del lodo granular se debe principalmente a fenómenos de precipitación que corresponden al hecho de que los cationes y el  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{S}^{2-}$  presentes en el agua forman compuestos (por ej.:  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ,  $\text{FeS}$ ) de baja solubilidad, que precipitan cuando su producto de solubilidad es rebasado (Dubourguier y col., 1988b). En consecuencia, el contenido mineral depende en gran parte de la composición del agua residual, su pH y de las condiciones de operación de los reactores. Batthi y col., (1995a), comparando el contenido de metales en dos lodos diferentes han encontrado sin embargo, que a concentraciones similares de hierro en el influente, hubo mayor cantidad de ese metal en la fracción de cenizas de uno que del otro. Esto muestra que aparentemente los lodos tienen la capacidad de captar específicamente algunos metales y que por lo tanto no sólo la composición del agua juega un papel importante en el contenido final de minerales. Como consecuencia de todo ello, el contenido de cenizas de un lodo a otro puede variar de 10 hasta el 70% de su peso seco (Tabla 1.1; Hulshoff-Pol y col., 1989; Grotenhuis y col., 1991a; Wu y col., 1991; Ahring y col., 1993; Dudley y col., 1993; Schmidt y Ahring, 1993). Según Schmidt y Ahring (1996), se puede generalizar sin embargo que en condiciones mesofílicas gránulos crecidos sobre aguas residuales complejas tienen un contenido de cenizas más bajo que gránulos crecidos sobre sustratos simples, como por ejemplo, acetato, propionato o butirato.

El contenido de cenizas o composición elemental ha sido estudiado mediante espectrometría de absorción atómica o por análisis de difracción de rayos X. Este último método ha permitido determinar que los minerales del gránulo se presentan en zonas definidas. Si bien hay un gradiente, no existe un patrón general en la deposición preferencial de determinados minerales en zonas particulares del gránulo (Alibhai y Forster, 1986; Uemura y Harada, 1995), aunque se han observado núcleos compuestos exclusivamente de calcio (Alibhai y Forster, 1986) o de calcio y fósforo (Uemura y Harada, 1995). Por lo tanto, la precipitación resulta, probablemente, de condiciones ambientales locales determinadas por la actividad microbiana.

Los precipitados inorgánicos, bajo la forma de sales de azufre o carbonatos, pueden servir de soporte para la adhesión de bacterias anaerobias. Por ejemplo, el FeS ha sido observado adherido firmemente a la vaina de *Methanothrix* sp. (Dubourguier y col., 1985). Mediante esta interacción, el sulfuro ferroso podría contribuir a la estabilización de los agregados bacterianos dentro del gránulo. También los precipitados de calcio, tales como CaCO<sub>3</sub> o hidroxiapatita, pueden servir de soporte para las bacterias. Grotenhuis y col., (1991c) demostraron al respecto, que los gránulos se desintegran o se tornan frágiles en presencia de EGTA (por sus siglas en inglés, ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) -N,N-Tetraacetic acid), el cual forma un complejo con el calcio y lo extrae. Basados en este resultado, concluyen que el calcio juega un papel muy importante en la estabilidad de los gránulos, ya sea porque sirve para la adhesión o bien porque sería un constituyente de las sustancias exopoliméricas. En contraste, la precipitación mineral puede limitar la disponibilidad de los iones debido a la baja solubilidad de sus productos.

Los gránulos pueden presentar diversos colores, principalmente negro, blanco y gris. Se ha intentado encontrar una relación entre contenido mineral y el color pero, hasta el momento, no hay consistencia en los resultados encontrados. En general se sostiene que el color negro se debe a la presencia de sulfuros de hierro y compuestos relacionados. Según Kosaric y col. (1990b), el color negro aparece cuando la relación entre S:Fe es de 1.8, mientras que relaciones de 5.5 y de 8 se traducen, respectivamente, en colores grises y blancos. Además el hierro puede existir como cloruro de hierro siendo más alta su presencia en gránulos blancos que en los negros.

Si bien hay pocos trabajos que relacionen las diferencias de color con la composición microbiana y tipo de alimentación, existen algunas evidencias que muestran que el color estaría relacionado con la composición microbiana. Se ha encontrado que en los gránulos negros predominan las bacterias metanogénicas y en los grises prevalecen las bacterias acidogénicas, mientras que en los blancos hay proporciones similares de ambos tipos (Thaveesri y col., 1995a). Aparentemente el color parece estar más relacionado con la composición microbiana que con el contenido mineral.

### 1.4.2 Composición química de los polímeros extracelulares

La composición orgánica de los gránulos corresponde esencialmente a las bacterias involucradas en el proceso de degradación y a los polímeros extracelulares que sirven de cemento (Dolfing, y col., 1985; Dubourguiet y col., 1988a; Harada y col., 1988).

Los polímeros extracelulares corresponden a compuestos de alto peso molecular (> 10000 dalton) producidos por microorganismos bajo ciertas condiciones ambientales (Morgan y col., 1990). Estas sustancias exopoliméricas (SEP) pueden ser excretadas activamente desde los microorganismos del gránulo, ser adsorbidas desde el medio o ser producto de lisis celular (Jahn y Nielsen, 1995). Los principales componentes de las SEP son proteínas, polisacáridos y lípidos (Dolfing y col., 1985; Morgan y col., 1990; Grotenhuis y col., 1991a y b; Shen y col., 1993 a y b). La alta resistencia de los gránulos a varios métodos de extracción (HCl 0.01 N, NaOH 0.1 N, 5% EDTA, ebullición, centrifugación, autoclave, sonicación) sugiere que los diferentes polímeros extracelulares y probablemente diferentes grupos de microorganismos contribuyen a la matriz (Dolfing y col., 1985).

La cantidad de SEP reportada para gránulos varía entre 0.6-20% del contenido en SSV (Dolfing y col., 1985; Morgan y col., 1990; Grotenhuis y col., 1991a y b; Shen y col., 1993 a y b) dependiendo del método de extracción y del método analítico utilizado. La cantidad de SEP parece depender además, del tipo de microorganismo presente. Se sabe, por ejemplo, que las bacterias acidogénicas producen una cantidad de SEP superior a las metanogénicas y que las bacterias degradadoras de etanol y acetógenas sintróficas no son grandes productoras de SEP, y sólo lo hacen en cantidades mínimas (Fukusaki y col., 1995). Por lo tanto la proporción de los diferentes grupos bacterianos podría afectar la cantidad de SEP (Quarmby y Forster, 1995a).

La formación de SEP suele también estar afectada por la composición del agua residual. Shen y col., (1993b) mostraron que la cantidad de carbohidratos extraídos de los gránulos incrementa con la adición de hierro y extracto de levadura al medio, ocurriendo lo inverso cuando se elimina el hierro. En general la síntesis de SEP se modifica por el balance nutricional y/o la diversidad de la microflora del gránulo (Hulshoff-Pol, 1989). Por ejemplo, un incremento en la relación C/N estimula la producción de exopolisacáridos (Bull y col., 1983) y *Methanobacterium* AZ produce

exopolipéptidos cuando es sometida a una fuente limitada en cisteína (Sam-Soon y col., 1987). Harada y col., (1988), concluyeron, sobre la base de observaciones con MEB y MET (Microscopía Electrónica de Transmisión), que las SEP excretadas por bacterias acidogénicas parecen contribuir a la adhesión de las células entre sí y a un mejoramiento de la resistencia mecánica y estabilidad estructural del gránulo. A la misma conclusión llegaron Quarmby y Forster (1995a) cuando relacionaron la resistencia de los gránulos a la sonicación con la cantidad y composición de las SEP. Morgan y col. (1990) evidenciaron que la concentración de SEP, así como la carga eléctrica sobre la superficie celular, afecta la estabilidad estructural del gránulo. La composición de las SEP modifica las propiedades superficiales y las propiedades físicas de los gránulos. Las bacterias dispersas están cargadas negativamente y hay repulsión electrostática entre ellas; la producción de SEP puede cambiar la carga superficial de las bacterias, resultando en la agregación de las mismas.

Por otra parte, una excesiva síntesis de SEP produce una cubierta gruesa que podría resultar en una inhibición de la liberación del gas, y en la formación de gránulos esponjados como se ha observado en gránulos crecidos sobre almidón (Fukusaki y col., 1995).

### **1.5. Composición microbiana de los gránulos**

Se han utilizado tanto técnicas directas, (Número Más Probable (NMP) e inmunohistoquímica) como indirectas (actividad metabólica) para determinar los microorganismos presentes en los gránulos. El conteo directo da generalmente una concentración de  $1 \times 10^{12}$  -  $4 \times 10^{12}$  céls. tot./ g de SSV (Dubourguier y col., 1988a; Wu y col., 1991; Schmidt y col., 1992; Ahring y col., 1993).

Las técnicas de NMP y de actividades metabólicas han permitido saber que los gránulos contienen todos los grupos tróficos necesarios para la conversión de moléculas complejas hasta metano (bacterias hidrolíticas-fermentativas, acetogénicas y metanogénicas) (Dubourguier y col., 1988a y b; Hickey y col., 1991). No obstante, en gránulos alimentados con AGV, el nivel de bacterias hidrolíticas-fermentativas es bastante bajo mientras que los grupos predominantes son metanógenos (Hickey y col., 1991). Schmidt y Ahring (1996) sostienen que existe una correlación entre los resultados de NMP y los de actividades metabólicas sobre diversos sustratos.

Generalmente no ocurre así puesto que para la técnica del NMP los gránulos son desintegrados, destruyéndose la organización y por ende las interacciones entre las especies. Por otra parte, todo método de cultivo es por definición selectivo y hay cepas no cultivables bajo esas condiciones definidas.

La actividad metabólica es directamente proporcional a la cantidad relativa de bacterias viables del grupo correspondiente al sustrato definido usado en la prueba de actividad (Dubourguier y col. 1988a). Para algunos autores, es más confiable que el conteo en cultivos, principalmente por la dispersión incompleta de bacterias (Dolfing y Bloemen, 1985; Guiot y col., 1992a).

Ahora bien, si se comparan mediciones de actividades metabólicas específicas realizadas por algunos autores, llama la atención que se encuentren la mayoría de los grupos tróficos, aún cuando la alimentación es muy específica para un determinado grupo. Por ejemplo, se encontraron bacterias creciendo sobre glucosa ( $3.6 \times 10^8$  céls/ g SSV) en lodos alimentados con acetato (Wu y col., 1992; 1993). Por otra parte, El Mamouni y col. (1995) encuentran actividad glucolítica en núcleos metanogénicos y sintróficos, mientras que esta actividad es muy baja en núcleos acidogénicos, alimentados con una alta carga de sacarosa. Una probable explicación, es que la población de gránulos presentes en las muestras utilizadas no sea homogénea en su composición microbiológica.

Otro hecho llamativo, es que cuando se observa con MEB sólo se detectan algunos de los grupos tróficos encontrados mediante las otras dos técnicas (conteo directo y NMP) (por ejemplo Chang y col., 1993). Esto podría estar indicando una limitación de la técnica de MEB, o bien, que los demás grupos tróficos podrían encontrarse en suspensión libre. Se ha reportado que los metanógenos se encuentran en los gránulos en mayor proporción que en suspensión (Dolfing y col., 1985; Guiot y col. 1986).

El conteo microscópico directo de bacterias presentes en gránulos crecidos sobre agua residual de refinería de azúcar reveló que el 20% del total de la población consistió de metanógenos semejantes a *Methanosaeta* (Dolfing y col., 1985). Varios investigadores, utilizando métodos microscópicos han encontrado microorganismos semejantes a *Methanosaeta* como el metanógeno acetoclástico predominante (Dolfing y col., 1985; Fukusaki y col., 1991a; MacLeod y col., 1990;

Chang y col., 1993; Shen y col., 1993a) si bien otros han encontrado que prevalece *Methanosarcina*,, particularmente en reactores termofílicos (Wiegant y de Man, 1986; Harada y col., 1988; Macario y col., 1991; Visser y col., 1991) y en mesofílicos (Bhatti y col., 1995a; Fukusaki y col., 1995; Quarmby y Forster, 1995a; Uemura y Harada, 1995). Macario y Conway de Macario (1988) encontraron que los dos metanógenos hidrogenofílicos más frecuentes fueron *Methanobrevibacter* AZ y *Methanobacterium formicicum*

A su vez, utilizando MET, MEB y pruebas inmunológicas Grotenhuis y col., (1991a) y Wu y col., (1992), han identificado los siguientes microorganismos: *Methanotherix soehngeni*, *Methanobrevibacter arboriphilus* AZ, como los más abundantes metanógenos hidrógenotrofos y acetoclásticos en gránulos que consumen propionato; *Methanospirillum hungatei*, *Methanosarcina barkeri*, predominantes en gránulos crecidos en etanol. *Methanobacterium formicicum* T1N y RF, *Methanosarcina mazei* T18, *Methanospirillum hungatei* BD y especies no filamentosas, en forma de bambú, de *Methanosaeta* (*Methanotherix* M7), todos ellos en gránulos alimentados con mezcla de acetato-propionato-butirato. Empleando técnicas inmunohistoquímicas y trabajando con reactores termofílicos, Macario y col., (1991) y Visser y col., (1991) han identificado: *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH, *Methanosarcina thermophila* TM1, *Methanotherix* Opfikon, *Methanobrevibacter arboriphilus* AZ, *Methanobrevibacter smithi* ALI. Koorneef y col. (1990) utilizando inmunofluorescencia indirecta y trabajando con reactores alimentados con diferentes sustratos, encontraron que de las diez bacterias metanogénicas diferentes que prevalecieron en los cinco reactores, sólo *Methanobacterium formicicum* MF1, *Methanobrevibacter arboriphilus* AZ, y *Methanotherix* Opfikon, estuvieron presentes en todos los gránulos. También se han identificado, con las mismas técnicas, algunas bacterias sintróficas acetogénicas tales como, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophus buswellii*, *Syntrophospora bryanti* .(Boone y Bryant, 1980; Mc Inerney y col., 1981; Dubourguier y col., 1988a y b; Prensier y col., 1988; Stams y col., 1989).

Por otra parte, Harmsen, (1996) realizó la detección de bacterias sintróficas oxidantes de propionato mediante hibridización *in situ* utilizando oligonucleótidos de ARN, 16S, encontrando

que *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov. estuvo presente en gran número en el lodo granular de UASB que trata aguas residuales del procesamiento de azúcar de remolacha.

Si bien las bacterias sintróficas se presentan, en los gránulos, en menor número que las metanogénicas (la relación entre metanógenos y *Syntrophobacter* es de 2.33/1, según Dubourguier y col, 1988a), son indispensables para el consumo de propionato, butirato, etanol, benzoato y ácidos grasos de cadena larga, puesto que estas reacciones son termodinámicamente desfavorables y dependen de la eficiencia en la transferencia interespecies de hidrógeno o de la transferencia de formiato. Para lograr altas velocidades de conversión de los intermediarios los microorganismos necesitan estar organizados en consorcios sintróficos para minimizar la distancia entre ellos. Se ha calculado la distancia máxima entre bacterias productoras de hidrógeno y bacterias consumidoras de hidrógeno, para que la transferencia sea eficiente. Esta distancia es de 4  $\mu\text{m}$  para la degradación del propionato, de 9.3  $\mu\text{m}$  para butirato y de 660  $\mu\text{m}$  para etanol (Stams y col., 1989).

Otro grupo importante de bacterias presentes en digestores anaerobios, aunque no necesariamente en el gránulo, son las bacterias hidrolíticas y fermentativas, las cuales pertenecen a grupos diversos, pudiendo ser facultativas como las enterobacterias, aerotolerantes, como las del ácido láctico y anaerobias, como los géneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*.

Novaes y col., (1988), aislaron e identificaron *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp. y *Desulfovibrio desulfuricans* en lodo granular tratando aguas domésticas. Villa Gómez y Ramos Alvarez (1994) identificaron bacterias de los géneros *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Streptococcus* en lodos granulares de reactores UASB alimentados con vinazas de destilería. Howgrave-Graham y col., (1991) trabajando con lodo granular alimentado con sustratos ricos en carbohidratos identificaron bacterias de los géneros *Lactobacillus* sp., *Salmonella*, *Klebsiella* y *Selenomonas*.

En gránulos de reactores que tratan influentes con alto contenido de sulfatos (aguas residuales de la fermentación de melazas, algunas operaciones de la fabricación de papel, aguas ácidas de refinerías de petróleo, de producción de ácido cítrico, de la producción de aceite de palma,



destilerías de alcohol, plantas de producción de levaduras y operaciones con glutamato de sodio) se encuentran presentes bacterias sulfato reductoras (BSR). Éstas son un grupo muy diverso en términos de actividades metabólicas, morfotipos y afinidades de sustrato. En general, los sustratos que pueden emplear son todos productos del metabolismo de bacterias fermentadoras, incluyendo compuestos homocíclicos y heterocíclicos, y el hidrógeno. Básicamente pueden subdividirse en dos grupos metabólicos principales: las oxidadoras completas, es decir las que oxidan completamente sus sustratos, incluyendo el acetato, en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{S}^{=}$  (por ejemplo, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina*) y las oxidadoras incompletas, cuyos productos finales son acetato,  $\text{CO}_2$  y  $\text{S}^{=}$ , las cuales pertenecen, esencialmente al género *Desulfovibrio*. La mayoría de las bacterias de este grupo pueden utilizar el lactato y el etanol, en ausencia de sulfatos, transformándolos en acetato,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  mediante una asociación sintrófica con bacterias metanogénicas hidrogenofílicas. El metanol puede también ser degradado hasta  $\text{CO}_2$  vía sulfato reducción por un cocultivo de *Desulfovibrio vulgaris* y varios homoacetógenos (Widdel, 1988). El propionato, butirato y los ácidos grasos de cadena larga, pueden ser completamente oxidados hasta  $\text{CO}_2$  o convertidos hasta acetato o acetato más propionato (estos últimos en el caso de ácidos grasos de cadena larga de número impar con cinco o más átomos de carbono); ácidos grasos ramificados tales como isobutirato, isovalerato y 2-metilbutirato pueden también ser oxidados completamente hasta  $\text{CO}_2$  o incompletamente hasta acetato (Widdel, 1988).

Las BSR están presentes en menor número que los acetógenos sintróficos en gránulos que tratan azúcares (Dubourguier y col., 1988a). Ney y col., (1990) cuantificaron la distribución de los diferentes grupos metabólicos presentes en suspensión libre y en la biopelícula. Estos autores encontraron que las bacterias degradadoras de furfural (*Desulfovibrio furfuralis*) estuvieron 4.5 veces en mayor cantidad en suspensión libre que en el gránulo, en contraste con 5.8 veces más acetotróficos y 16.6 veces más metanógenos hidrógenotrofos encontrados en el gránulo que en suspensión libre, lo que indicaría una menor habilidad de las bacterias BSR para adherirse. Este hecho ha sido señalado también por otros autores (Visser, 1993; Speece, 1996). Por otra parte, Wu y col., (1991) pusieron en evidencia la presencia de SBR (semejantes a *Desulfovibrio* y a *Desulfobulbus*) en gránulos que tratan el efluente de cervecería con moderado nivel de sulfatos (0.6-1.3 mM).

## **1.6. Formación de los gránulos**

Según Schmidt y Ahring, (1996), en el desarrollo inicial de una biopelícula/gránulo a partir de una célula, se pueden distinguir cuatro etapas: (Schmidt y Ahring, 1996):

- \* transporte de una célula a la superficie de un material inerte o de otra célula. El mecanismo puede ser por difusión (movimiento Browniano), transporte advectivo mediante el flujo del fluido, movimiento activo (flagelos), flotación por el gas, sedimentación.

- \* adsorción inicial reversible al soporte mediante fuerzas fisicoquímicas

- \* adhesión irreversible de las células mediante sus apéndices y/o biopolímeros

- \* multiplicación de las células, captura de nuevas bacterias desde la fase líquida y el consecuente desarrollo del gránulo. El arreglo de las células puede depender de la hidrofobicidad local, presencia de biopolímeros o de la geometría celular.

El paso inicial de adhesión puede ser descrito por teorías fisicoquímicas. Las superficies bacterianas están cargadas negativamente a pH neutro y por lo tanto se repelen unas a otras (Ash, 1979). De acuerdo a la teoría electrocinética, la adhesión se puede explicar como un proceso que resulta de un balance entre las fuerzas electrostáticas de repulsión y las fuerzas de atracción de van der Waals, lo cual es una función de la fuerza iónica del líquido de la suspensión (van Loosdrecht y col., 1987 y 1990). La adhesión de células hidrofílicas parece estar favorecida a bajas tensiones superficiales del líquido, mientras que la adhesión de células hidrofóbicas se ve mejorada con altas tensiones superficiales del líquido (Thaveesri y col., 1995b).

Otro factor muy importante para la adhesión y agregación es la propiedad de los microorganismos para producir SEP aunque no está claro si las bacterias se adhieren primero reversiblemente y luego producen SEP o inicialmente las producen y luego se adhieren irreversiblemente. El crecimiento del gránulo dependerá del balance entre el desarrollo de la microcolonia y el desprendimiento de las células causado por muerte y las fuerzas de abrasión del fluido.

A nivel microbiológico, se han propuesto varias hipótesis sobre la iniciación y desarrollo de los gránulos (Sam-Soon, 1987; Colleran, 1988; Wiegant, 1988; de Zeeuw, 1988; Morgan y col., 1991b). Respecto a cuál es la célula inicial, la discusión principal de estos autores es si se trata de

*Methanosaeta* o de *Methanosarcina*.. Sin embargo El Mamouni (1995) logra crear núcleos primarios con diferentes grupos tróficos. Por otra parte se ha demostrado (Mulder y col., 1989) que un cultivo puro de *Selenomonas ruminantium* en un AGLR (“anaerobic gas lift reactor”) es capaz de formar gránulos, y estos autores atribuyen el mecanismo a una proteína básica de origen ribosomal.

Otros investigadores han puntualizado la importancia de bacterias productoras de SEP (acidogénicas) como precursoras iniciales del desarrollo de un gránulo (Harada y col., 1988; Vanderhaegen y col., 1992). Las bacterias acidogénicas fermentadoras de azúcares forman suficiente SEP y se aglutinan junto con un número limitado de *Methanosaeta* resultando en la formación de microfloculos (Dubourgier, 1988 a y b). Esto está apoyado en observaciones de que floculos pequeños siempre tienen una relación mucho mayor de actividad acidogénica que acetoclástica (Guiot y col., 1988, 1992a). Estos acidógenos pueden ser especies de *Propionibacterium* y/o *Selenomonas* que están descritas como formadores de agregados (Mulder y col., 1989).

Recientemente se ha encontrado que microorganismos sulfato-reductores (Alphenaar, 1994) y microorganismos nitrificantes (Heijnen y col., 1992; Tijhuis y col., 1992) pueden producir lodo granular, algo similar sucede con microorganismos desnitrificantes (Lin y Chen, 1994; Sich y Van Rijn, 1997). Los microorganismos semejantes a *Pseudomonas*, son los más abundantes aislados de esos gránulos (Van Rijn y col., 1996). Esta bacteria es conocida por producir densas biopelículas heterogéneas y por producir exopolisacáridos (Stewart y col., 1993). También se encuentran presentes en esos gránulos bacterias semejantes a *Zooglea* que cubre todo el gránulo. Lin y Chen, (1994) logran desarrollar gránulos con microorganismos desnitrificantes semejantes a *Hyphomicrobium*, en la periferia y *Methanosarcina* en el centro, observándose que puede ocurrir simultáneamente la desnitrificación y la metanogénesis.

### 1.7. Organización microbiana dentro del gránulo

La estructura microscópica de los gránulos ha sido estudiada con varias técnicas: microscopía óptica directa, contraste de fases (Ney y col., 1990; Wu y col., 1992), epifluorescencia (Adebowale y Kiff, 1988; Ney y col., 1990; Anderson y col., 1991; Fang y Chui, 1993b),

histoquímica (Alibhai y Forster, 1986; Visser y col., 1991; Forster y Quarmby, 1995a; Quarmby y Forster 1995a,b y c), pruebas inmunológicas a nivel óptico: inmunofluorescencia (Grotenhuis y col., 1991; Visser y col., 1991; Wu y col., 1992), inmunohistoquímica (Visser y col., 1991) y a nivel electrónico: inmunogold (Grotenhuis y col., 1991), hibridización in situ con oligonucleótidos de ARN<sub>r</sub> 16S (Harmsen, 1996), microscopía electrónica de transmisión (MET) (Dolfing y col., 1985; Dubourguier y col., 1988 a y b; MacLeod y col., 1990; Fang y col., 1995c), ultracitoquímica (Dubourguier y col., 1988 a y b; Prensier y col., 1988), microscopía electrónica de barrido (MEB) (Dolfing y col., 1985; Alibhai y Forster, 1986; Dubourguier y col., 1988 a y b; Harada y col., 1988; MacLeod y col., 1990; Guiot y col., 1992b; Fang y col., 1995a), medición de gradientes de pH y de glucosa con microelectrodos (Vanderhaegen y col., 1992; Lens y col., 1993, 1995).

Las primeras observaciones con MEB y MET de gránulos desarrollados sobre efluentes de ingenios azucareros, no mostraron una organización particular de los microorganismos, presentándose homogéneamente distribuidos (Dolfing y col., 1985).

Algunos años después, en el caso de la oxidación sintrófica del propionato, se observó mediante MET que gránulos crecidos sobre efluentes del proceso de almidón, una distribución espacial específica de microcolonias compuestas por bacterias sintróficas (*Syntrophobacter* sp., *Syntrophomonas* sp) rodeadas por bacterias metanogénicas (*Methanobrevibacter* sp, *Methanospirillum hungatei*) (Dubourguier y col 1988 a y b). Estos trabajos son posteriormente confirmados por Stams y col. (1989), Grotenhuis y col. (1991a) y Wu y col. (1991) mediante MET e inmunología. En todos estos trabajos las colonias se presentan al azar y no existe una supra-organización definida. La existencia de estas microcolonias permite una eficiente transferencia interespecies de hidrógeno, tomando favorable reacciones que son termodinámicamente desfavorables como la conversión de propionato a hidrógeno, acetato y CO<sub>2</sub>. La transferencia interespecies de hidrógeno se incrementa drásticamente con la agregación gracias a la yuxtaposición estrecha de los microorganismos sintróficos. Por ejemplo si una bacteria metanogénica disminuye la distancia de difusión cien veces, el flujo de hidrógeno se incrementa en la misma cantidad (Schink y Thauer, 1988).

MacLeod y col., (1990) por primera vez observan los gránulos siguiendo una estrategia bien definida. Utilizando gránulos crecidos sobre sacarosa y criofracturados con nitrógeno líquido, se dan cuenta de que las poblaciones de microorganismos difieren de acuerdo a la zona del gránulo observada. En la superficie, hasta una profundidad de 100  $\mu\text{m}$ , observaron poblaciones mixtas con una gran variedad de morfotipos (acidógenos y consumidores de hidrógeno) y en el centro únicamente bacterias similares a *Methanosaeta*. Entre el centro y la superficie ven una zona intermedia con bacterias que parecen ser sintróficas asociadas con metanogénicas hidrogenotróficas. A partir de estas observaciones y de análisis de actividades específicas de gránulos fragmentados por abrasión, Guiot y col. (1992a), establecen una estructura tipo del gránulo anaerobio en tres capas basada sobre el modelo de difusión de Mc Carty y Smith, (1986) (ver Figura 1). El modelo de difusión de producto y sustrato diferencia zonas activas para los diferentes grupos tróficos a lo largo del radio del gránulo. En el modelo de Guiot y col. (1992a) cada estructura agregada es un arreglo metabólico estable que crea las condiciones adecuadas de nutrición para todos sus miembros. Posteriormente, Arcand y col. (1994), sustentan ese modelo mediante un modelo matemático simulando el crecimiento del gránulo sobre sacarosa.

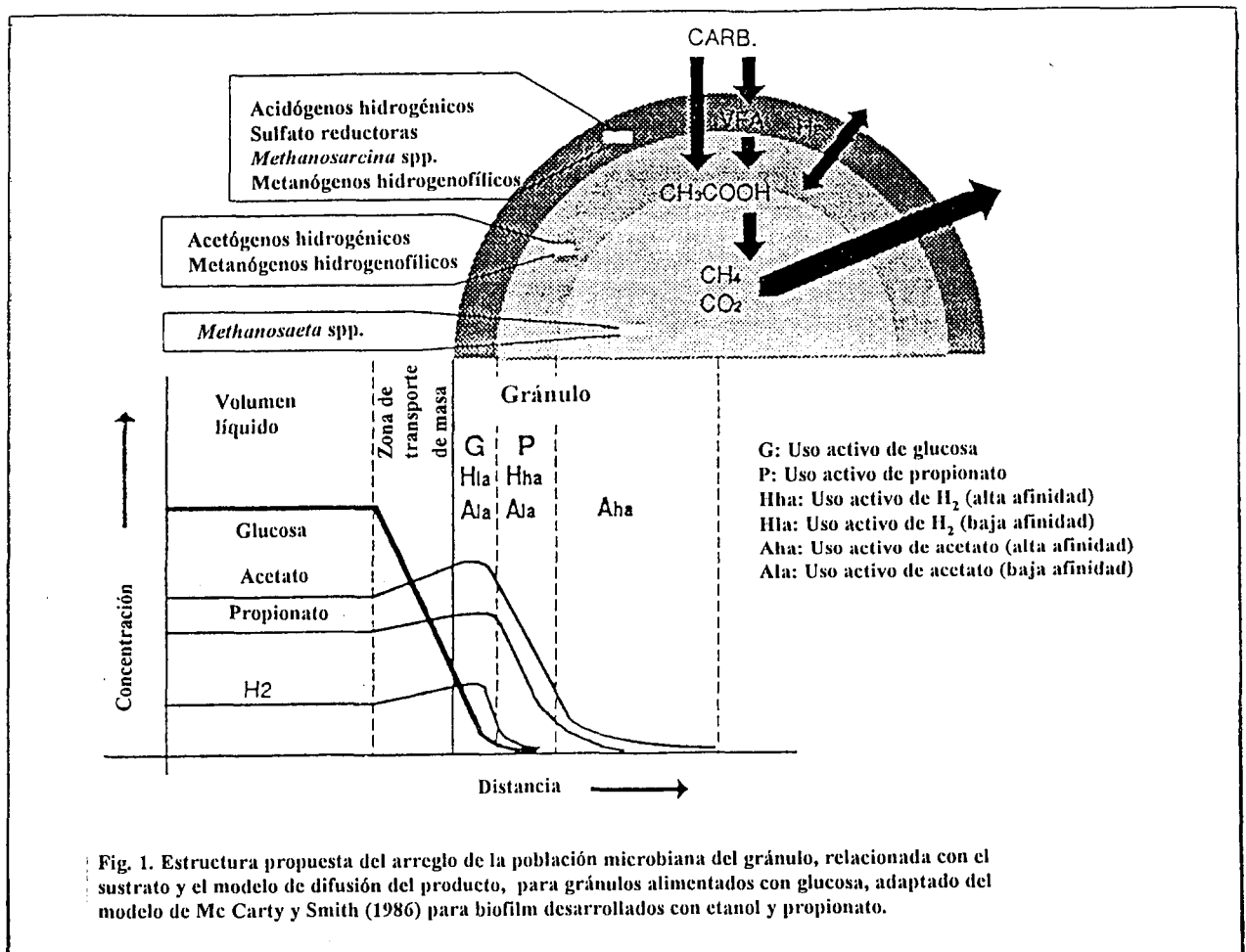


Fig. 1. Estructura propuesta del arreglo de la población microbiana del gránulo, relacionada con el sustrato y el modelo de difusión del producto, para gránulos alimentados con glucosa, adaptado del modelo de Mc Carty y Smith (1986) para biofilm desarrollados con etanol y propionato.

En 1993, Lens y colaboradores, midiendo gradientes de glucosa y de pH dentro de gránulos crecidos sobre azúcares, confirman la existencia de un fuerte consumo de glucosa en la capa externa (hasta 100  $\mu\text{m}$  de profundidad) y un aumento de pH de la periferia hacia el centro del gránulo a medida que los AGV generados en la primera capa son consumidos en el interior del gránulo.

Recientemente, Harmsen, (1996) realizó la detección y localización, mediante hibridación in situ con oligonucleótidos de ARN 16S y con oligonucleótidos fluorescentes, de bacterias sintróficas oxidantes de propionato en lodos granulares de reactores UASB que tratan efluentes de la industria de azúcar de remolacha y efluentes del procesamiento de papas. Este autor muestra que todos los gránulos presentaron dos zonas (una fermentativa y una sintrófica-acetoclástica) y difieren por la organización y el tipo de microcolonia sintrófica.

A pesar de estos experimentos aparentemente concluyentes, un cierto número de estudios posteriores, no encontraron esa estructura en capas en gránulos crecidos sobre propionato (Fukusaki y col., 1995; Grotenhuis y col., 1991a; Fang y col., 1995a), formiato (Chui y col., 1994), lactato (Fukusaki y col., 1991b), glutamato y peptona (Fang y col., 1994 y 1995b), fenol (Chang y col., 1995) o glucosa (Chang y col., 1993).

De lo anteriormente expuesto y de lo resumido en las Tablas 1.2 y 1.3, se desprende que ha sido encontrada en los gránulos anaerobios tanto una estructura homogénea como estratificada, y que la mayoría de aquellos alimentados con azúcares presentan una distribución estratificada de los microorganismos.

Recientemente, el equipo de Fang y col. (1995b, 1997) parece haber encontrado una explicación para las diferentes estructuras observadas en los gránulos. Según estos autores las cinéticas de consumo de los sustratos determinarán la formación de una estructura en capas o de una homogénea. Por ejemplo, los azúcares y las proteínas tienen cinéticas de hidrólisis y de conversión de AGV muy diferentes. Mientras es rápida para los azúcares, es lenta para las proteínas y aminoácidos. En estas condiciones, la transformación completa de los azúcares a AGV se puede realizar en los primeros 100  $\mu\text{m}$  de los gránulos y crean un gradiente inverso de azúcar y AGV entre la periferia y el centro. Según los mismos autores, estos gradientes se

Tabla 1.2: Reporte en la literatura de la estructura microbiana de gránulos anaerobios de reactores UASB cultivados bajo diferentes condiciones. (modificado de Lens y col., 1993)

Agua residual/ sustrato	Estructura del gránulo	Técnicas analíticas	Referencias
<b>Condiciones mesofílicas</b>			
<i>Distribución homogénea</i>			
Ingenio azucarero	Sin organización interna	MEB/MET	Dolfing y col., 1985
Almidón de maíz	Sin distribución específica	MO/MEB/MET	Dubourguier y col., 1985
AGV	Distribución homogénea	MEB	Alibhai y Forster, 1986
Almidón	Microcolonias	MO/MEB/MET NMP, Activ. Metabólicas	Dubourguier y col., 1988a y b
Sacarosa/Acetato	Sin distribución específica	MO/MEB	Anderson y col., 1991
Producción de Helado	Microcolonias		
Etanol	Sin distribución específica	MET y métodos inmunocitoquímicos	Grotenhuis y col., 1991a
Propionato	Microcolonias		
Glucosa	Distribución homogénea	MEB, Actividad Metabólica Específica	Chang y col., 1993a
Glutamato	Uniforme	MO/MEB/MET Epifluorescencia. Actividad Metanogénica	Fang y col., 1994
Fenólicas	Uniforme	MEB, Actividad Metabólica	Chang y col., 1995a
Propionato	Uniforme	MEB/MET	Fang y col., 1995a
Formato/Acetato	Uniforme		
Propionato/Peptona/ Glutamato	Uniforme pero compleja	MO/MEB	Fang y col., 1995b
Almidón/ Sacarosa/ Etanol./Butirato+Propionato	Uniforme	MEB	Fukusaki y col., 1995
<b>Condiciones termofílicas</b>			
Acetato	Distribución homogénea	MO/MEB	Wiegant y De Man, 1986

MO: Microscopía Óptica; MET: Microscopía Electrónica de Transmisión; MEB: Microscopía Electrónica de Barrido; AGV: Ácidos Grasos Volátiles; NMP: Número más probable.

**Tabla 1.3: Reporte en la literatura de la estructura microbiana de gránulos anaerobios de reactores UASB cultivados bajo diferentes condiciones. (modificado de Lens y col., 1993)**

Agua residual/ sustrato	Estructura del gránulo	Técnicas analíticas	Referencias
<b>Condiciones mesofílicas</b>			
<i>Distribución estratificada</i>			
Azúcar de remolacha/ Almidón de maíz	Morfotipos diferentes en la periferia y centro	MEB	Alibhai y Forster, 1986
Almidón y Sacarosa	Morfotipos diferentes en la periferia y centro	MEB/MET	Harada y col., 1988
Aguas domésticas	Morfotipos diferentes en la periferia y centro	MEB	Barbosa y Sant'Anna, 1989
Sacarosa	Tres capas morfológicas distintas	MEB/MET	McLeod y col., 1990*; Guiot y col., 1990, 1992a*
Proceso del café	Morfotipos diferentes en periferia y centro	MO/MEB	Anderson y col., 1991
Fábrica de papel. Refinería de azúcar	Morfotipos diferentes en periferia y centro	MO/MEB	Morgan y col., 1991b
Vinazas	Estructura multicapa	Perfil de pH con microelectrodos	Vanderhaegen y col., 1992
Glucosa/melaza	Compartimentalización de la acidogénesis en la periferia y metanogénesis en el centro del gránulo	Microelectrodos para pH y glucosa	Lens y col., 1993; 1995
Sacarosa/Cervecería	Tres capas morfológicas distintas	MO/MEB/MET, Epifluorescencia, Actividad Metanogénica	Fang y col., 1994
Cerveza	Morfotipos diferentes en la periferia y centro	MEB	Bhatti y col., 1995a
Metanol	Morfotipos diferentes en la periferia y centro	MEB/MET	Bhatti y col., 1995b
Sacarosa	Tres capas con diferentes hidrofobicidades	Angulo de contacto. Tensión superficial del líquido	Daffonchio y col., 1995; Thaveesri y col., 1995b
Cerveza	Tres capas	MO/MEB/MET, Epifluorescencia, Actividad Metanogénica Especifica	Fang y col., 1995b y c
Butirato/Benzoato	Dos capas	MO/MEB/MET, Epifluorescencia, Actividad Metanogénica Especifica	Fang y col., 1995b y c
Sacarosa/Almidón/ Cerveza	Tres capas	MO/MEB/MET, Epifluorescencia, Actividad Metanogénica Especifica	Fang y col., 1995b y c
Proceso de papas	Tres capas	MO/ histoquímica.	Forster y Quarmby, 1995
Proceso de papas	Dos capas	Sonicación	Forster y Quarmby, 1995
Cerveza	Dos capas	MO/ histoquímica.	Forster y Quarmby, 1995
Aceite de palma/ Café/ Melazas	Tres capas con diferentes afinidades histoquímicas	MO/histoquímica. MEB. Sonicación	Quarmby y Forster, 1995a, b y c

MO: Microscopía Óptica; MET: Microscopía Electrónica de Transmisión; MEB: Microscopía Electrónica de Barrido; (\*): Upflow Bed Filter



Reporte en la literatura de la estructura microbiana de gránulos anaerobios de reactores UASB cultivados bajo diferentes condiciones. (modificado de Lens y col., 1993)

Agua residual/sustrato	Estructura del gránulo	Técnicas analíticas	Referencias
<b>Condiciones mesofílicas</b>			
<i>Distribución estratificada</i>			
Sacarosa + AGV	Tres capas	Tensión superficial del líquido. Actividades metabólicas. F <sub>420</sub>	Thaveesri y col., 1995a
Sacarosa/ AGV/ Almidón	Dos capas activas y una zona central con grandes cavidades	Epifluorescencia, MET, CLSM Hibridización in situ con oligonucleótidos de ARN 16S	Harmsen, 1996
<b>Condiciones Termofílicas</b>			
Acetato	Tres capas morfológicas distintas	MET/ MO	Bochem y col., 1982
Acetato + Propionato + Butirato	Dos zonas bien diferenciadas	MET y métodos inmunocitoquímicos	Macario y col., 1991
Acetato + Propionato + Butirato	Dos zonas principales	MO/Histoquímica e Inmunohistoquímica, Inmunofluorescencia indirecta	Visser y col., 1991
Sacarosa	Dos capas	MEB, difracción de rayos X Actividad metanogénica	Uemura y Harada, 1995

CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy; ARN: Acido ribonucleico.

traducen en un estratificación de los microorganismos, lo mismo ocurrirá con todas las moléculas que presentan una cinética de conversión a AGV rápida (por ej: benzoato, butirato). La cinética de hidrólisis de las proteínas y de los aminoácidos siendo lenta, permite que puedan difundir hasta el centro del gránulo y por lo tanto una ausencia de gradiente se traducirá por una ausencia de estratificación de los grupos tróficos.

Todos los experimentos anteriores han sido realizados, sin embargo, con influentes sintéticos conteniendo una sola fuente de carbón y energía. ¿Qué sucede en cuanto a la distribución de los microorganismos en el gránulo cuando éstos son alimentados con aguas complejas que pueden contener mezclas de proteínas, azúcares y AGV, como lo son las aguas residuales industriales?

En este trabajo nos proponemos aportar algunas evidencias que contribuyan a dar respuesta a esta pregunta, observando con MEB la estructura de los gránulos de cinco digestores UASB industriales que tratan diversos tipos de aguas residuales.

## **1.8 Justificación, Hipótesis y Objetivos**

Se tiene la tendencia a generalizar un modelo estructural determinado de gránulo en relación a la composición química del sustrato. Los estudios realizados hasta la fecha son en su mayoría a escala de laboratorio. Dado que en México existe un número importante de reactores UASB industriales que tratan diferentes influentes, se pretende contribuir con este trabajo a un mejor conocimiento de la estructura del gránulo y de su relación con la composición química del influente.

### **Hipótesis**

Se postula que reactores UASB alimentados con influentes de composición química compleja, presentarán gránulos con una población microbiana estratificada cuando son alimentados con influentes en los que predominan azúcares y, un patrón de distribución homogéneo cuando los influentes contengan principalmente proteínas y/o AGV.

### **Objetivo General**

Caracterizar, estudiar y evaluar, mediante Microscopía Electrónica de Barrido, la organización microbiana de los gránulos de diferentes reactores UASB en estado estacionario.

### **Objetivos Específicos**

- \* Observar y reconocer los morfotipos que constituyen el gránulo anaerobio, en régimen estacionario.

- \* Relacionar y evaluar el efecto de la composición química del influente con la distribución de los morfotipos microbianos en el gránulo.

**BIBLIOGRAFIA**

- Adebowale, O. and Kiff, R. 1988. Operational trends in UASB reactor bed stability and during initiation of granulation, pp. 99-103. In: A. Tilche and A. Rozzi (eds). Poster Papers, Proc. of the fifth international symposium on anaerobic digestion. Monduzzi Editore, Bologna.
- Ahring, B.K., Schmidt, J.E., Winther Nielsen, M., Macario, A.J.L. and Conway de Macario, E. 1993. Effect of medium composition and sludge removal on the production, composition, and architecture of thermophilic (55°C) acetate-utilizing granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2538-2545.
- Alibhai, K.R.K and Forster, C.F. 1986. Physicochemical and biological characteristics of sludges produced in anaerobic upflow sludge blanket reactors. *Enz. Microb. Technol.* **8**: 601-606.
- Alphenaar, P.A. 1994. Anaerobic granular sludge: Characterization and factors affecting its functioning, Ph. D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Alphenaar, P.A., Pérez, M.C., van Berkel, W.J.H. and Lettinga, G. 1992. Determination of the permeability and porosity of anaerobic sludge granules by size exclusion chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 795-799.
- Alphenaar, P.A. Pérez, M.C. and Lettinga, G. 1993. The influence of substrate transport limitation on porosity and methanogenic activity of anaerobic sludge granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 276-280.
- Anderson, G.K., Yang, G. and Evison, L.M. 1991. Light and SEM examination of the effect of substrate changes on the structure of granular anaerobic sludge, pp. 346-351. International Symposium Environmental Biotechnology 22-25 April Oostende Belgium.
- Andras, E., Kennedy, K.J. and Richardson, D.A. 1989. Test for characterizing settleability of anaerobic sludge. *Environ. Technol. Lett.* **10**: 463-470.
- Arcand, Y., Chavarie, C. and Guiot, S.R. 1994. Dynamic modelling of the population distribution in the anaerobic granular biofilm. *Wat. Sci. Tech.* **30**(12): 63-73.
- Ash, S.G. 1979. Adhesion of microorganisms in fermentation processes, pp. 57-86. In: Adhesion of microorganisms to surfaces, D.C. Ellwood y col. (eds) Academic Press, New York, USA.
- Banik, G.C., Ellis, T.G. and Dague, R.R. 1997. Structure and methanogenic activity of granules from an ASBR treating dilute wastewater at low temperatures. *Wat. Sci. Tech.* **36**(6/7): 149-156.
- Barbosa, R.A. and Sant'Ana, G.L. 1989. Treatment of raw domestic sewage in an UASB reactor. *Wat. Res.* **23**: 1483-1490.
- Beeftink, H.H. and van den Heuvel, J.C. 1988. Physical properties of bacterial aggregates in a continuous-flow reactor with biomass retention, pp. 162-169. In: G Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. Pudoc Wageningen, The Netherlands.
- Bhatti, Z.I, Furukawa, K. and Fujita, M. 1995a. Comparative composition and characteristics of methanogenic granular sludges treating industrial wastes under different conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 273-280.
- Bhatti, Z.I., Furukawa, K. and Fujita, M. 1995b. Methanogenic granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket reactor treating synthetic methanolic waste. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 631-637.
- Bochem, H.P., Schoberth, S.M., Sprey, B. and Wengler, P. 1982. Thermophilic biomethanation of acetic acid: morphology and ultrastructure of a granular consortium. *Can. J. Microbiol.* **28**: 500-510.

- Boone, D.R. and Bryant, M.P. 1980. Propionate-degrading bacterium *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov. from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 626-632.
- Borzacconi, L. and López, Y. 1994. Un relevamiento de reactores anaerobios en Latinoamérica, pp. 263-279. In: M. Viñas, M. Soubes, L. Borzacconi, L. Muxi (eds.). III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay, 25-28 Octubre 1994.
- Bull, M.A., Steerit, R.M. and Lester, J.N. 1983. Anaerobic fluidized bed reactors. *Biotechnol. Lett.* 5: 333-338.
- Carozzi, A. 1993. Pretratamiento de las aguas residuales de la industria lechera, pp. 1-20. En: Actas del 5º Seminario "Depuración Anaerobia de Aguas Residuales". Valladolid 26-28 de Mayo de 1993, España.
- Chang, Y.J., Nishio, N. and Nagai, S. 1995. Characteristics of granular methanogenic sludge grown on phenol synthetic medium and methanogenic fermentation of phenolic wastewater in UASB reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 79: 348-353.
- Chang, Y.J., Nishio, N., Maruta, H. and Nagai, S. 1993. Characterization of granular methanogenic sludge grown on glucose in a UASB reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 430-434.
- Chen, Z.Y., Li, Y.J. and Liu, D.Y. 1988. Study on anaerobic treatment of lime semichemical pulp black liquors from paper industry, pp. 639-642. In: A. Tilche and A. Rozzi (eds). Poster Papers, Proc. of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Monduzzi Editore, Bologna.
- Chui, H.K. and Fang, H.H.P. 1994. Histological analysis of microstructure of UASB granules. *J. Environ. Eng.* 20: 1322-1326.
- Chui, H.K., Fang, H.H.P., Asce, M. and Li, Y.Y. 1994. Removal of formate from wastewater by anaerobic process. *J. Environ. Eng.* 120: 1308-1320.
- Colleran, E. 1988. Report on the technological aspects of granulation, pp. 237-240. In: G Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. Pudoc Wageningen, The Netherlands.
- Collivignarelli, C., Urbini, G., Farnett, A. and Barbaresi, U. 1990. Anaerobic-aerobic treatment of municipal wastewater with full-scale UASB and attached biofilm reactor. *Wat. Sci. Tech.* 22(1/2): 475-482.
- Daffonchio, D., Thaveesri, J. and Verstraete, W. 1995. Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from UASB. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3676-3680.
- Dolfing, J. 1985. Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrate concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 77-81.
- Dolfing, J. 1987. Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. Ph.D. Thesis. Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Dolfing, J. 1988. Hydrogen-based interactions in syntrophic propionate degrading microbial consortia, pp. 31-34. In: A. Tilche and A. Rozzi (eds). Poster Papers. Proc. Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Monduzzi Editore, Bologna.
- Dolfing, J. and Bloemen, G.B.M. 1985. Activity measurement as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *J. Microbiol. Methods* 4: 1-12.
- Dolfing, J. and Mulder, J.W. 1985. Comparison of methane production rate and coenzyme F<sub>420</sub> content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1142-1145.

- Dolfing, J., Griffioen, A., van Neerven, A.R.W. and Zevenhuizen, L.P.T.M. 1985. Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.* 31: 744-750.
- Dubourguier, H.C., Prensier, G., Samain, E. and Albagnac, G. 1985. Granular methanogenic sludge: microbial and structural analysis, pp. 542-546. *In*: Proc. Int. Conf. Biomass. Venice, Italy 25-29 March.
- Dubourguier, H.C., Archer, D.B., Albagnac, G. and Prensier, G. 1988a. Structure and metabolism of methanogenic microbial conglomerates, pp. 13-25. *In*: E.R. Hall and P.N. Hobson (eds). *Anaerobic digestion 1988*. Pergamon Press, Oxford.
- Dubourguier, H.C., Buisson, M.N., Tissier, J.P., Prensier, G. and Albagnac, G. 1988b. Structural characteristics and metabolic activities of granular methanogenic sludge on a mixed defined substrate, pp. 78-86. *In*: G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular anaerobic sludge; microbiology and technology*. Pudoc Wageningen, The Netherlands.
- Dudley, B.T., Howgrave-Graham, A.R., Bruton, A.G. and Wallis, F.M. 1993. Image analysis to quantify and measure UASB digester granules. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 279-283.
- Eckenfelder, W.W., Patoczka, J.B. and Pulliam, G.W. 1988. Anaerobic versus aerobic treatment in the USA, pp. 105-114. *In*: E.R. Hall and P.N. Hobson (eds). *Anaerobic Digestion*. Pergamon Press, Oxford.
- El Mamouni, R., Rouleau, D., Mayer, R., Guiot, S.R. and Samson, R. 1992. Comparison of the novel multiplate anaerobic reactor with the upflow anaerobic sludge blanket reactor, pp. 681-687. *In*: C.S. Dalton and R.F. Wukasz (eds), Proc. 46<sup>th</sup> Industrial Waste Conference, May 1991, Lafayette, IN. Lewis Publishers, Chelsea, Mi.
- El Mamouni, R., Leduc, R., Costerton, J.W. and Guiot, S.R. 1995. Influence of the microbial content of different precursory nuclei on the anaerobic granulation dynamics. *Wat. Sci. Tech.* 32(8):173-177.
- Fang, H.H.P. 1997. Microbial distribution and syntrophic association in UASB granules, Vol 1 pp.: 83-90. *In*: 8<sup>th</sup> International Conference on Anaerobic Digestion. Sendai. Japón.
- Fang, H.H.P. and Chui, H.K. 1993a. Maximum COD loading capacity in UASB reactors at 37°C. *J. Environ. Eng.* 119: 103-119.
- Fang, H.H.P. and Chui, H.K. 1993b. Microstructural analysis of anaerobic granules. *Biotechnol. Tech.* 7: 407-410.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K. and Li, Y.Y. 1994. Microstructural analysis of anaerobic granules treating different wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 30(12): 87-96.
- Fang, H.H.P., Li, Y.Y. and Chui, H.K. 1995a. Performance and sludge characteristics of UASB process treating propionate-rich wastewater. *Wat. Res.* 29: 895-898.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K. and Li, Y.Y. 1995b. Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Wat. Sci. Tech.* 32(8): 165-172.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K. and Li, Y.Y. 1995c. Microstructural analysis of UASB granules treating brewery wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 31(9): 129-135.
- Forster, C.F. and Quarmby, J. 1995. The physical characteristics of anaerobic granular sludge in relation to their internal architecture. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 103-110.
- Fukusaki, S., Nishio, N. and Nagai, S. 1991a. Chemical composition and kinetic properties of granular methanogenic sludge grown on propionate. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 405-407.

- Fukusaki, S., Chang, Y., Nishio, N. and Nagai, S. 1991b. Characteristics of granular methanogenic sludge grown on lactate in UASB reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 465-472.
- Fukusaki, S., Nishio, N. and Nagai, S. 1995. High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in UASB reactors fed with various defined substrates. *J. Ferment. Bioeng.* 79: 354-359.
- Grotenhuis, J.T.C., Smith, M., Plugge, C.M., Yuansheng, X., van Lammeren, A.A.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. 1991a. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1942-1949.
- Grotenhuis, J.T.C., Smith, M., van Lammeren, A.A.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. 1991b. Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 115-119.
- Grotenhuis, J.T.C., van Lier, J.B., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. 1991c. Effect of ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N-tetraacetic acid (EGTA) on stability and activity of methanogenic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 109-114.
- Grotenhuis, J.T.C., Kissel, J.C., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. 1991d. Role of substrate concentration in particle size distribution of methanogenic granular sludge in UASB reactors. *Wat. Res.* 25: 21-27.
- Guiot, S.R. and van den Berg, L. 1985. Performance of an upflow anaerobic reactor combining a sludge blanket and a filter treating sugar waste. *Biotechnol. Bioeng.* 27:800-806.
- Guiot, S.R., Kennedy, K.J. and van den Berg, L. 1986. Comparison of the upflow anaerobic sludge blanket and sludge bed filter concepts. pp. 533-546. *In*: Proc. of the NVA-EWCPA Conf. on Water Treatment: Anaerobic Treatment, a Grown up Technology. Aquatech 86, 15-19 september, Amsterdam, The Netherlands.
- Guiot, S.R., Gorur, S.S., Bourque, D. and Samson, R. 1988. Metal effect on microbial aggregation during upflow anaerobic sludge bed filter (UBF) reactor start-up, pp. 187-194. *In*: G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds), Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. Pudoc Wageningen, The Netherlands.
- Guiot, S.R., McLeod, F.A. and Paus, A. 1990. Thermodynamical and microbiological evidence of trophic microniches for propionate degradation in a methanogenic sludge bed reactor, pp. 173-183. *In*: Proc. FEMS Symposium N° 54. Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes.
- Guiot, S.R., Paus, A. and Costerton, J.W. 1992a. A structured model of the anaerobic granule consortium. *Wat. Sci. Tech.* 25(7): 1-10.
- Guiot, S.R., Arcand, Y. and Chavarie, C. 1992b. Advantages of fluidization on granule size and activity development in upflow anaerobic sludge bed reactors. *Wat. Sci. Tech.* 26(3/4): 897-906.
- Harada, H., Endo, G., Tohya, Y. and Momonoi, K. 1988. High rate performance and its related characteristics of granulated sludges in UASB reactors treating various wastewaters, pp.1011-1020. *In*: A. Tilche and A. Rozzi (eds). Poster Papers. Proc. Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Monduzzi Editore, Bologna.
- Harmsen, H.J.M. 1996. Detection, phylogeny and population dynamics of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in anaerobic granular sludge. Ph.D.Thesis. Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, A. and Tjihuis, L. 1992. Formation of biofilms in a biofilm air-lift suspension reactor. *Wat. Sci. Tech.* 26(2): 647-654.
- Hickey, R.F., Wu, W., Veiga, M.C. and Jones, R. 1991. Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Wat. Sci. Tech.* 24(8): 207-255.

- Howgrave-Graham, A.R., Wallis, F.M. and Steyn, P.L. 1991. A bacterial population analysis of granular sludge from an anaerobic digester treating a maize-processing waste. *Biores. Technol.* 37: 149-156.
- Hulshoff-Pol, L.W. 1989. The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. Ph.D.Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Hulshoff-Pol, L., de Zeeuw, W.J., Velzeboer, C.T.M. and Lettinga, G. 1983. Granulation in UASB reactor. *Wat. Sci. Tech.* 15(8/9): 291-304.
- Iza, J., García, P.A., Sanz, Y. and Fdz-Polanco, F. 1988. Granulation results in anaerobic fluidized bed reactors, pp. 195-204. In: G. Lettinga, A.I.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular Anaerobic Sludge. Microbiology and Technology. Proc. of GASMAT. Workshop, Lunteren Netherlands.*
- Jahn, A. and Nielsen, P.H. 1995. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Wat. Sci. Tech.* 32(8): 157-164.
- Kennedy, K.J., Sanchez, W.A., Hamoda, M.F. and Droste, R.L. 1991. Performance of anaerobic sludge blanket sequencing batch reactors. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 63: 75-83.
- Koorneef, E., Macario, A.J.L., Grotenhuis, J.T.C. and Conway de Macario, E. 1990. Methanogens revealed immunologically in granules from five UASB bioreactors grown on different substrates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 225-230.
- Kosaric, N., Blaszczyk, R. and Orphan, L. 1990a. Factors influencing formation and maintenance of granules in anaerobic sludge blanket reactors (UASBR). *Wat. Sci. Tech.* 22(9): 275-282.
- Kosaric, N., Blaszczyk, R., Orphan, L., Valladares, J. 1990b. The characteristics of granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Wat. Res.* 24: 1473-1477.
- Lens, P.N.L., De Beer, D., Cronenberg, C.C.H., Houwen, F.P., Ottengraf, S.P.P. and Verstraete, W.H. 1993. Heterogeneous distribution of microbial activity in methanogenic aggregates: pH and glucose microprofiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3803-3815.
- Lens, P.N.L., De Beer, D., Cronenberg, C.C.H., Ottengraf, S.P.P. and Verstraete, W.H. 1995. The use of microsensors to determine population distributions in UASB aggregates. *Wat. Sci. Tech.* 31(1): 273-280.
- Lettinga, G. 1994. Anaerobic treatment of very low strength and cold industrial and domestic sewage, pp. 155-167. In: M. Viñas, M. Soubes, L. Borzacconi, L. Muxi (eds.). *III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay, 25-28 Octubre 1994.*
- Lettinga, G. 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 3-28.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W. and Klapwijk, A. 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 699-734.
- Lettinga, G., Hulshoff-Pol, L.W., Koster, I.W., Wiegant, W.M., de Zeew, W., Rinzema, A., Grin, D.C., Roersma, R.E. and Hobma, S.W. 1984. High rate anaerobic wastewater treatment using the UASB reactor under a wide range of temperature conditions. *Biotechnol. Genet. Energ. Rev.* 2: 253-284.
- Li, Y.Y., Fang, H.H.P., Asce, M., Chen, T. and Chui, H.K. 1995. UASB treatment of wastewater containing concentrated benzoate. *J. Environ. Eng.* 121: 748-751.
- Lin, K. and Yang, Z. 1991. Technical review on the UASB process. *Int. J. Environ. Studies* 39: 203-222.
- Lin, Y-F. and Chen, K-C. 1994. Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system. *Wat. Res.* 29: 35-43.



- Macarie, H. 1996. La digestión anaerobia una tecnología adecuada para el tratamiento de las aguas residuales de algunas industrias químicas y petroquímicas, pp. 313-323. In: O. Rojas y L. Acevedo (eds). IV Seminario Taller Latinoamericano de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Bucaramanga. Colombia.
- Macarie, H., Noyola, A. and Guyot, J.P. 1992. Anaerobic treatment of a petrochemical wastewater from a terephthalic acid plant. *Wat. Sci. Tech.* 25(7): 223-235.
- Macario, A.J.L. and Conway de Macario, E. 1988. Quantitative immunologic analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerable diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 79-86.
- Macario, A.J.L., Visser, F.A., van Lier, J.B. and Conway de Macario, E. 1991. Topography of methanogenic subpopulation in a microbial consortium. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2179-2189.
- Mc Carty, P.L. and Smith, D.P. 1986. Anaerobic wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 20: 1200-1206.
- Mc Inerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B. and Costerton, J.W. 1981. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov. an anaerobic syntrophic fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1029-1039.
- McLeod, F.A., Guiot, S.R. and Costerton, J.W. 1990. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1598-1607.
- Mahoney, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N. and Murray, R.G.E. 1987. The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. *Wat. Sci. Tech.* 19(1/2): 249-260.
- Min, K-S. and Ahn, Y-H. 1997. The effects of hydrogen partial pressure on anaerobic pelletization, pp. 571-578. In: Proc. 8<sup>th</sup> International Conference on Anaerobic Digestion. Sendai, Japan.
- Monroy, O., Meraz, M., Montoya, L., Famá, G. and Macarie, H. 1997. Anaerobic digestion in Mexico. State of the technology, limitations and potential for its development. Vol 2 pp.: 272-284. In: 8<sup>th</sup> International Conference on Anaerobic Digestion. Sendai, Japan.
- Morgan, J.W., Forster, C.F. and Evison, L.M. 1990. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Wat. Res.* 6: 743-750.
- Morgan, J.W., Evison, L.M. and Forster, C.F. 1991b. The internal architecture of anaerobic sludge granules. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 50: 211-226.
- Mulder, R., de Matos, M.J.T. and Neijssel, O.M. 1989. The mechanism of aggregate formation by *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 350-355.
- Ney, U., Macario, A.J.L., Conway de Macario, E., Aivasidis, A., Schoberth, S.M. and Sahn, H. 1990. Quantitative microbiological analysis of bacterial community shifts in a high-rate anaerobic bioreactor treating sulfite evaporator condensate. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2389-2398.
- Novaes, R.F.V., Rech, C.M., Figueiredo, M.G. and Gaj-Levra, L.A. 1988. Bacterial identification of granular sludge from domestic sewage UASB reactor, pp. 61-65. In: A. Tilche and A. Rozzi (eds). Poster Papers. Proc. Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Monduzzi Editore, Bologna.
- Noyola, A. and Moreno, G. 1994. Granule production from raw waste activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 30(12): 339-346.
- Pereboom, J.H.F. 1997. Strength characterization of microbial granules. *Wat. Sci. Tech.* 36(6/7): 141-148.
- Pereboom, J.H.F. 1994. Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC reactors. *Wat. Sci. Tech.* 30(12): 211-221.

- Pereboom, J.H.F. and Vereijken, T.L.F.M. 1994. Methanogenic granule development in full scale Internal Circulation reactors. *Wat. Sci. Tech.* **30**(8): 9-21.
- Prensier, G., Dubourguier, H.C., Thomas, Y., Albagnac, G. and Buison, M.N. 1988. Specific immunological probes for studying the bacterial associations in granules and biofilms, pp. 55-61. *In*: G. Lettinga, A.I.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular Anaerobic Sludge. Microbiology and Technology. Proc. of GASMAT. Workshop, Lunteren Netherlands.*
- Quarmby, J. and Forster, C.F. 1995a. A comparative study of the internal architecture of anaerobic granular sludges. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **63**: 60-68.
- Quarmby, J. and Forster, C.F. 1995b. A comparative study of the structure of thermophilic and mesophilic anaerobic granules. *Enz. Microbiol Technol.* **17**: 493-498.
- Quarmby, J. and Forster, C.F. 1995c. An examination of the structure of UASB granules. *Wat. Res.* **29**: 2449-2454.
- Ramos, J., Obaya, M.C., Valdes, E., Villa, P. and Eng, F. 1994. Granulation of digested sewage sludge in mesophilic UASB reactors treating distillery wastewaters from sugar cane molasses. *Acta Biotechnol.* **14**: 283-292.
- Rinzema, A., van Lier, J. and Lettinga, G. 1988. Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor. *Enz. Microbiol. Technol.* **10**: 24-32.
- Sakiadis, B.C. 1984. Fluid and particles mechanisms, pp. 63-64. *In*: R.H.Perry and D. Green (eds). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, section 5. Mc Graw Hill, México.
- Sam-Soon, P.A.L.N.S., Lowenthal, R.E. and Marais G.V.R. 1987. Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor. *Water SA* **13**: 69-80.
- Schink, B. and Thauer, R.K. 1988. Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation pp 5-17. *In*: G. Lettinga, A.I.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular Anaerobic Sludge. Microbiology and Technology. Proc. of GASMAT. Workshop, Lunteren Netherlands. October 1987.*
- Schmidt, J.E. and Ahring, B.K. 1993. Effects of magnesium on thermophilic acetate degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Enz. Microb. Technol.* **15**: 304-310.
- Schmidt, J.E. and Ahring, B.K. 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 229-246.
- Schmidt, J. E., Macario, A.J.L., Ahring, B.K. and Conway de Macario, E. 1992. Effect of magnesium on methanogenic subpopulations in a thermophilic acetate-degrading granular consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 862-868.
- Shen, C.F. and Guiot, S.R. 1996. Long term impact of dissolved O<sub>2</sub> on the activity of anaerobic granules. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 611-620.
- Shen, C.F., Kosaric, N. and Blaszczyk, R. 1993a. The effect of selected heavy metals (Ni, Co and Fe) on anaerobic granules and their extracellular polymeric substance (ECP). *Wat. Res.* **27**: 25-33.
- Shen, C.F., Kosaric, N. and Blaszczyk, R. 1993b. Properties of anaerobic sludge as affected by yeast extract, cobalt and iron supplements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 132-137.
- Shin, H., Bae, B., Oh, S. 1993. Preservation characteristics of anaerobic granular sludge. *Biotechnol. Lett.* **15**: 537-542.

- Sich, H. and van Rijn, J. 1997. Scanning electron microscopy of biofilm formation in denitrifying, fluidized bed reactors. *Wat. Res.* 31: 733-742.
- Sierra-Alvarez, R., Hulshoff-Pol, L.W. and Lettinga, G. 1988. Start-up of UASB reactor on a carbohydrate substrate, pp. 223-228. In: A. Tilche and A. Rozzi (eds). Poster Papers. Proc. Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Monduzzi Editore, Bologna.
- Speece, R.E. 1994. Trace metals: key role in anaerobic treatment processes, pp. 65-82. In: M. Viñas, M. Soubes, L. Borzacconi, L. Muxi (eds.). III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay, 25-28 Octubre 1994.
- Speece, R.E. 1996. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press. New York, USA.
- Stams, A.J.M., Grotenhuis, J.T.C. and Zehnder, A.J.B. 1989. Structure-function relationship in granular sludge, pp. 440-445. In: T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R. Y. Morita and A. Uchida (eds). Recent Advances in Microbial Ecology, Proc. ISME-5 Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Stewart, P.S., Peyton, B.M., Drury, W.J. and Murga, R. 1993. Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 327-329.
- Ten Brummeler, E., Hulshoff-Pol, L.W., Dolfing, J., Lettinga, G. and Zehnder, A.J.B. 1985. Methanogenesis in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at pH 6 on an acetate-propionate mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1472-1477.
- Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B. and Verstraete, W. 1995a. Different types of sludge granules in UASB reactors treating acidified wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 329-337.
- Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B. and Verstraete, W. 1995b. Granulation and sludge bed stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3681-3686.
- Thiele, J. H., Wu, W. and Jain, M.K. 1990. Ecoengineering high rate anaerobic digestion systems: Analysis of improved syntrophic biomethanation catalysts. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 990-999.
- Tijhuis, L., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M. 1992. Nitrification with biofilms on small suspended particles in air lift reactors. *Wat. Sci. Tech.* 26(8/9): 2207-2211.
- Tilche, A. and Yang, X. 1988. Light and MEB observations on the granular biomass of experimental SBAF and HABR reactors, pp. 170-178. In: G. Lettinga, A.I.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). Granular Anaerobic Sludge. Microbiology and Technology. Proc. of GASMAT. Workshop, Lunteren Netherlands. October 1987.
- Tilche, A. and Vieira, S.M.M. 1991. Discussion report on reactor design of anaerobic filters and sludge bed reactors. *Wat. Sci. Tech.* 24(8): 193-206.
- Tramper, J., van Groenstijn, J.W., Luyben, K.C.A.M. and Hulshoff-Pol, L.W. 1984. Some physical and kinetic properties in granular anaerobic sludge, pp.145-155. In: E.H. Houwink and R.R. van der Meer (eds). Innovations in Biotechnology. Elsevier, Amsterdam.
- Uemura, S. and Harada, H. 1995. Inorganic composition and microbial characteristics of methanogenic granular sludge grown in a thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 358-364.
- Vanderhaegen, B., Ysebaert, E., Favere, K., van Wambeke, M., Peeters, T., Pánic, V., van den Langenbergh and Verstraete, W. 1992. Acidogenesis in relation to in-reactor granule yield. *Wat. Sci. Tech.* 25(7): 21-30.

- van Lier, J.B., Grolle, K.C.F., Stams, A.J.M., Conway de Macario, E. and Lettinga, G. 1992. Start-up of a thermophilic upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor with mesophilic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 130-135.
- van Lier, J.B., Groeneveld, N. and Lettinga, G. 1996. Development of thermophilic methanogenic sludge in compartmentalized upflow reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 50:115-124.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A.J.B. 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1898-1901.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, A.J.B. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* 54: 75-87.
- van Rijn, J., Tal, Y. and Barak, Y. 1996. Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2615-2620.
- Villa Gómez, P.M. y Alvarez, J.R. 1994. Algunos aspectos microbiológicos de un proceso de doble etapa en reactores UASB alimentados con vinazas de destilería. pp. 431-433. *In*: M. Viñas, M. Soubes, L. Borzacconi, L. Muxi (eds.). III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay, 25-28 Octubre 1994.
- Visser, F.A., van Lier, J.B., Macario, A.J.L. and Conway de Macario, E. 1991. Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1728-1734.
- Visser, A., Alphenaar, P.A., Gao, Y. and Lettinga, G. 1993. Granulation and immobilization of methanogenic and sulfate-reducing bacteria in high rate anaerobic reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 575-581.
- Wanner, O. and Reichert, P. 1996. Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 172-184.
- Widdel, F. 1988. Microbiology and Ecology of Sulfate and Sulfur Reducing Bacteria, pp. 469-485. *In*: A.J.B. Zehnder (ed). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Willey and Sons, Inc. New York.
- Wiegant, W.M. 1988. The "spaghetti theory" on anaerobic granular sludge formation or the inevitability of granulation, pp. 146-152. *In*: G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular anaerobic sludge; microbiology and technology*. Pudoc Wageningen, The Netherlands.
- Wiegant, W.M. and de Man, A.W.A. 1986. Granulation of biomass in thermophilic anaerobic sludge blanket reactors treating acidified wastewater. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 718-727.
- Wijbenga, D.J. and Bos, H.T.P. 1988. Physical and biological factors influencing the growth of anaerobic granular sludge, pp. 229-234. *In*: G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular Anaerobic Sludge. Microbiology and Technology*. Proc. of GASMAT. Workshop, Lunteren Netherlands. October 1987.
- Wu, W., Hu, J., Gu, X., Zhao, Y., Zhang, H. and Gu, G. 1987. Cultivation of anaerobic granular sludge in UASB reactors with aerobic granular sludge as seed. *Wat. Res.* 21: 789-799.
- Wu, W.M., Hickey, R.F. and Zeikus, J.G. 1991. Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3438-3449.
- Wu, W., Jain, M., Conway de Macario, E., Thiele, J.H. and Zeikus, J.G. 1992. Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 282-290.
- Wu, W., Thiele, J.H., Jain, M.K., Pankratz, H.S., Hickey, R.F. and Zeikus, J.G. 1993. Comparison of rod versus filament-type methanogenic granules: Microbial population and reactor performance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 795-803.

- Wu, W.M., Jain, M.K., Thiele, J.H. and Zeikus, J.G. 1995. Effect of storage on the performance of methanogenic granules. *Wat. Res.* 29: 1445-1452.
- Yizhang, Z., Yi, T., Hui, Z., Yu, D. and Liwen, L. 1997. Studies on physical and biochemical characters of anaerobic granular sludge, pp 156-160 Vol 3. *In*: Proc 8<sup>th</sup> International Conference on Anaerobic Digestion, Sendai, Japan.
- Yoda, M. and Nishimura, S. 1997. Controlling granular sludge floatation in UASB reactors. *Wat. Sci. Tech.* 36(6/7): 165-173.
- Young, J.C. and Dahab, M.F. 1983. Effect of media design on the performance of fixed-bed anaerobic reactors. *Wat. Sci. Tech.* 15(8/9): 369-383.
- de Zeeuw, W.J. 1988. Granular sludge in UASB reactors, pp. 132-146. *In*: G Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular anaerobic sludge; microbiology and technology*. Pudoc Wageningen, The Netherlands.
- Zoutberg, G.R., Mulder, R., Teixeira de Mattos, M.J. and Neijssel, O.M. 1988. Aggregate-formation in anaerobic gaslift reactors. pp. 34-41. *In*: G Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). *Granular anaerobic sludge; microbiology and technology*. Pudoc Wageningen, The Netherlands.

Capítulo 2:

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 2.1. Métodos analíticos

### 2.1.1 Medición de Proteínas totales

Se han desarrollado numerosos métodos para medir el contenido proteínico de diferentes fuentes (Chang, 1994). Estos métodos incluyen las determinaciones de nitrógeno total (Kjeldahl); enlaces peptídicos (Biuret y Lowry); aminoácidos libres (ninhidrina), por mencionar algunos. Otros utilizan las propiedades físicas de las proteínas, midiendo la absorbancia de UV a 280 nm. Este método físico exige un equipo costoso, es muy especializado y requiere de la proteína purificada. Por otra parte los que miden N-total incluyen en la determinación al N-no proteico, además de que es un método lento, requiere un gran volumen de muestra.

Puesto que en este trabajo se necesita determinar el contenido de proteínas totales en un agua residual, se considera apropiado seleccionar métodos que midan una característica típica de las proteínas como es el enlace peptídico. Por lo tanto, los métodos del Biuret (Robinson and Hodgen, 1940) o con el reactivo de Folin (Lowry y col., 1951) serían los adecuados. Ambos métodos se basan en las interacciones del enlace péptido-cobre. Puesto que el Biuret es poco sensible (requiere de 2-4 mg de proteína) y puede ocurrir opalescencia si hay altos niveles de lípidos o carbohidratos en la muestra, se seleccionó el método de Lowry por ser poco afectado por la turbidez de la muestra y por ser más sensible. Con este método las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico) para dar un complejo azul, debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína. La intensidad del color depende de la presencia de enlaces peptídicos, del número de aminoácidos aromáticos presentes y cambia según la naturaleza de la proteína. El color desarrollado se lee a 750 nm. Altas concentraciones de azúcares reductores, sulfato de amonio y grupos sulfhidrilos, fenoles excepto los nitrofenoles, fosfatos, interfieren con la reacción en diferentes grados.

La principal desventaja de este método es que el color varía con las diferentes proteínas, y podría no ser estrictamente proporcional a la concentración de proteínas. Debido a esto último, existen modificaciones a la técnica original siendo una de ellas la realizada por Hartree (1972),



la cual mejora la linealidad de la respuesta de color con la concentración de proteínas y es la que se utilizó en este trabajo.

#### *Reactivos utilizados*

- 100 ml de NaOH 10 N
- Solución A: 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 1000 ml de NaOH 0.1 N
- Solución B: 1 g  $\text{CuSO}_4$  en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada
- Solución C: 2 g de tartrato de Na y K en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada
- Reactivo mezcla: 1 ml de solución B + 1 ml de solución C + c.s.p. 50 ml de solución A.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1

#### *Técnica:*

A 1 ml de muestra se agregó 1 ml de NaOH 1 N, se agitó y calentó a ebullición 20-30 minutos. Luego a cada tubo frío, se agregaron 5 ml del reactivo mezcla. Se agitó en vortex y se dejó reposar en oscuridad 30 minutos. Se adicionó 1 ml de reactivo de Folin, se agitó en vortex y se dejó reposar 30 minutos en oscuridad. Se efectuó la lectura a 750 nm.

#### *Curva de calibración:*

Para la curva de calibración se utilizó una solución patrón de seroalbúmina bovina (SAB, Sigma) 300 mg/l a partir de la cual se prepararon concentraciones distintas de 0, 60, 120, 180, 240 y 300 mg/l. Las curvas de calibración realizadas dieron un coeficiente de regresión promedio de 0.998, con una dispersión muy baja.

#### **2.1.2 Medición de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4$ ) mediante el método del Electrodo selectivo de amonio (APHA, 1985)**

El electrodo selectivo para amonio posee una membrana hidrofóbica permeable al gas y una combinación de electrodo de pH con una solución de cloruro de amonio interna. El amonio disuelto es convertido a amoníaco cuando se alcanza un valor de pH de 11. A medida que el gas pasa a través de la membrana éste se disuelve en una solución amortiguadora que circunda la

combinación de electrodo de pH. El gas disuelto provoca un cambio en el pH de la solución y el electrodo registra el cambio en mV. El intervalo de detección es de 0.3 hasta 1400 mg/ l de N-amoniaco. Altas concentraciones de iones disueltos afectan la determinación, pero el color y la turbidez no. Las aminas interfieren positivamente. Mercurio y plata forman complejos con el amonio afectando la determinación.

#### *Curva de Calibración:*

A partir de una solución patrón de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de 5 g/l se prepararon estándares de 500, 250, 150, 100, 50, 30 y 10 mg/l. Se grafica el logaritmo de la concentración de amonio versus los mV y se debe obtener una recta. Las curvas de calibración realizadas dieron un coeficiente de regresión promedio de 0.999 y una dispersión al valor medio no significativo.

#### *Técnica*

En el momento de realizar la determinación, y utilizando un matraz aforado, se agregan 0.5 ml de NaOH 10 N a 50 ml de cada muestra. Se trasvasa cada estándar y muestra a un vaso de precipitado y se mezcla en agitador magnético. Con toda precaución, se introduce el electrodo y se leen los mV en un potenciómetro.

### **2.1.3 Medición de Azúcares totales**

Existen numerosas técnicas para la medida de glúcidos y básicamente se las puede dividir en dos grupos: métodos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de estos últimos se encuentran los métodos colorimétricos, los cuales en su mayoría están basados en la reacción de los azúcares reductores con determinados reactivos que producen compuestos coloreados.

Los métodos de medida de hexosas y metilpentosas están basados en la condensación de derivados cromógenos del furfural, formados por la acción de ácidos concentrados sobre los glúcidos neutros, con diversas sustancias que conducen a los cromóforos (Low, 1994). Existen dos métodos que miden azúcares totales, el de la antrona y el fenol sulfúrico. Se utilizaron ambos métodos puesto que, por una parte interesa conocer el contenido total de azúcares, y por la otra, debido a que presentan espectros de absorción a diferentes longitudes de onda.

### 2.1.3.1. Método de la Antrona (Morris, 1948)

Los carbohidratos reaccionan con el 9,10-dihidro-9-oxoantraceno (antrona) en condiciones ácidas para producir un color verdeazulado que se puede leer a 620 nm. Aunque la mayoría de los carbohidratos reaccionan con la antrona, la fuerte reactividad de las hexosas por este reactivo provee un método colorimétrico específico para las mismas. El intervalo de detección es de 0 a 50 mg/l. Pequeñas cantidades de alcohol y la presencia de proteínas interfieren en la reacción. Los lípidos, cloruro de sodio y el tolueno aumentan la coloración. La mayor desventaja que puede presentar este método reside en la temperatura de reacción, la que debe controlarse con mucha precisión para asegurar la reproductibilidad, y su principal ventaja es que no requiere hidrólisis previa de la muestra.

#### *Técnica*

A 2.5 ml de muestra o estándar se agregan 5 ml de antrona (200 mg de antrona Sigma en 100 ml de ácido sulfúrico 12 N) en un tubo sumergido en baño de hielo. La mezcla obtenida se agita en vortex y se lleva a baño de vapor durante 10 minutos. Después de enfriarla en baño de hielo se lee a 625 nm.

#### *Curva de calibración:*

A partir de una solución patrón de glucosa de 5g/l se prepararon estándares de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 mg/l. Las curvas de calibración realizadas dieron un coeficiente de regresión promedio de 0.999. La dispersión al valor promedio de la regresión fue casi nula.

### 2.1.3.2. Método del Fenol Sulfúrico (Dubois y col., 1956)

Este método está basado en la reacción de los carbohidratos con el fenol en presencia de un ácido fuerte. Bajo condiciones fuertemente ácidas, los carbohidratos se deshidratan y forman furfural e hidroxi-metil-furfural, los cuales se condensan con el fenol. La reacción completa resulta en la formación de un complejo de color amarillo-anaranjado que se puede leer a 490 nm (hexosas) y a 480 nm (pentosas). El color producido es permanente. Es útil para determinar

pequeñas cantidades de azúcares y sus metilderivados, oligosacáridos y polisacáridos extraídos con diferentes solventes.

#### *Técnica*

A 2 ml de muestra puesta en un tubo de ensayo, se adiciona 1 ml de la solución de fenol al 5%. Luego de 10-20 segundos se vierte de manera constante, por las paredes del tubo, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se deja reposar 10 minutos, se agita el tubo tapado y se deja enfriar. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 490 nm.

#### *Curva de calibración:*

A partir de una solución patrón de glucosa de 5 g/l se prepararon estándares de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu\text{g}$  / ml. Las curvas de calibración realizadas dieron un coeficiente promedio de regresión de 0.997510 sin desviación significativa.

### **2.1.4 Medición de ácidos grasos volátiles**

Existen métodos volumétricos pero son laboriosos e imprecisos, y miden AGV totales. Se utilizó cromatografía de gas por ser mucho más simple, precisa y porque permite identificar cada uno de los ácidos grasos volátiles.

En la cromatografía de gas una fase móvil (un gas acarreador) y una fase estacionaria (columna de empaque) son usadas para separar compuestos individuales. El gas acarreador puede ser nitrógeno, argón-metano, helio o hidrógeno. La fase estacionaria es un líquido que ha sido adsorbido a un sólido granular inerte, llamado columna de empaque. Existen numerosos detectores disponibles, los más comunes son el de ioinización de llama, de conductividad térmica, de captura de electrones, fotométrico de llama y de fotoionización. En general, para la medición de la mayoría de los compuestos orgánicos se utiliza el primero (Reineccius, 1994).

#### *Técnica:*

La determinación de AGV se realizó con un cromatógrafo Hewlet Packard 5890A, equipado con un detector de ionización de flama y una columna megaboro AT 1000. Las condiciones de

operación fueron: temperatura del inyector, 200°C; del detector 220°C y de la columna, 130°C, flujo del gas acarreador (N<sub>2</sub>) 5 ml/ min; volumen de inyección, 0.2 µl. Las muestras (1ml) fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min en una microcentrífuga Eppendorf. y luego acidificadas (10 µl de HCl al 50%/ ml) antes de analizarlas.

*Curva de calibración:* A partir de una solución patrón de AGV 100 mM (acetato, propionato y butirato), se prepararon estándares mixtos de 1, 5 y 10 mM. Cada estandar se inyectó por triplicado al cromatógrafo. Las áreas obtenidas de acetato, propionato y butirato fueron correlacionadas con las concentraciones y se realizó una regresión lineal para obtener las concentraciones de las muestras a analizar. Las curvas de calibración realizadas dieron un coeficiente de regresión casi de 1 (0.99 ± 0.003).

### 2.1.5 Determinación de DQO (método comercial de Hach)

Esta determinación se utiliza como una medida del contenido de oxígeno que sería necesario para oxidar toda la materia orgánica hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> O, utilizando dicromato de potasio como oxidante.

*Curva de calibración:*

A partir de una solución de lactosa de 1 g/l se prepararon los estándares de 0, 100, 300, 500, 600, 800 y 1000 mg DQO/l. Las curvas de calibración realizadas dieron un coeficiente de regresión de 0.998 sin variaciones significativas al valor promedio.

*Técnica:*

A un vial del equipo comercial de Hach, que contiene 5 ml de reactivo, se le agregan 2.5 ml de muestra. Posteriormente se agita en vortex y se incuba a 150 °C durante 2 horas. Se enfrió a temperatura ambiente y se leyó a 620 nm.

### 2.1.6 Determinación de grasas y aceites (APHA, 1985)

Las grasas y aceites pueden estar presentes en el agua residual como una emulsión de residuos industriales o fuentes similares. El término grasas y aceites comprende una serie de compuestos orgánicos tales como hidrocarburos, ácidos grasos, jabones, ceras y aceites.

La técnica que se utilizó se basa en una extracción con hexano y posterior evaporación del solvente (APHA, 1985). Con esta técnica se determina cuantitativamente un grupo de sustancias con características físicas similares sobre la base de su solubilidad común en un solvente orgánico.

#### *Técnica:*

Se acondiciona un matraz de bola a peso constante (en estufa a 70°C durante una noche, se enfría en desecador y se pesa). Se colectan 250 ml de muestra en un frasco, se transfiere a un embudo de separación de 1000 ml y se acidifica a pH 2 con HCl concentrado. Se lava el frasco donde se colectó la muestra con 30 ml de hexano y se adiciona este lavado al embudo separador. Se agita por 5 ó 10 minutos, dejando que las capas se separen y se drena la capa del solvente hacia un matraz Erlen-Meyer. Si el solvente no se obtiene muy claro añadir 1 g de sulfato de sodio al embudo de separación y drenar lentamente el solvente emulsificado en los cristales. Se realizan dos extracciones más con 30 ml de solvente cada una, enjuagando previamente con el mismo el matraz que contenía la muestra. Destilar el extracto en un rotavapor, sumergiendo el matraz en un baño de agua a 70°C por 15 minutos y haciendo vacío en el recipiente durante 1 minuto, por medio de una bomba. El destilado se recoge en el matraz bola que está a peso constante. El contenido de grasas y aceites se calcula de la siguiente manera:

$$\text{grasas y aceites (mg/l)} = (A-B) \times 1000 / \text{volumen de muestra (ml)}$$

siendo:

A= peso del matraz con residuos después de la destilación (mg)

B= peso del matraz limpio a peso constante (mg)

### 2.1.7 Determinación de Metales Totales (Espectroscopía de Emisión de Plasma)

Se realiza una digestión ácida de la muestra para reducir interferencias por la materia orgánica y para convertir los metales a una forma (usualmente metal libre) que pueda ser determinada mediante espectroscopía de absorción atómica o espectroscopía de emisión de plasma. El ácido nítrico es el más utilizado, aunque algunas muestras pueden requerir además, ácido perclórico o sulfúrico para la digestión completa de las mismas. Debido a que las técnicas comunes de digestión ácida generalmente no conducen a la digestión total, el procedimiento por microondas resulta una alternativa muy adecuada (APHA, 1985).

La espectroscopía de emisión atómica mide la emisión de radiación de átomos excitados mediante el calor u otros métodos (láser o electricidad). En la espectroscopía de emisión de plasma se utiliza como fuente de excitación un plasma el cual es definido como una mezcla gaseosa que contiene concentraciones significativas de cationes y electrones. Las temperaturas en los plasmas son muy altas (6000-8000 °C) permitiendo una atomización muy efectiva. Un espectrómetro de emisión de plasma consiste de una antorcha de tres tubos concéntricos de cuarzo por donde pasa argón. De la muestra es generado un aerosol en un nebulizador y cámara de vaporización y es transportada al interior del plasma a través de un tubo inyector localizado dentro de la antorcha. Debido a que esto conduce a una completa disociación de las moléculas se alcanza una reducción significativa de interferencias químicas. La ionización de un alto porcentaje de átomos produce un espectro de emisión iónico. La luz emitida por el plasma es enfocada hacia la entrada de un monocromador o de un policromador que efectúa la dispersión o barrido en un rango de longitudes de ondas preestablecido. Todo está controlado por computadora.

La principal ventaja es que se pueden determinar concentraciones de elementos múltiples en una muestra con una simple aspiración. Además se pueden analizar compuestos refractarios, es decir compuestos que son estables a altas temperaturas y no pueden ser atomizados con la flama de un espectrómetro de absorción. El límite de detección ha sido definido cualitativamente como la concentración más baja del elemento que puede ser diferenciada del blanco (APHA, 1985).

*Técnica:*

Las muestras se acidificaron a pH 2 con ácido nítrico concentrado y se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta el momento de analizarlas. En primer lugar se realizó la digestión de la muestra utilizando el método por microondas (Horno Floyd-RMS-150; Floyd, Inc. Lake Wylies S.C.) con 60% de potencia (385 Watts) y 12 psi durante 30 minutos. Luego se determinaron Fe, Co, Ni, Na, Ca y K en un emisor de plasma Perkin Elmer Emission Spectrometer Plasma 400 (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, C.T.).

*Curvas de calibración:* Se utilizaron estándares mixtos con las concentraciones siguientes de Fe (0.1 y 5 ppm); Co (0.01 y 0.1 ppm); Ni (0.01 y 0.1 ppm); Na (1 y 20 ppm); K (1 y 20 ppm) y Ca (1 y 20 ppm). Las curvas de calibración realizadas dieron un coeficiente de regresión de 0.96 para el Fe; de 0.99 para el Co, Na y Ca, de 0.81 para el Ni y de 1 para el K, sin variaciones significativas en el valor medio.

## 2.2 Determinación de las propiedades físicas y granulométricas de los lodos

Se determinó el pH, color, concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV), índice volumétrico de lodos, la velocidad máxima de sedimentación ( $V_{max}$ ) y la granulometría, a los seis lodos estudiados. Todos los parámetros mencionados, excepto los dos últimos, fueron determinados como se indica en el Standard Methods (APHA, 1985).

### 2.2.1. SST y SSV:

Estas determinaciones se realizaron a cada fracción de lodo tamizado a través de mallas de diferentes diámetros y luego centrifugadas, como se describe más adelante. Los sólidos suspendidos totales y volátiles se determinaron evaporando y secando la muestra a una temperatura definida, según se indica a continuación:

En una cápsula de porcelana, puesta previamente a peso constante ( $p_1$  en g.) se colocó la muestra y se llevó a evaporación total en la estufa a 105°C, durante 24 hs. Posteriormente se colocaron las cápsulas en el desecador durante 1 hora y se pesaron nuevamente obteniéndose el peso dos ( $p_2$  en g.). Después, se llevaron a la mufla para calcinación a 550°C durante 1 hora,



luego a una estufa a 105 °C 1 hora, se enfriaron en un desecador y se pesaron ( $p_3$  en g.). La cantidad de SST y de SSV se calculan así:

$$\text{SST (g/l)} = p_2 - p_1 / \text{vol. de muestra (l)}.$$

$$\text{SSV (g/l)} = p_2 - p_3 / \text{vol. de muestra (l)}.$$

### 2.2.2. Índice volumétrico de lodo (IVL)

La determinación del IVL se modificó con respecto a lo descrito en APHA (1985) de la siguiente manera: en lugar de 1 litro de lodo y un cono Imhoff se utilizó 25 ml de lodos y una probeta de 250 ml; la probeta fue invertida varias veces y se midió el volumen correspondiente a la interfase lodo-agua con respecto al tiempo, hasta 30 minutos. El volumen ocupado por el lodo después de este tiempo dividido por su contenido en sólidos suspendidos totales fue tomado como IVL. La velocidad máxima de sedimentación (m/h) corresponde a la pendiente (m<sup>3</sup>/h) de los dos primeros puntos de la curva de sedimentación graficada durante la determinación del IVL dividida por la sección de la probeta (m<sup>2</sup>).

### 2.2.3. Granulometría

La granulometría es una medida de la distribución del tamaño de las partículas en una muestra. El método de tamizado utilizado, permite relacionar el peso seco de la porción tamizada con el total de sólidos de la muestra. Esta metodología no está aún bien establecida, si bien ha sido utilizada por algunos autores para separar las fracciones del lodo (Alphenaar, 1994; Pereboom, 1997). En general la distribución de tamaños puede ser determinada en base a dos principios diferentes. Hulshoff Pol (1989) desarrolló un método basado en las velocidades de sedimentación de gránulos de diferentes tamaños. El otro método está basado en el análisis de imágenes, desarrollado por Tramper y col. (1984) y Grotenhuis y col.(1991).

El método gravimétrico que hemos utilizado en este estudio se diferencia del de Hulshoff Pol (1989) en que no está relacionado con la velocidad de sedimentación de cada fracción. Se asemeja al de análisis de imágenes puesto que incluye partículas tan pequeñas como las de diámetro inferior a 0.23 mm, pero se diferencia de éste en que no es posible determinar el

número y volumen de cada partícula. Por otra parte, Duddley y col. (1993) encontraron una muy buena correlación (de 0.99) entre la cuantificación del número de gránulos mediante análisis de imágenes con la determinación del peso seco.

La granulometría se realizó mediante tamizaje de 25 ml de lodo a través de mallas de diferente diámetros (0.23, 0.59, 0.8 y 2 mm). La fracción correspondiente a cada tamiz se recuperó, mediante centrifugación, para determinar sus respectivos SST y SSV. El porcentaje de SST y SSV para cada fracción de cierto diámetro se calculó de la siguiente manera:

Los SST y SSV presentes en los 25 ml de lodo se obtienen sumando los SST y SSV de cada fracción tamizada.

El porcentaje de SST de cada fracción =  $SST (g) \times 100 / \sum SST (g)$

El porcentaje de SSV de cada fracción =  $SSV (g) \times 100 / \sum SSV (g)$

## 2.3 Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

### 2.3.1. Generalidades sobre MEB y la preparación de muestras

Entre todas las técnicas empleadas para estudiar la estructura microbiana de gránulos anaerobios, el MEB es ampliamente utilizado puesto que permite visualizar la organización espacial y la morfología bacteriana. La descripción completa de los microscopios electrónicos y sus principios se encuentran descritos en numerosos textos (Hall, 1966; Hearle, 1972; Goldstein, 1975; Hayat, 1977).

Los microscopios electrónicos utilizan como fuente de iluminación haces de electrones en lugar de rayos de luz. Esta longitud de onda más corta permite aumentar notablemente el poder de resolución (0.2 nm en el microscopio electrónico de transmisión (MET) y de 10 nm en el MEB). Los haces de electrones se enfocan mediante imanes (bobinas magnéticas) que sirven como lentes. La imagen se produce por dispersión diferencial de los electrones desde los constituyentes moleculares de la célula. Debido a que los gases también difunden los electrones, deben estudiarse las muestras biológicas al vacío, además los especímenes deben estar secos porque el vapor de agua podría tener el mismo efecto que cualquier gas.

En el MEB los electrones del cátodo se aceleran por una rejilla y un ánodo. El haz de electrones, demasiado ancho al principio, se reduce por medio de sistemas de lentes magnéticas. Al pasar por el deflector de un sistema embobinado y un sistema final de lentes, el haz ya estrechado y ajustado barre la muestra. Los electrones secundarios emitidos desde la muestra son recogidos por el detector. Se transmiten a un amplificador de video y hacia el tubo de rayos catódicos de TV, cuyo ritmo de barrido está sincronizado con el microscopio. Así, cualquier punto dado sobre la pantalla de TV representa un punto del ejemplar de estudio. La imagen final es realmente una serie de imágenes de diferentes puntos en la muestra, cada uno de 10 nm de diámetro aproximadamente. El MEB suministra representaciones tridimensionales de las estructuras.

En todo estudio microscópico la formación de una imagen con un contraste perceptible exige que diferentes partes de la célula difieran en su transparencia al haz de iluminación (sean rayos de luz o de electrones). En las células vivas aproximadamente el 70% de su peso es agua y son casi completamente transparentes a la luz. Por estos motivos la preparación de cualquier muestra biológica para microscopía electrónica requiere de una serie de etapas consecutivas, siendo algunas de ellas comunes con la preparación para MET y otras exclusivas para MEB. Estas etapas son la fijación, deshidratación y metalización.

La fijación es un proceso, químico o físico, para provocar la muerte, lo más rápidamente posible, de una célula de tal manera que conserven lo mejor posible las características morfológicas y químicas que tuvieron durante su vida. Su principal objetivo es preservar la estructura celular con un mínimo de alteración y proteger el espécimen durante los siguientes tratamientos a que será sometido (deshidratación, coloración y exposición a la corriente de electrones) (Hayat, 1981). Los fijadores más utilizados para microscopía electrónica son el glutaraldehído (GH), para-formaldehído, tetróxido de osmio, ácido pícrico o acroleína.

La deshidratación consiste en reemplazar el agua con un solvente orgánico que puede ser etanol o acetona. Lo importante es evitar que los cambios del solvente dañen o distorsionen las estructuras celulares. Los métodos de deshidratación aplicados a muestras que serán observados

con MEB incluyen una combinación de métodos químicos (reemplazo del agua por un solvente orgánico de baja tensión superficial), con liofilización o punto crítico (Glauert, 1975). La liofilización involucra un congelamiento rápido y una suave pero completa sublimación del hielo (de sólido a gas). Para ello se utilizan aparatos que tienen una unidad de evaporación al vacío con un dispositivo especial de congelamiento de la muestra.

En la deshidratación por punto crítico se utiliza un aparato especial donde se calienta la muestra en un fluido ( $\text{CO}_2$  líquido) por encima de la temperatura y presión críticas permitiendo que la muestra y el fluido pasen por el punto crítico, es decir entren directamente a la fase gaseosa sin que las muestras experimenten cambios en su tensión superficial. Posteriormente las muestras para MEB deben ser cubiertas, sombreadas o metalizadas para proveer una capa conductora eléctricamente, para suprimir cargas superficiales, para minimizar los daños por radiación y para incrementar la emisión de electrones (Goldstein y col., 1975). Existen diversos tipos de aparatos para realizar la deposición de cubiertas conductoras. En los metalizadores más modernos, como los del tipo Sputter Coaters, el metal (Au, Au/Pd ó Pt) es desalojado por iones inertes (argón) y dirigido hacia la muestra. La cámara de metalización es evacuada con una bomba de vacío, el sistema es inundado varias veces con argón y el flujo de argón es controlado como iones que bombardean el metal depositándolo sobre la muestra.

En la tabla 2.1 se resumen algunas de las variantes aplicadas por diversos autores en la preparación de lodo granular para MEB.

Como se puede observar en dicha tabla, todos los autores consultados utilizan como primer fijador el glutaraldehído, variando su concentración (de 2 a 5%), el amortiguador de disolución (fosfato o cacodilato 0.05, 0.1 ó 0.2 M, óxido o anóxico) y los tiempos de aplicación van desde 1 hora hasta toda una noche. Algunos de estos autores realizan una posfijación con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato 0.1 M con períodos que abarcan desde 30 min. hasta 2 hs.

El congelamiento de las muestras se realiza únicamente en el caso de que interese fracturar los gránulos para poder observar la estructura interna de los mismos. Para ello la mayoría de los autores utilizan nitrógeno líquido y en el caso de Alphenaar (1994) utiliza propano líquido.

Tabla 2.1: Síntesis de técnicas de preparación de gránulos para MEB según diversos autores

Fijación	Postfijación	Ruptura	Deshidratación	Metalización	Referencias
GH 2.5 % anaeróbico 12 horas	No	nd	Liofilizadas -90°C	Oro	Bochem y col., 1982
GH 2% en cacodilato 0.025 M. pH 6.8, 3 horas	OsO <sub>4</sub> 1% en cacodilato 0.025 M, 2 hs	nd	*Lavado en agua y Liofilizado -70°C * Serie agua-acetona y liofilización *Punto Crítico	Carbono  Oro	Dolfing y col., 1985
GH 2% en cacodilato 0.025 M. pH 6.8, 1 horas	OsO <sub>4</sub> 1% en cacodilato 0.025 M, 30'	nd	Serie agua-etanol y Punto Crítico	Oro	Grotenhuis y col., 1987
GH 2.5% en cacodilato 0.1 M. 3 horas	OsO <sub>4</sub> 1% , 1 hora	nd	Serie agua-etanol y Punto Crítico	nd	Harada y col, 1988
GH 2.5% en cacodilato 0.2 M. pH 6.8	No	nd	Serie agua-acetona y Punto Crítico	Oro	Goodwin y col. 1990
GH 3%, 1 hora	No	nd	Serie agua-etanol y Punto Crítico	Carbono	Kosaric y col. 1990
GH 5% en cacodilato anaerobio 0.1 M. pH 7.2, 4°C una noche	No	Nitrógeno liquido	Serie agua-etanol y etanol-Freón 113	Oro/Paladio	Mc Leod y col., 1991
GH 4% en fosfato 0.1 M. pH 7.2, 2 horas	No	Nitrógeno liquido	Serie agua-etanol y Punto Crítico	Oro/Paladio	Fang y Chui 1993 b; Fang y col. 1994; Fang y col., 1995
GH 2.5% en cacodilato 0.1 M. 2 horas	OsO <sub>4</sub> 1% , 1 hora	nd	Serie agua-acetona, n-pentilacetato y Punto Crítico	nd	Uemura y Harada 1993; 1995
GH 2.5% en cacodilato 0.2 M. pH 7.1	OsO <sub>4</sub> 1%, 1.5 horas	Propano liquido o en Freezer y ultramicrotomía	Serie agua-etanol y Punto Crítico	Oro/*Paladio	Alphenaar, 1994
GH 5% en cacodilato anaerobio 0.1 M. pH 7.2	No	Nitrógeno liquido	Serie agua-etanol y etanol- triclorofluoroetano	Oro/Paladio	El Mamouni y col. 1995
GH 2.5% en cacodilato 0.2 M. pH 7.3, 4°C una noche	No	nd	Serie agua-etanol y Punto Crítico	Oro	Quarmby y Forster, 1995 a y b

GH: Glutaraldehído; nd: no describe.

Estos autores realizan la deshidratación de sus muestras utilizando series crecientes de etanol/agua o de acetona/agua previo a la liofilización o a la deshidratación por punto crítico. Si bien algunos autores no realizan este paso y directamente deshidratan la muestra por liofilización. El Mamouni y col., (1995) terminan la deshidratación reemplazando el etanol por

triclorofluoroetano, y Mc Leod y col., (1990) lo reemplaza por Freón 113, obviando de esta manera el uso de aparatos especiales. Aunque se debe tener en cuenta que estos compuestos halogenados son muy peligrosos para el operador y muy contaminantes para el medio ambiente, estando prohibidos en algunos países.

### 2.3.2 Metodología de preparación de los lodos para MEB empleada en este estudio

Previo lavado con buffer fosfato anóxico, los lodos fueron fijados en condiciones anaerobias con glutaraldehído 2.8% en cacodilato 0.1M durante 2 hs, lavados con buffer cacodilato 0.1 M pH 7.5, posfijados con tetróxido de Osmio 1 % en cacodilato 0.1 M durante 2 hs. Posteriormente a la fijación se congelaron los gránulos con nitrógeno líquido y se rompieron en dos mitades mediante un golpe con un pilón de mortero. Luego fueron deshidratados con una serie etanol-agua del 30%, 50%, 70%, 90% y 100% 15 minutos en cada una y dos veces en el último paso. Posteriormente se deshidrataron por punto crítico utilizando un SAMDRI-780 A y CO<sub>2</sub>. Todas las muestras deshidratadas fueron posteriormente metalizadas con oro en un Sputter Coater Baltec SCD 050. Esta metodología resulta de una serie de experimentos previos que fueron diseñados para seleccionar el método de deshidratación más conveniente y optimizar los tiempos de fijación. Estas pruebas fueron realizadas tanto en gránulos enteros como criofracturados con nitrógeno líquido, todo lo cual está resumido en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Diferentes tratamientos aplicados a los lodos

Muestra	Fijación	Postfijación	Deshidratación	Metalización
E y C	GH 18 h	OsO <sub>4</sub> 18 hs	Alcohol-Liofilización Alc-CO <sub>2</sub> -Pto. Crítico	Au
E y C	GH 8 hs	OsO <sub>4</sub> 8 hs	Alcohol-Liofilización Alc-CO <sub>2</sub> -Pto. Crítico	Au
E y C	GH 8 hs	No	Alcohol-Liofilización Alc-CO <sub>2</sub> -Pto. Crítico	Au
E y C	GH 2 hs	OsO <sub>4</sub> 2 hs	Alcohol-Liofilización Alc-CO <sub>2</sub> -Pto. Crítico	Au y C/Au

E: enteros; C: criofracturados; GH: glutaraldehído; Alc.: alcohol

## 2.4. Origen de las muestras estudiadas

Los lodos analizados durante este estudio provienen de cinco plantas de tratamiento de aguas residuales, a saber: Imexa, Central de Malta, El Sauz, La Caperucita, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), y fueron muestreados en la parte inferior de los reactores.

### 2.4.1. Descripción de las plantas de tratamiento de aguas residuales

#### 4.1.1 IMEXA

Es una fábrica que produce levaduras para panificación usando melaza como sustrato. Está ubicada en el estado de Puebla. La industria de producción de levaduras genera descargas con un alto contenido de materia orgánica. Los principales efluentes de esta industria consisten en el sobrenadante de cuatro centrifugaciones que se efectúan a la levadura y que presentan diferentes concentraciones de DQO. Estas aguas del proceso de producción (clarificación, separación y lavado, del filtro prensa) llegan a una fosa recolectora y de allí pasan a la planta de tratamiento (Fig. 2.1 A) que consta de:

- \* Tanque de mezclado rápido (Fig. 2.1B)
- \* Dispositivo purificador de olores (Fig. 2.1B)
- \* Reactor UASB de 500 m<sup>3</sup>, no modular, de acero y completamente cubierto (Fig. 2.2 A)

No se efectúa postratamiento aerobio y el agua tratada se somete solamente a cloración y se descarga al río. El biogás producido es quemado y el lodo de purga se almacena en tanques para su posterior uso como inóculo.

#### 2.4.1.2 CENTRAL DE MALTA

Es una fábrica que produce malta para la cervecería Cuauthemoc. Se localiza en el estado de Puebla. El proceso de producción consiste en dos etapas de remojo de la cebada, una a pH 9 y la otra a pH 7, seguidas de una etapa de germinación de los granos y finalmente de una etapa de secado.

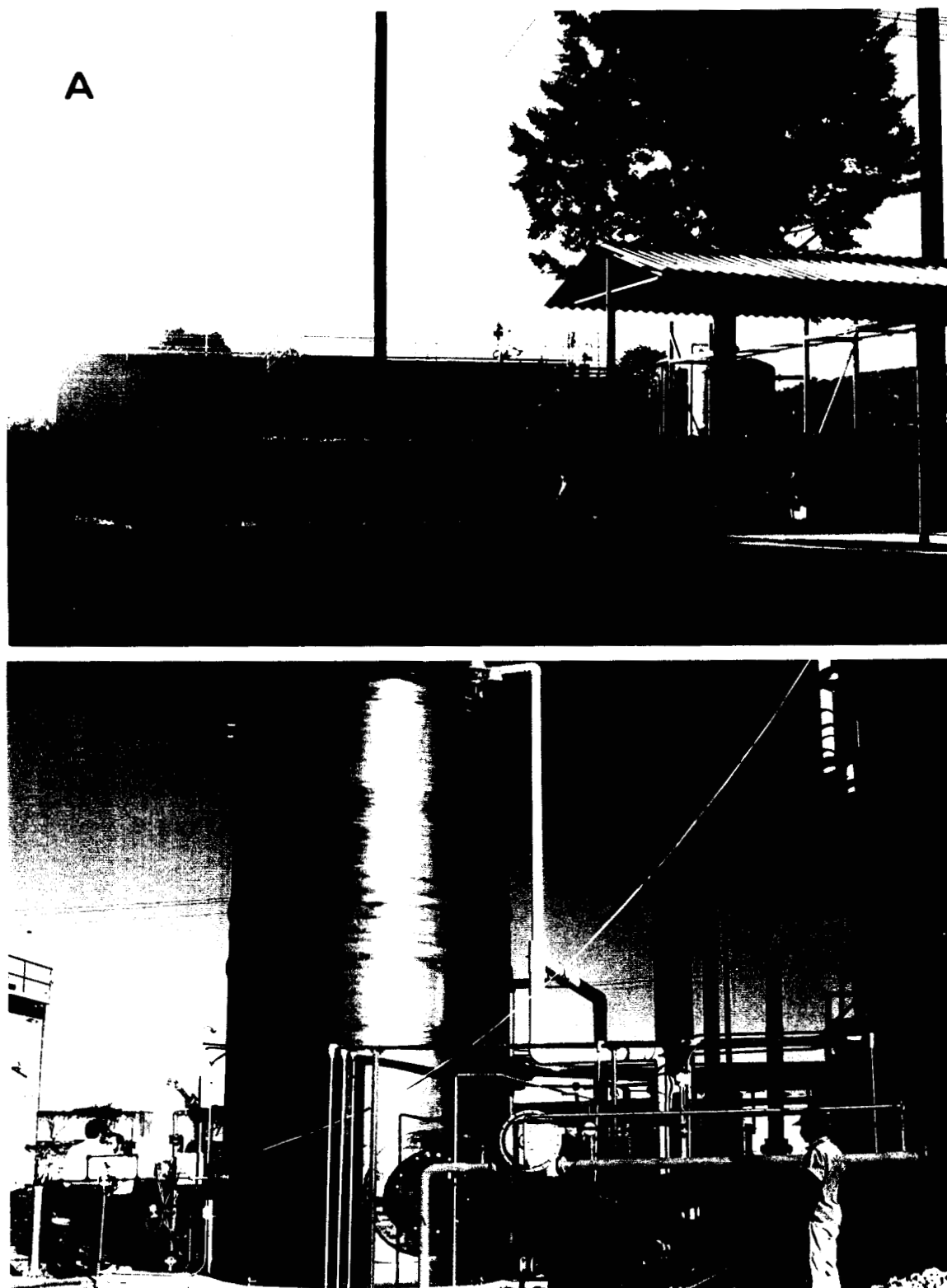


Fig. 2.1: Vista global de la planta de tratamiento de IMEXA (A) y del tanque de mezclado rápido (B). Notar en (B) el dispositivo purificador de olores (↓).



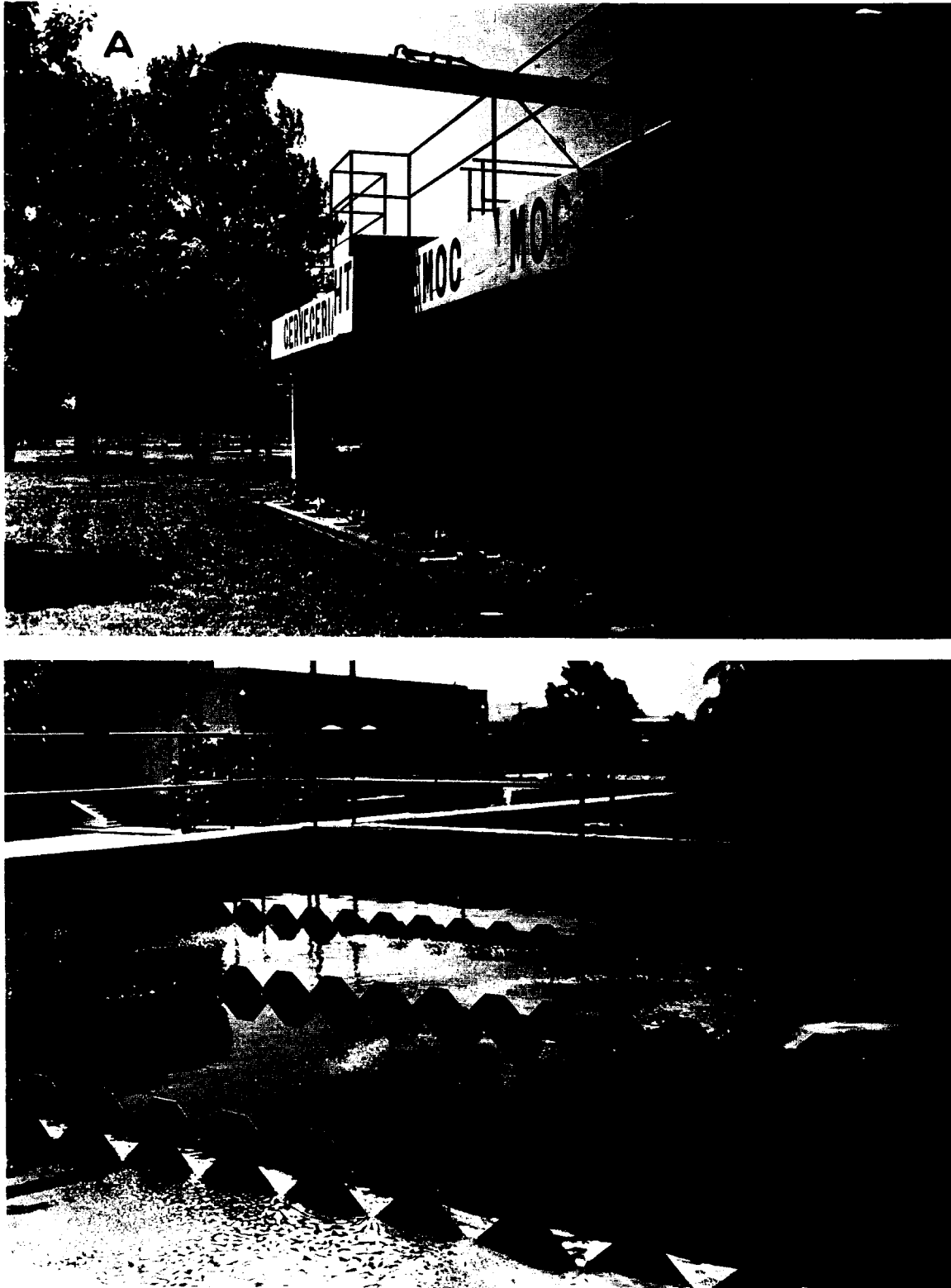


Fig. 2.4: (A) Vista general del reactor UASB de CENTRAL DE MALTA y de su parte superior (B). Notar en (A) el dispositivo de purga de lodos (↓) y en (B) las campanas de recolección de gas que están completamente sumergidas y las canaletas de recolección de agua (↓).

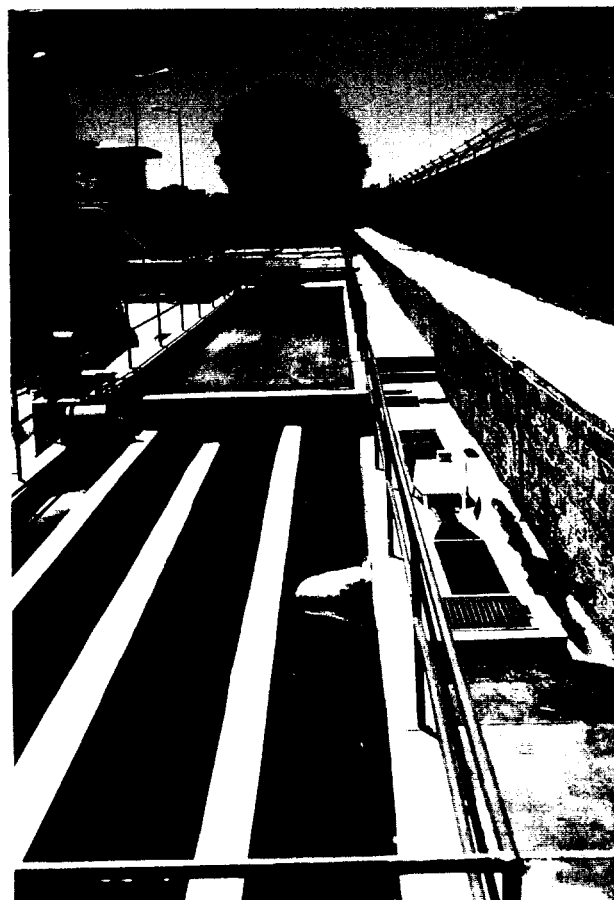


Fig. 2.5: CENTRAL DE MALTA (A) Vista general del postratamiento aerobio con lodos activados y (B) del decantador secundario (↑) y del tanque de cloración (primer plano).

#### 2.4.1.3 EL SAUZ S.A de C.V.

Esta industria elabora 1500 toneladas de productos lácteos al mes, esencialmente quesos y mantequilla. Está ubicada en el estado de Guanajuato.

El proceso de producción consiste en cuajar la leche, cortar la cuajada y separar el suero. Este último es recuperado mediante tuberías exclusivas que van a una tina donde se almacena para después evaporarlo. Alrededor del 10 % de este suero se queda con la cuajada para facilitar el salado y finalmente se descarga al agua residual. Aproximadamente el 70-80% del agua residual proviene del agua de lavado tanto de equipos como de limpieza de planta.

La planta de tratamiento de aguas residuales consta en serie de:

(Para una descripción más detallada ver Monroy y col., 1995)

- \* Sistema de separación de grasas incluyendo un dispositivo mecánico de ruptura de la emulsión seguido de separación por flotación (Fig. 2.6 A y B)

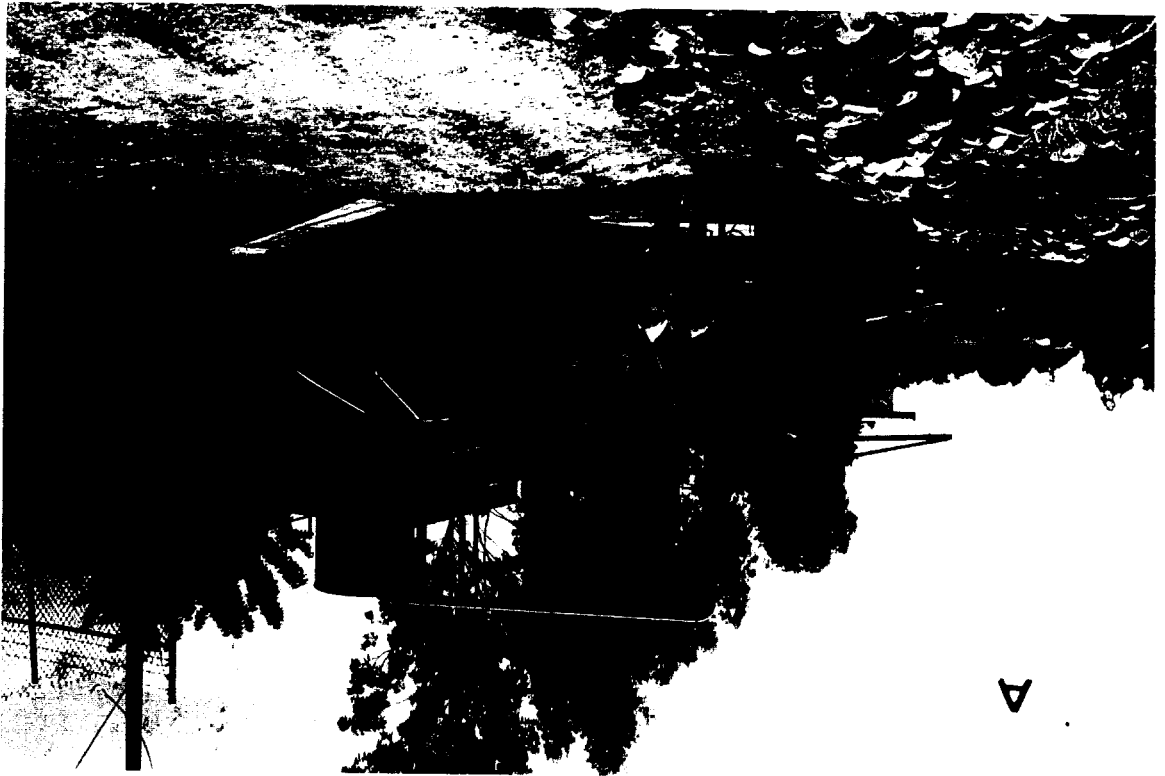
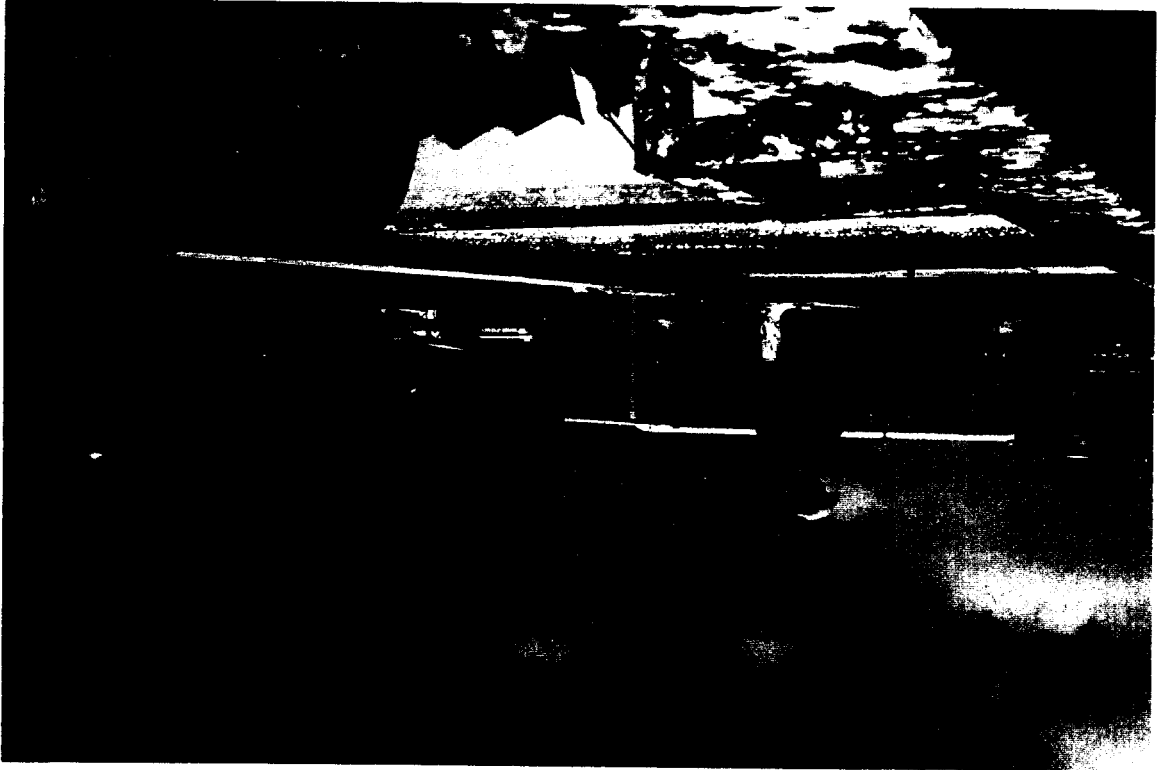
- \* Laguna anaerobia abierta con dispositivo de alimentación tipo UASB, de 4000 m<sup>3</sup>. El diseño se basa en la distribución homogénea del caudal en todo el fondo de la laguna (Fig. 2.7 A).

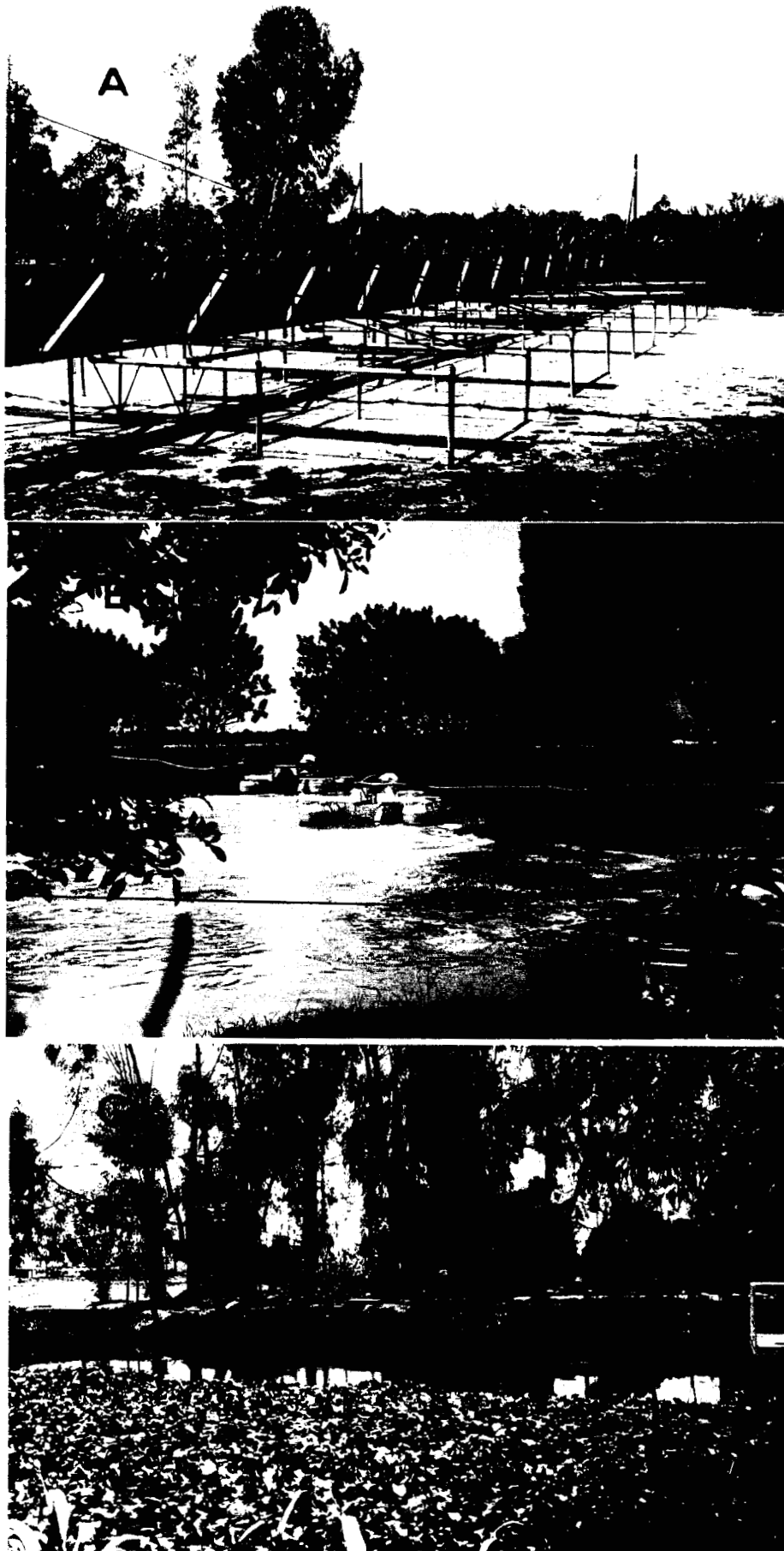
- \* Laguna aerobia del mismo volumen que la anterior y equipada de tres aireadores con una capacidad total de 95 HP (Fig. 2.7 B)

- \* Laguna facultativa, con Lirio acuático, de 2500 m<sup>3</sup>, para eliminar y separar nitrógeno, fósforo y sodio (Fig. 2.7 C).

El agua residual tratada se utiliza para irrigación, mientras que el lodo de la laguna con Lirio acuático es bombeado hacia la laguna anaerobia para su digestión.

Fig. 2.6: (A) Vista general del sistema de separación de grasas de EL SAUZ así como de su parte superior (B).





## 2.4.1.4 La CAPERUCITA

Esta industria también elabora quesos; se encuentra ubicada en Querétaro. Transforma 250,000 a 750,000 litros de leche por semana, produciendo 28-84 toneladas de queso por semana.

Las aguas residuales por día suman 172 m<sup>3</sup> (160 m<sup>3</sup> provienen de las operaciones de limpieza de la planta y 12 m<sup>3</sup>, de los sanitarios y duchas del personal). El proceso de tratamiento de aguas residuales (Fig.2.8) consta de:

(Para una descripción más detallada ver Monroy y col., 1996)

- \* Rejillas
- \* Tanque de homogeneización agitado (Fig. 2.8)
- \* Separación de grasas por flotación con aire disuelto (DAF) (Fig. 2.9)
- \* Cárcamo de mezclado de aguas pretratadas por el DAF y aguas de sanitarios
- \* Dos reactores UASB de concreto de 60 m<sup>3</sup> cada uno (Fig. 2.9 B )
- \* Sedimentador (Fig. 2.9 B)
- \* Filtros de arena (Fig. 2.9 B)

El agua tratada se utiliza para irrigación de un terreno de 5 hectáreas, propiedad de la empresa.

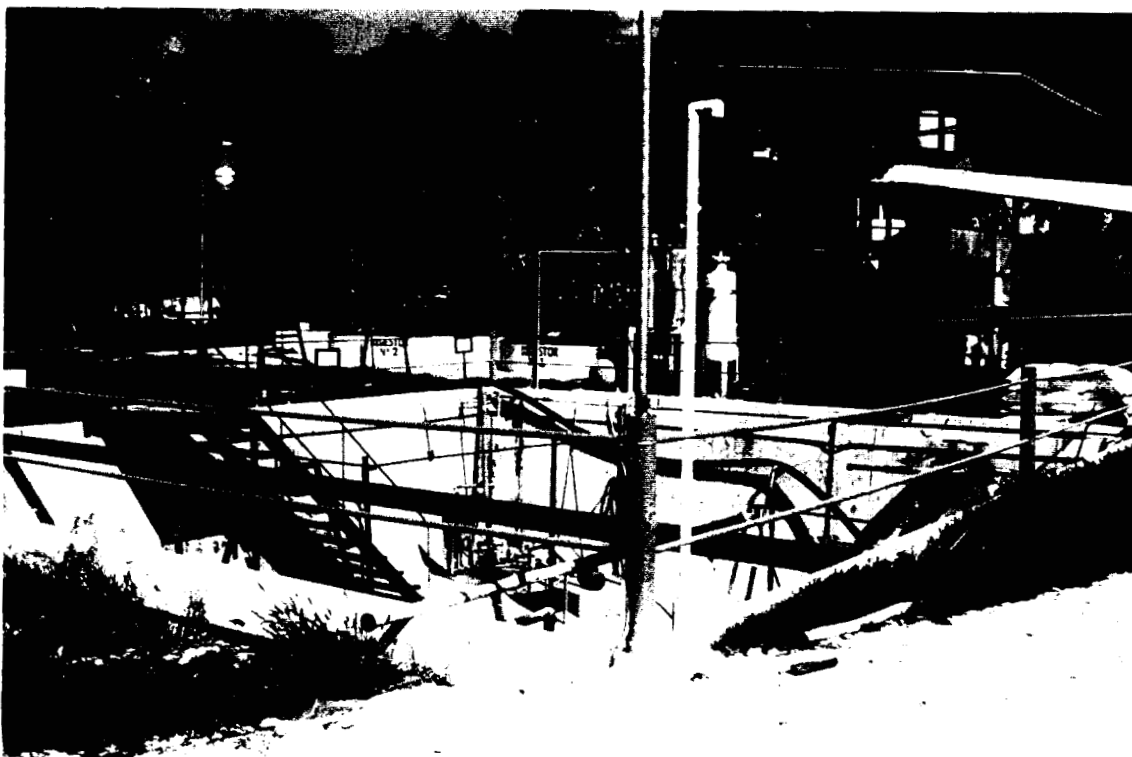


Fig. 2.8: Vista general de la planta de tratamiento de La CAPERUCITA. En el primer plano se distingue el tanque de homogeneización y en el segundo plano, a la derecha, el DAF y a la izquierda los digestores.

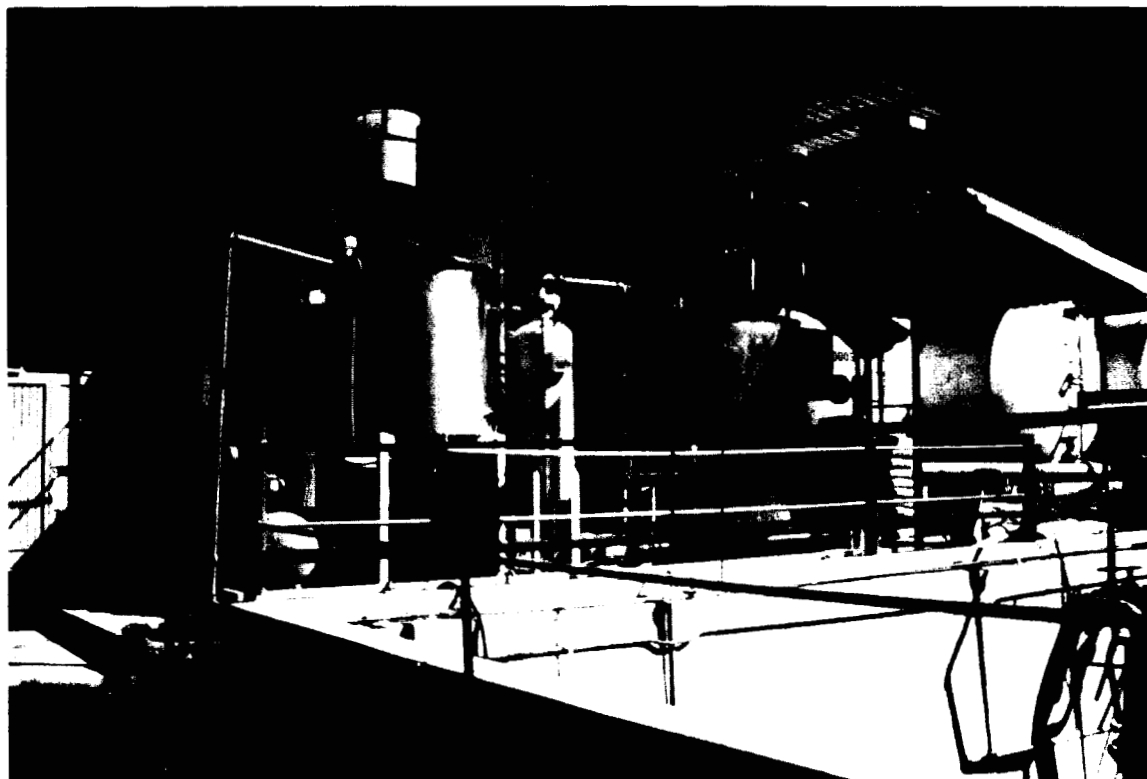


Fig. 2.9: (A) Acercamiento del DAF y de los digestores (B) de La CAPERUCITA

### 2.4.1.5 UAM-I

Esta planta de tratamiento de aguas residuales está ubicada en la Universidad Autónoma Metropolitana en la ciudad de México y trata las aguas residuales provenientes de los laboratorios y de los sanitarios de esta Universidad (Fig. 2.10 A). La planta consta en serie de:

- \* Cárcamo de bombeo
- \* Desarenador y separador de material flotante (Fig. 2.10 B)
- \* Rejilla (Fig. 2.10 B)
- \* Canal Parshall (Fig. 2.10 B)
- \* Reactor UASB de 50 m<sup>3</sup>, de concreto (Figs. 2.10 A y 2.11)

El agua tratada se descarga al drenaje.

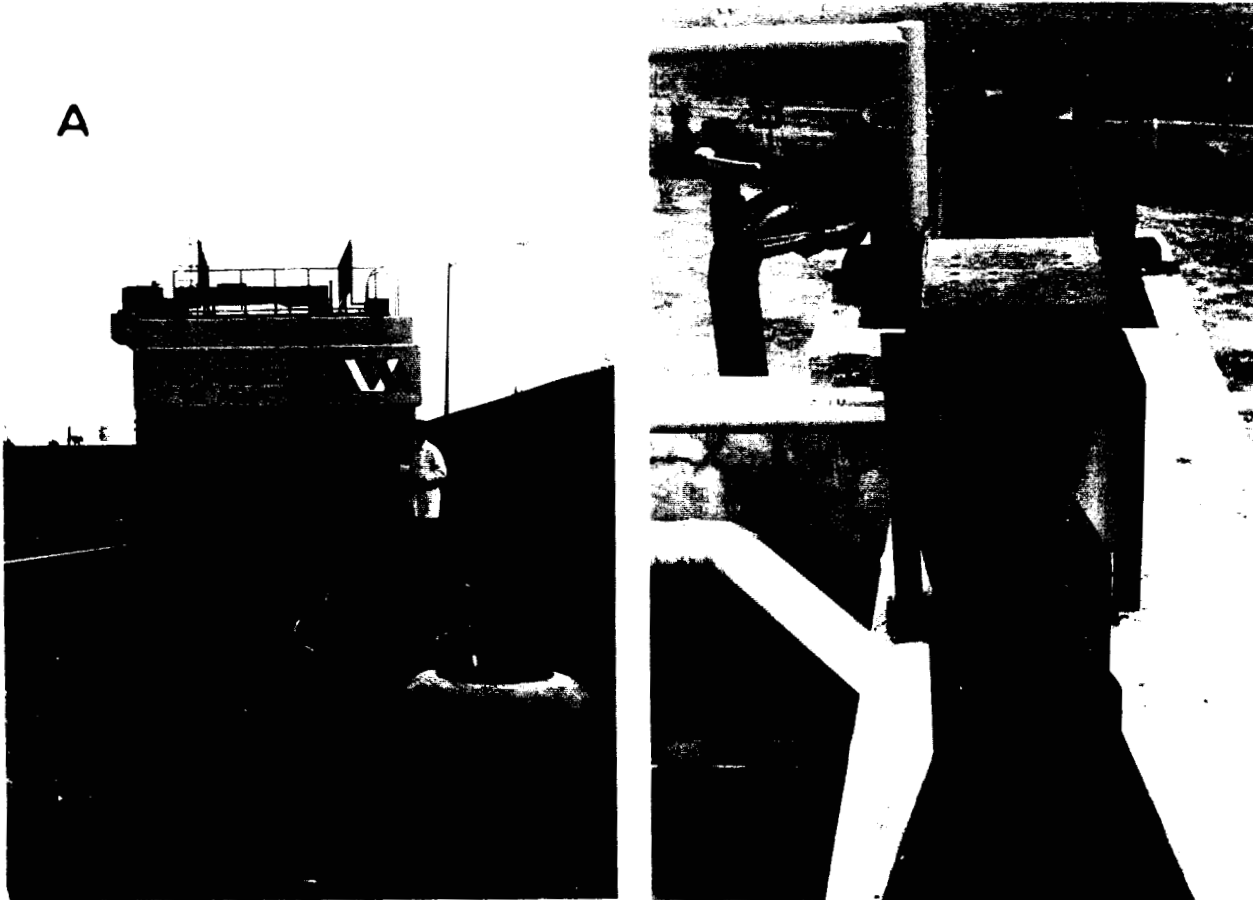


Fig. 2.10: (A) Vista general de la planta de tratamiento de la UAM-I y (B) detalle del desarenador y separador de material flotante, así como de las rejillas y del canal Parshall.





Fig. 2.11: Vista de la parte superior del reactor UASB de la UAM-I con su caja de distribución, tubos de alimentación, campanas de colección del biogás y canaletas recolectoras de las aguas tratadas.

#### 2.4.2. Condiciones de operación de los reactores estudiados

Las principales características de los diferentes digestores estudiados están resumidas en la Tabla 2.4. Todas estas plantas se diferencian, además del tipo de agua que tratan, por la naturaleza del lodo empleado para inocularlas, por el tamaño de los reactores, pero también por sus velocidades ascensionales, los tiempos de retención hidráulica y las cargas aplicadas. Es importante también, hacer resaltar que todos los reactores están en operación desde hace varios años y que por lo tanto se puede considerar que sus camas de lodo están estabilizadas fisiológica y mecánicamente.

En cuanto al diseño, se distingue el caso de El Sauz, puesto que es una laguna anaerobia alimentada como UASB, y los digestores de la Caperucita que no presentan separador gas-sólido-líquido (GSS).

Tabla 2.4.: Principales características de los reactores UASB

Empresas	C. DE MALTA	LA CAPERUCITA		EL SAUZ	IMEXA	UAM-I
Ubicación	Puebla	Querétaro		Cortázar, Gto.	Puebla	México, D.F.
Año de Construcción/ constructor	1990 IMASA	1993 UAM-I		1992 UAM-I	1993 BIOTHANE	1989 Desconta- minación
Tipo de reactor/ volumen (m <sup>3</sup> )	UASB 2400	UASB 2 x 60		Laguna anaerobia alimentada como UASB 4000	UASB 500	UASB 50
Inóculo/ año de arranque	Lodos activados adaptados en anaerobiosis  1991	Lodos anaerobios de la laguna de El Sauz  1993		Lodos de la misma laguna  1992	Lodo granular de papelera y cervecera  1994	Lodos activados  1989
Tipo de Agua residual	Malta	Quesos		Quesos	Levaduras	Urbana
DQO <sub>Tot Infl</sub> (mg/l)	1700	3462		3615	1 18628	305
SST <sub>Infl</sub> (mg/l)	232 <sup>1</sup>	410		1039	2073	247
Temperatura (°C)	20 <sup>1</sup>	26		26	23	23
Caudal (m <sup>3</sup> /día)	2082 <sup>1</sup>	Dig. 1 86.4	Dig. 2 34.56	500	90.48	56
TRH (horas)	20.75 <sup>1</sup>	23.7	47.4	192 (8 días)	132.62 (5.5 días)	21.5
TRC (días)	40	4	12	59.28**	250	234.46**
V <sub>up</sub> (m/h)	0.29	0.11	0.058	0.04	0.23*	0.19
V <sub>gas</sub> (m/h)	0.24	0.088	0.036	0.03	0.37	0.03
B <sub>v</sub> (KgDQO/ m <sup>3</sup> . día)	1.47	4.98	2.49	0.45	3.37	0.34
B <sub>x</sub> (KgDQO/Kg SSV. día)	0.13	3.52	1.31	0.13	0.41*	0.051
Eficiencia DQO <sub>Tot</sub> (%)	83 <sup>1</sup>	38	31	35	75	70

1: Noyola y Kano, 1996; Dig.1: digestor 1; Dig.2: digestor 2; (\*) calculado considerando una recirculación de 5 veces el caudal de entrada; (\*\*) TRS: tiempo de retención de sólidos = [(caudal x SST<sub>ent</sub>) + Kg SSV]/ caudal x SST<sub>sal</sub>; V<sub>up</sub>: velocidad ascensional del líquido = caudal (m<sup>3</sup>/día)/ sección (m<sup>2</sup>); V<sub>gas</sub>: velocidad ascensional del gas = B<sub>v</sub> x Vol. reactor x Eficiencia de remoción x 0.35 / (Sección x 0.6); B<sub>v</sub>: carga volumétrica= caudal x DQO/ Vol. reactor; B<sub>x</sub>: carga másica = DQO x caudal/ cantidad de lodo (Kg SSV); TRC: tiempo de retención celular = (caudal x SSV<sub>ent</sub>) + Kg SSV/ caudal x SSV<sub>sal</sub>

El reactor de Central de Malta presenta muy buena eliminación de la  $DQO_{sol}$ . El porcentaje de metano es de 66.4%, del anhídrido carbónico de 8.5% y el resto se supone nitrógeno (Noyola y Kano, 1996). Debido a que las grandes cervecerías procesan la malta en su propia planta, la mayoría de los antecedentes en la literatura se refieren a aguas residuales de cervecería. Respecto al tratamiento de aguas residuales de maltería, en Latinoamérica además de esta planta sólo se ha reportado de una en Colombia (Ojeda Urbano, 1996).

Los reactores de La Caperucita tratan aguas residuales provenientes de la fabricación de quesos. A pesar de su alta biodegradabilidad los efluentes de estas industrias son problemáticos de tratar anaeróbicamente debido a la falta de alcalinidad, la tendencia a acidificarse rápidamente y la dificultad para obtener buena granulación. Y el caso de La Caperucita no es la excepción, en particular por el hecho de que ambos reactores UASB presentan serios problemas de desgranulación y lavado de sólidos. Sus eficiencias son muy bajas: 31-38% de la  $DQO_{Tot}$ . Debido a que no tienen separador gas-sólido-líquido y a fin de recuperar los sólidos que salen de los digestores, los efluentes de cada uno de ellos pasa por un tanque de sedimentación. Cabe decir que de acuerdo a la información suministrada por la empresa, los digestores estaban operados con diferentes caudales y TRH por algunos períodos, y ambos presentan diferencias en los porcentajes de eliminación de sólidos, el digestor 1 presenta una relativamente más alta eliminación de sólidos totales (13.12%) y de la  $DQO_{Tot}$  (38%) comparado con el digestor 2 que es relativamente más eficiente sólo en la eliminación de SSV (38.17%) en lugar del 10.88% de eliminación de SSV por parte del digestor 1. Por otra parte, aunque el contenido de grasas y aceites del influente es bajo (25 mg/l), se observa que el digestor 1 no elimina grasas y aceites y el digestor 2 lo hace muy pobremente (10.41%).

La laguna anaerobia de El Sauz remueve el 63% de la  $DQO_{sol}$  pero como no tiene separador gas-sólido no es muy eficiente en la eliminación de la  $DQO_{Tot}$  (34.63%) o en retener SST (57%) (Monroy y col., 1995). Pero al final estos sólidos son acarreados junto con los SSV de la laguna anaerobia hacia la laguna de lirio acuático donde sedimentan y periódicamente son devueltos a la laguna anaerobia.

El reactor de IMEXA trata un influente de alta carga orgánica, como lo son las aguas residuales de la industria de las levaduras. Los parámetros operacionales de este reactor se encuentran entre los valores medios publicados para otros reactores que operan en América Latina (Borzacconi y López, 1994). Presenta entre el 65-75% de eliminación de la  $DQO_{Tot}$ , del 69% de la  $DQO_{Sol}$  y el 95% de eliminación de sulfatos, produce entre 545-960  $m^3$  /día de biogas con una composición aproximada de 74% de  $CH_4$ , 24.7 % de  $CO_2$  y 1.3% de  $H_2S$ . Este reactor opera con una recirculación de cinco veces el caudal de entrada, lo que contribuye a una buena expansión del lecho de lodo, pero como la velocidad ascensional del líquido y del gas son bajas, es probable que haya gradientes de concentración a lo largo del reactor, es decir que funciona como un sistema parcialmente mezclado.

El reactor de la UAM-I trata un agua residual con solutos parcialmente solubles (SST/DQO de 0.81) y de muy baja concentración en materia orgánica. Opera con muy bajas velocidades ascensionales de líquido y con un tiempo de retención hidráulica demasiado alto. Estas condiciones sugieren que podría haber un deficiente contacto entre el influente y el lodo debido a un mezclado incompleto. Esto podría traducirse en fenómenos de limitación de sustrato que afecten la calidad del gránulo, sumado al hecho de que existen variaciones muy amplias de la concentración de materia orgánica que ingresa al sistema, lo que podría también afectar el metabolismo de los microorganismos involucrados. El tratamiento de aguas residuales muy diluídas resultan en una baja producción de gas por volumen de influente debido a la baja concentración de DQO, por lo tanto la producción de gas puede no contribuir a un adecuado mezclado. Una pobre expansión del lecho resulta en lodos sedimentados en la parte inferior del reactor y causa un patrón de flujo no ideal, tal como zonas muertas, acanalamiento y depósitos de gas. Las eficiencias de eliminación de la  $DQO_{Tot}$  (70%) alcanzadas en el reactor de la UAM-I están dentro de los valores encontrados por otros autores (Barbosa y Sant'Anna, 1989; Sayed y Fergala, 1995), sin embargo este sistema presenta muy alta eliminación de sólidos (89,31% SST) comparada con el 60-73% que obtuvieron los autores antes mencionados, aunque coincide con el 80,36% de eliminación de SST alcanzado por Conil y col., (1996). Los sólidos suspendidos pueden acumularse en el reactor debido a un mecanismo de atrapamiento de la fracción inerte gruesa en el lecho de lodo resultando en una dilución de la biomasa activa. También la adsorción de la materia coloidal finamente dispersada en la superficie del lodo puede crear una gruesa capa

resultando un obstáculo para el suplemento de sustrato en el biofilm. En consecuencia, puede ocurrir una disminución de la capacidad de carga orgánica debido a la disminución o a la deteriorización completa de la actividad metanogénica del lodo.

**BIBLIOGRAFIA**

- Alphenaar, P.A. 1994. Anaerobic granular sludge: Characterization and factors affecting its functioning, Ph. D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- APHA. 1985. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 16<sup>th</sup> edit. American Public Health Association, Washington D.C.
- Barbosa, R.A. and Sant'Ana, G.L. 1989. Treatment of raw domestic sewage in an UASB reactor. *Wat. Res.* 23 :1483-1490.
- Bochem, H.P., Schoberth, S.M., Sprey, B. and Wengler, P. 1982. Thermophilic biomethanation of acetic acid: morphology and ultrastructure of a granular consortium. *Can. J. Microbiol.* 28: 500-510.
- Borzacconi, L. y López, Y. 1994. Un relevamiento de reactores anaerobios en Latinoamérica, pp. 263-279. In: M. Viñas, M. Soubes, L. Borzacconi, L. Muxi (eds.). III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay, 25-28 Octubre 1994.
- Conil, Ph., Martínez, M. and Zamorano, J.P. 1996. Experiencia práctica sobre el tratamiento anaerobio y control de olores en efluentes de levaduras, pp. 419-428. In: O. Rojas y L. Acevedo (eds). IV Seminario Taller Latinoamericano de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Bucaramanga. Colombia.
- Conil, Ph., Jiménez, M. and del Valle, V. 1996. Tratamiento y aprovechamiento de aguas residuales domésticas con reactores UASB y filtros percoladores en el altiplano de Guatemala, pp. 145-158. In: IV Seminario Taller Latinoamericano de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Bucaramanga, Colombia.
- Chang, S.K.C. 1994. Protein analysis, pp. 207-219. In: Introduction to chemical analysis of food. S.S. Nielsen (de) Jones and Barlett Publishers. London.
- Dolfing, J., Griffioen, A., van Neerven, A.R.W. and Zevenhuizen, L.P.T.M. 1985. Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.* 31: 744-750.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Dudley, B.T., Howgrave-Graham, A.R., Bruton, A.G. and Wallis, F.M. 1993. Image analysis to quantify and measure UASB digester granules. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 279-283.
- El Mamouni, R., Leduc, R., Costerton, J.W. and Guiot, S.R. 1995. Influence of the microbial content of different precursory nuclei on the anaerobic granulation dynamics. *Wat. Sci. Tech.* 32(8):173-177.
- Fang, H.H.P. and Chui, H.K. 1993. Microstructural analysis of anaerobic granules. *Biotechnol. Techniques* 7: 407-410.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K. and Li, Y.Y. 1994. Microstructural analysis of anaerobic granules treating different wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 30(12): 87-96.
- Fang, H.H.P., Li, Y.Y. and Chui, H.K. 1995. Performance and sludge characteristics of UASB process treating propionate-rich wastewater. *Wat. Res.* 29: 895-898.
- Glauert, A.M. 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: Practical methods in Electron Microscopy. A.M. Glauert (de). North Holland. American Elsevier, Amsterdam.
- Goldstein, J.I., Yakowitz, H., Newbury, D.E., Lifshin, E., Colby, J.W. and Coleman, J.R. 1975. Practical Scanning Electron Microscopy. Plenum Press, New York.

- Goodwin, J.A.S., Wase, D.A.J. and Forster, C.F. 1990. Effects of nutrient limitation in upflow sludge blanket reactor. *Enz. Microbiol. Technol.* 12: 877-884.
- Grotenhuis, J.T.C., Koorneef, E. and Plugge, C.M. 1987. Immobilization of anaerobic bacteria in methanogenic aggregates, pp. 42-47. *In*: G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds), *Granular anaerobic sludge; microbiology and technology*. Pudoc Wageningen, The Netherlands.
- Grotenhuis, J.T.C., Kissel, J.C., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. 1991. Role of substrate concentration in particle size distribution of methanogenic granular sludge in UASB reactors. *Wat. Res.* 25: 21-27.
- Hall, C.E. 1966. *Introduction to Electron Microscopy*. 2<sup>nd</sup> edit. Mc Graw Hill, New York.
- Harada, H., Endo, G., Tohya, Y. and Momonoi, K. 1988. High rate performance and its related characteristics of granulated sludges in UASB reactors treating various wastewaters, pp.1011-1020. *In*: A. Tilche and A. Rozzi (eds). *Poster Papers, Proc. Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion*. Monduzzi Editore, Bologna.
- Hartree, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- Hayat, M.A. 1977. *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological applications*. van Nostrand Reinhold, New York.
- Hayat, M.A. 1981. *Fixation for electron microscopy*, pp. 1-473. Academic Press, Inc. New York.
- Hearle, J.W.S., Sparrow, J.T. and Cross, P.M. 1972. *The use of the Scanning Electron Microscopy*. Pergamon, Oxford.
- Hulshoff-Pol, L.W. 1989. *The phenomenon of granulation of anaerobic sludge*. Ph. D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Kosaric, N., Blaszyk, R., Orphan, L., Valladares, J. 1990. The characteristics of granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Wat. Res.* 24:1473-1477.
- Low, N.H. 1994. Carbohydrate Analysis, pp. 137-167. *In*: *Introduction to chemical analysis of food*. S.S. Nielsen (ed). Jones and Barlett Publishers. London.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- McLeod, F.A., Guiot, S.R. and Costerton, J.W. 1990. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1598-1607.
- Monroy, O., Vázquez, E.F., Derramadero, J.C. and Guyot, J.P. 1995. Anaerobic-Aerobic treatment of cheese wastewater with national technology in Mexico: The case of "El Sauz". *Wat. Sci. Tech.* 32(12): 149-156.
- Monroy, O., Famá, G., Laguna, A., Prensier, S. et Macarie, H. 1996. Pulvérisation de boues granulaires traitant des eaux usées de fromagerie, 6 pp. *In*: *Journées Industrielles sur la Digestion Anaérobie JIDA-96*. Narbonne, Francia.
- Morris, D.L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107: 254-255.
- Noyola, A. and Kano, A. 1996. Experiencia en 3 años de operación de una planta de tratamiento anaerobia para aguas residuales industriales, 8 pp. *En*: *Memorias del X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, A.C. Toluca, México, Febrero 14-16, 1996.

- Ojeda Urbano, E.O. 1996. Tratamiento anaerobio de aguas residuales de Bavaria S.A. pp. 293-301. *In:* O. Rojas y L. Acevedo (eds). IV Seminario Taller Latinoamericano de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Bucaramanga. Colombia.
- Pereboom, J.H.F. 1997. Strength characterization of microbial granules. *Wat. Sci. Tech.* 36:(6/7): 141-148.
- Quarmby, J. and Forster, C.F. 1995a. A comparative study of the internal architecture of anaerobic granular sludges. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 63: 60-68.
- Quarmby, J. and Forster, C.F. 1995b. A comparative study of the structure of thermophilic and mesophilic anaerobic granules. *Enz. Microbiol Technol.* 17: 493-498.
- Reineccius, G.A. 1994. Gas chromatography, pp. 439-456. *In:* Introduction to Chemical Analysis of Food. S.S. Nielsen (ed) Jones and Barlett Publishers. London.
- Robinson, H.W. and Hodgen, C.G. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein. I. A study of the conditions necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *J. Biol. Chem.* 135: 707-725.
- Sayed, S.K.I and Fergala, M.A.A. 1995. Two stage UASB concept for treatment of domestic sewage including sludge stabilization process. *Wat. Sci. Tech.* 32(11): 55-63.
- Tramper, J., van Groenstijn, J.W., Luyben, K.C.A.M. and Hulshoff-Pol, L.W. 1984. Some physical and kinetic properties in granular anaerobic sludge, pp.145-155. *In:* E.H. Houwink and R.R. van der Meer (eds). Innovations in Biotechnology. Elsevier, Amsterdam.
- Uemura, S. and Harada, H. 1993. Microbial characteristics of methanogenic sludge consortia developed in thermophilic UASB reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 654-660.
- Uemura, S. and Harada, H. 1995. Inorganic composition and microbial characteristics of methanogenic granular sludge grown in a thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 358-364.





Capítulo 3:

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Características físico-químicas de los influentes analizados

En la Tabla 3.1 se sintetizan los resultados de las mediciones efectuadas a los influentes (aguas residuales de entrada a los reactores) de las diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales. Cabe decir que estos valores corresponden a un lote determinado (el del día del muestreo de los lodos) por lo tanto el valor indicado puede variar respecto de otros días.

Tabla 3.1 Características físico-químicas de los influentes

Parámetros	C. de Malta	El Sauz	Caperucita	Imexa	UAM-I
pH	6.4	7.14	6.5	6	8
Color	pardo	amarillento	amarillento	café-rojizo	pardo claro
Aspecto	turbio	turbio	turbio	turbio	liger. turbio
DQO (mg/l)	1700	3615	3462	17994	305
SST (mg/l)	170	1039	410	2073	247
N-NH <sub>4</sub> (mg/l)	10.36	14	29	95.3	19
Proteínas totales (mg/l)	217.5	186.5	160.16	2412	75
Azúcares totales (mg/l)	35.40	29.16	21.71	502	13.60
AGV Totales (mg/l)	575.6	231.46	364.4	618.42	< 0.222*
Acetato (mg/l)	501.6	99	240	189	< 0.060*
Propionato (mg/l)	74	132.46	100.64	199.8	< 0.074*
Butirato (mg/l)	< 0.088	< 0.0 88	23.76	229.82	< 0.088*
Grasas y Aceites (mg/l)	27	519	25.4	36	20
Metales Totales (ppm)					
Fe		65	89	57.49	4.77
Co		0.05	0.07	0.05	0.01
Ni	nd	< 0.03*	2.5	< 0.03*	< 0.03*
Ca		26.85	24.17	153	0.34
Na		153.48	341.14	23.58	1.78
K		28.81	39.81	319	1.36
DQO/ N	100/ 2.66	100/ 1.21	100/ 1.58	100/ 2.7	100/ 10.16

< ld\*: menor al límite de detección; nd: no determinado.

Las aguas residuales estudiadas cubren un gran rango de concentración orgánica, desde las muy concentradas hasta las muy diluídas. Se distinguen también por la naturaleza soluble o insoluble de sus contaminantes, así como por su composición orgánica e inorgánica.

Las aguas residuales de Imexa, con casi 18000 mg de DQO/ l son las más concentradas de todas, y, a pesar de tener más de 2 g de SST/ l se pueden considerar solubles, dado que su relación SST/DQO es apenas de 0.11. Sólo el 29% de la DQO<sub>Tot</sub> pudo ser identificada, siendo las proteínas su principal componente (21% de la DQO) seguido por los AGV (5.12%) y los azúcares (2.97%), en cuanto a las grasas y aceites están en concentración despreciable. El alto contenido proteico da una relación DQO/ N-total de 100/2.7, indicando un exceso de nitrógeno. Respecto a los AGV, tanto el acetato como el propionato y el butirato se encontraron en concentraciones similares. Sin embargo, la concentración total de AGV determinada en la planta de tratamiento, usando el método de titulación, fue muy diferente a la obtenida en estos análisis (59.37 meq/ l, equivalente a 3562.2 mg de acetato/ l, es decir, PM del acetato x N° meq/l).

Cabe mencionar también que las aguas residuales de Imexa contienen una concentración de sulfatos de 639 mg/l (dato proporcionado por la empresa) lo que da una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 28.16. Esta relación indica que el tratamiento anaerobio puede proceder sin inhibición de la metanogénesis, y que los sulfatos deberán ser reducidos de manera eficiente hasta H<sub>2</sub>S en el reactor (Speece, 1996). Además de los compuestos orgánicos identificados, se sabe que las aguas residuales de la producción de levaduras contienen entre otras moléculas, etanol y productos de Maillard (Viñas y col., 1994). Estos últimos son los responsables del color marrón de estas aguas residuales.

Las reacciones de Maillard son un grupo complejo de reacciones químicas que traen consigo la producción de melanoidinas que van desde el amarillo claro hasta el café oscuro; para que se lleven a cabo se requiere de un azúcar reductor (cetosa o aldosa) y un grupo amino libre proveniente de un aminoácido o de una proteína. En la síntesis de melanoidinas influyen marcadamente algunas moléculas como el furfural, hidroximetilfurfural, osulosas, desoxiosulosas, aldehídos, pirazinas, imidazoles, cetonas y reductonas. La estructura química de las melanoidinas es muy compleja, los estudios espectrofotométricos han demostrado la presencia de muchos dobles enlaces de aminoácidos y de distintos grupos heterocíclicos. La mayoría de ellas tienen su máxima absorción a 420-490 nm y pueden ser cuantificadas a esas longitudes de ondas. Sólo las de bajo peso molecular son solubles en agua (Badui Dergal, 1994). Los compuestos de Maillard junto con otras moléculas presentes en este tipo de aguas

residuales corresponden a una fracción no biodegradable, la cual puede representar hasta el 35% de la  $DQO_{Sol}$  (Viñas y col., 1994).

Comparado con los efluentes de la producción de levaduras ya caracterizados en la literatura, el agua de Imexa aparece como moderadamente concentrada, su contenido en AGV y sulfatos están entre los más bajos registrados (van den Merwe y Britz, 1993; Viñas y col., 1994; Ciftci y Oztürk, 1995). Las características previamente descritas indican que la etapa limitante en la biodegradación anaerobia de los influentes de Imexa podría ser la hidrólisis de las proteínas. Aunque, teniendo en cuenta que sólo se identificó la composición del 29% de la DQO y, como se dijo anteriormente, estas aguas residuales pueden contener etanol, la etapa limitante también podría estar en la degradación sintrófica del etanol.

Las aguas de “El Sauz” y de “La Caperucita”, presentan las características típicas de las aguas residuales de quesería, es decir, una concentración intermedia de DQO (aprox. 3500 mg/l), una relación  $DQO/N_{Tot}$  cercana al valor teórico de 100/ 1.4 (Lettinga, 1980), una alta concentración de sodio y calcio, aún si éstos se encontraron por debajo de lo usualmente reportado (Na: 585 - 1000 mg/l; Ca: 40 a 700 mg/l; Samson y col., 1984; Bough y col., 1987; Carozzi, 1993). Ambos influentes tienen similares contenidos de proteínas, azúcares y AGV, si bien todos ellos están en muy pequeñas concentraciones y representan como máximo el 20% de la  $DQO_{Tot}$ .

Considerando el origen de estas aguas residuales, la DQO no identificada podría corresponder en gran parte a lactato, formado por fermentación de la lactosa. Entre las principales diferencias se puede notar que el influente de “El Sauz” es parcialmente soluble (SST/DQO de 0.29), con pH alcalino y un alto contenido de grasas y aceites, mientras que el de “La Caperucita” es soluble (SST/DQO de 0.12), con pH ligeramente ácido y una concentración despreciable de grasas y aceites. La naturaleza de los AGV, varía también de un agua a otra, siendo mayoritario el propionato en el caso de “El Sauz” y el acetato en el de “La Caperucita”. La diferencia entre la concentración de grasas y aceites de las dos fábricas se debe a los diferentes pretratamientos empleados para eliminarlas. El proceso mecánico (desmulsificación con rocas, flotación con difusores de aire y baffles para separación de las grasas por gravedad) implementado en “El Sauz”, es efectivamente mucho menos eficiente que el DAF (Flotación por Aire Disuelto) utilizado en “La Caperucita”, el cual logra eliminar hasta el 97% de las grasas presentes en el agua residual (Monroy y col., 1995,1996). Una concentración de grasas superior a 100 mg/l es

reportada como tóxica para las bacterias metanogénicas, debido a que el ácido oleico, principal derivado de la hidrólisis de las grasas de la leche, produce efectos inhibitorios en la actividad metabólica de estos microorganismos (Perle y col., 1995).

Las características de ambos influentes indican que la etapa limitante en la biodegradación anaerobia del influente de “El Sauz” podría ser la hidrólisis de la materia orgánica particulada y de las proteínas. Si bien este influente presenta altas concentraciones de grasas y aceites, éstas se acumulan en la parte superior de la laguna anaerobia (Monroy y col., 1995) y como no existen evidencias que demuestren que hay degradación de las grasas y aceites en la laguna anaerobia, sólo se considera que es la fracción soluble la que se degrada (proteínas, AGV). Aunque no se descarta algún posible efecto de la presencia de estos compuestos. En el caso de La Caperucita, la etapa limitante sería la hidrólisis de las proteínas.

Comparado con las tres aguas residuales anteriores, el agua de “Central de Malta” presenta una baja concentración de DQO, lo cual era de esperar dado que proviene solamente del remojo, de la germinación y del transporte en húmedo de la cebada. El agua que llega al digestor es esencialmente soluble (SST/DQO de 0.1) puesto que las cáscaras de la cebada son eliminadas a la entrada de la planta de tratamiento por medio de rejillas (ver descripción de la planta en material y método). Alrededor del 64% de la  $DQO_{Tot}$  pudo ser identificada y corresponde mayoritariamente a los AGV (38% de la  $DQO_{Tot}$ ) entre los cuales predomina el acetato (31%) y las proteínas (23.5%). El agua contiene también pequeñas cantidades de azúcares (2%) y de grasas y aceites. Cabe resaltar que, proporcionalmente a la DQO, el agua de “Central de Malta” tiene el contenido más alto de AGV comparado con los otros influentes. Esto resulta, probablemente, de la presencia del tanque de homogeneización, el cual permite alcanzar un cierto grado de preacidificación y en contraparte una baja concentración de azúcares. La relación  $DQO/N_{Tot}$  (100/2.65) indica un exceso de nitrógeno el cual proviene en su mayor parte de las proteínas.

De lo anteriormente expuesto, se observa que estas aguas residuales contienen en su mayoría compuestos que son fácilmente biodegradables en anaerobiosis. Por lo tanto, la etapa limitante en la degradación de las mismas probablemente sea la hidrólisis de las proteínas. Aunque, teniendo en cuenta que este influente presenta altas concentraciones de acetato y que el reactor tiene una alta eficiencia en la eliminación de la DQO soluble, es probable que la etapa limitante

se encuentre a nivel de la metanogénesis acetotrófica. Comparado con los datos de la literatura, estas aguas parecen ser típicas de las de Maltería y se diferencian de las de Cervecería esencialmente por la ausencia de etanol (Wu y col., 1991; Ojeda Urbano, 1996).

Al contrario de Imexa, el influente de la UAM-I, es el más diluido de todos, siendo clasificado inclusive entre las aguas residuales urbanas del tipo débil (Metcalf y Eddy, 1991). Se caracteriza también por la mayor relación SST/DQO (0.81) lo cual indica que es parcialmente soluble. Del 43% de la DQO identificada, 38% corresponden a proteínas y 4.75% a los azúcares. No se detectaron AGV. La proporción de proteínas, que es la más elevada de todas las aguas estudiadas, está dentro de los valores usuales para este tipo de influente, mientras que la proporción de azúcares está muy por debajo de los 25-50% de la DQO que debería representar (Metcalf y Eddy, 1991). Esa alta proporción de proteínas se traduce en una relación  $DQO/N_{Tot}$  (100/10) muy elevada. Todas estas características indican que la etapa limitante en la degradación anaerobia de este tipo de agua, será, probablemente, la hidrólisis de la materia orgánica particulada y de las proteínas.

En síntesis, se puede decir que todas las aguas residuales estudiadas son complejas dado que contienen proteínas, AGV, azúcares y grasas y aceites. En particular, el agua de “Central de Malta” presenta principalmente AGV y proteínas, la de “El Sauz”, grasas y aceites, y la de la UAM-I, proteínas, siendo despreciables los azúcares en cada una de ellas. El agua de “Imexa”, a pesar de tener un fuerte carácter proteico, sería la más completa dado que sus concentraciones en AGV y azúcares son elevadas. El agua residual de “La Caperucita” es difícil de clasificar, puesto que la mayoría de su  $DQO_{Tot}$  parece ser debida a otra clase de compuesto.

Considerando ahora la composición inorgánica de los diferentes influentes, se puede apreciar que varía mucho de uno a otro. El agua de la UAM-I es, por ejemplo, muy pobre en metales comparada con todas las demás. De manera general, el Fe y Co se encuentran dentro de los valores adecuados para el crecimiento de las bacterias metanogénicas (Speece, 1996). El Ni no pudo ser detectado excepto en el caso de “La Caperucita”. En cuanto a los cationes como el  $Na^+$  y el  $K^+$ , éstos se encuentran por debajo de los valores considerados como tóxicos (4600 mg Na/l y 3510 mg K/l, Kugelman y Chin, 1971) y el  $Ca^{++}$  está por debajo de las concentraciones adecuadas para la granulación (80-100 mg/l) excepto para el influente de “Imexa” (Mahoney y col., 1987; Grotenhuis y col., 1991b; Hulshoff Pol, 1989; El Mamouni y col., 1995).



### 3.2 Propiedades físicas y granulométricas de los lodos

#### 3.2.1 Caracterización física

En la Tabla 3.2 se sintetizan los resultados de la caracterización física de los lodos:

Tabla 3.2: Propiedades de los lodos de las diferentes empresas

Determinaciones	Central de Malta	El Sauz	Caperucita		Imexa	UAM-I
			Dig. 1	Dig. 2		
Color	Marrón	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro
pH	7.8	7	7.1	7.5	7.3	7.1
SST (g/l)	58.7	42	51.2	68	108.9	56
SSV (g/l)	40.51	19.39	27.16	29.28	88.24	18.46
SSV/SST (g. g <sup>-1</sup> )	0.69	0.46	0.53	0.43	0.81	0.33
IVL (ml/g SST)	17.11	28.67	27.20	29.76	9.22	17.90
Vmax (m/h)	14	7.5	nm	nm	2	3.18

SSV: sólidos suspendidos volátiles; SST: sólidos suspendidos totales; IVL: índice volumétrico de lodos; Vmax: velocidad máxima de sedimentación; nm: no medible; dig.: digestor.

El contenido de SSV de un lodo se utiliza como indicador del contenido de biomasa presente en el lodo. Los lodos de Central de Malta e Imexa son los más concentrados y más orgánicos puesto que presentan la mayor concentración de SSV (41 y 88 g/l, respectivamente) y su relación SSV/SST es alta (0.69 y 0.81 respectivamente). Ambos presentan un buen grado de compactación con un IVL inferior a 20 ml/g. El aparente mejor IVL del lodo de Imexa, probablemente viene del hecho de que su concentración en SST es casi dos veces superior al del lodo de Central de Malta. Esto no se traduce en una mejor sedimentabilidad como lo muestra una Vmax de solamente 2 m/h en contraste con 14 m/h para Central de Malta.

El lodo menos concentrado en biomasa y el más mineralizado es el de la UAM-I con el más bajo contenido en SSV (18.46 g/l) y la menor relación SSV/SST (0.33). Presenta buena compactabilidad con un IVL de 17.90 ml/g y una baja velocidad de sedimentación (3.18 m/h) lo que podría deberse al hecho de que la mayoría de sus gránulos son pequeños (ver Fig. 3.1) (Hulshoff Pol, 1989). El hecho de que estos lodos sean los más mineralizados concuerda con el

pH alcalino del influente, lo cual hace que la solubilidad de los metales sea menor y precipiten los mismos. Cabe notar que los lodos más orgánicos son los alimentados con influentes ácidos (Imexa, Central de Malta) y los más mineralizados con aguas alcalinas (UAM-I, El Sauz).

Los lodos de El Sauz y La Caperucita tienen características similares, con contenido orgánico relativamente bajo, así como también su relación SSV/SST, y una compactabilidad pobre con un IVL entre 27 y 30 ml/g. Cabe aclarar que en los lodos de La Caperucita el IVL corresponde sólo a la fracción granulada ( $D > 0.23$  mm 66.26% de los SSV en el digestor 1 y 60.89% en el digestor 2) puesto que existe una fracción floculenta ( $D < 0.23$  mm) que representa el 33.72% de los SSV en el digestor 1 y el 39.11% en el digestor 2, la cual no sedimenta e impide la medición de la velocidad máxima.

Respecto a las relaciones SSV/SST encontradas en estos lodos, concuerdan con lo observado por Ramírez y col. (1996) de que los lodos provenientes de sistemas anaerobios que tratan aguas residuales domésticas presentan una relación SSV/SST baja (del orden de 0.40) mientras que los lodos originados en el tratamiento de aguas residuales industriales muestran una relación mayor (del orden de 0.6-0.8).

### 3.2.2 Granulometría

La granulometría es una medida de la distribución del tamaño de las partículas en una muestra. El método utilizado permite relacionar el peso seco de la porción tamizada con el total de sólidos de la muestra, según se observa en las Figuras 3.1 y 3.2. Además permite calcular la relación SSV/SST para cada fracción tamizada (Fig. 3.3)

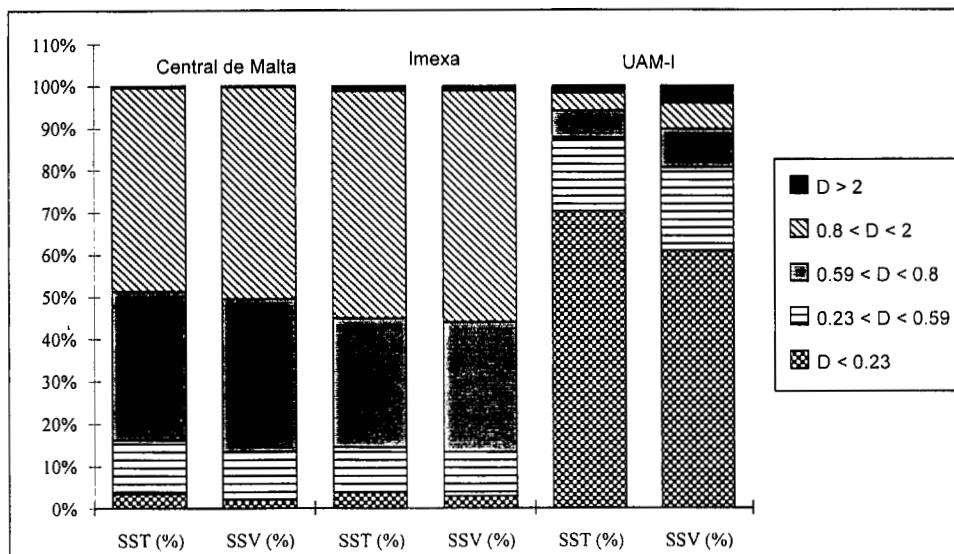


Fig. 3.1: Contenido de SST y SSV de las diferentes fracciones tamizadas de los lodos

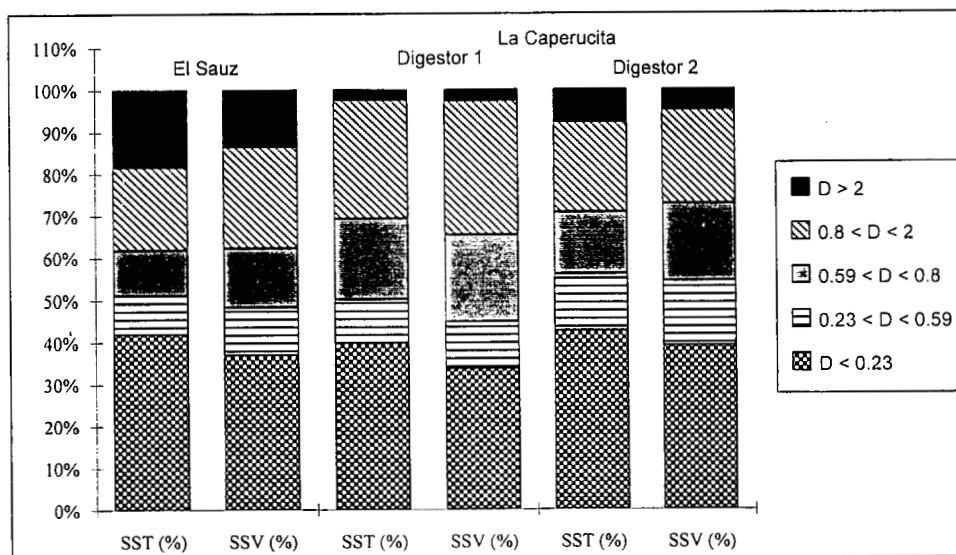


Fig.: 3.2 Contenido de SST y SSV de las diferentes fracciones tamizadas de los lodos

Como se puede observar, en los lodos de Central de Malta e Imexa, la mayor concentración de biomasa medida como SSV corresponde a los gránulos con diámetro superior a 0.6 mm (86.5, 86.7% de SSV, respectivamente), y ambos lodos presentan una distribución de tamaños bastante equilibrada puesto que aproximadamente el 50% de los SSV se encuentran en gránulos con diámetros superiores a 0.8 mm. Por otra parte, a pesar de que estos dos son los lodos más granulares, ambos presentan muy pocos gránulos con diámetro superior a 2 mm estando estos

últimos más representados en los lodos menos granulares particularmente de El Sauz, y también de La Caperucita y UAM-I. En los lodos de El Sauz y de los digestores 1 y 2 de La Caperucita, el porcentaje de SSV está proporcionalmente distribuido tanto en las fracciones mayores como en las menores a 0.6 mm. En cambio, en el lodo de la UAM-I el mayor porcentaje de SSV (80.55%) corresponde a los gránulos más pequeños ( $D < 0.6$  mm).

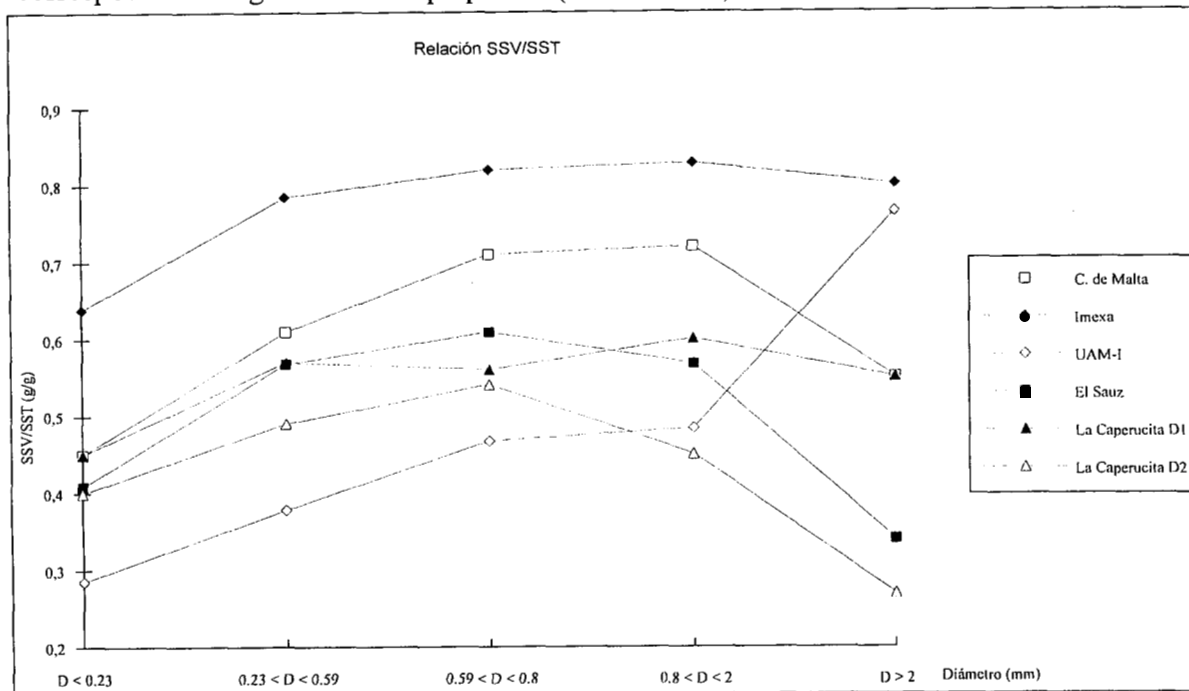


Fig 3.3: Relación SSV/SST de las diferentes fracciones tamizadas de los lodos

En cuanto a la relación SSV/SST (Fig. 3.3), ésta aumenta en casi todos los lodos a medida que el tamaño del gránulo se incrementa, lo que indica un menor grado de mineralización en los gránulos de mayor tamaño. En la fracción de diámetro superior a 2 mm ( $D > 2$  mm) se observan algunas inconsistencias, puesto que en la mayoría de los lodos la relación SSV/SST de esta fracción disminuye marcadamente con respecto a la fracción anterior (Central de Malta, digestor 2 de La Caperucita y El Sauz) mientras que en el lodo de la UAM-I esta relación aumenta notablemente en esta fracción. Estas inconsistencias pueden deberse en algunos casos al método de medición empleado, particularmente cuando la fracción de lodo está pobremente representada (como en Imexa y Central de Malta). Pero en los casos donde esta fracción de  $D > 2$  mm está bien representada (digestor 2 de La Caperucita y El Sauz) esta disminución en la relación SSV/SST posiblemente estaría indicando la existencia de algún fenómeno (por ej.: fuerzas de abrasión, autólisis) que provoca la disminución de la materia orgánica presente en estos gránulos.

### 3.3 Observaciones con MEB

#### 3.3.1 Comparación de los diferentes tratamiento aplicados a los lodos

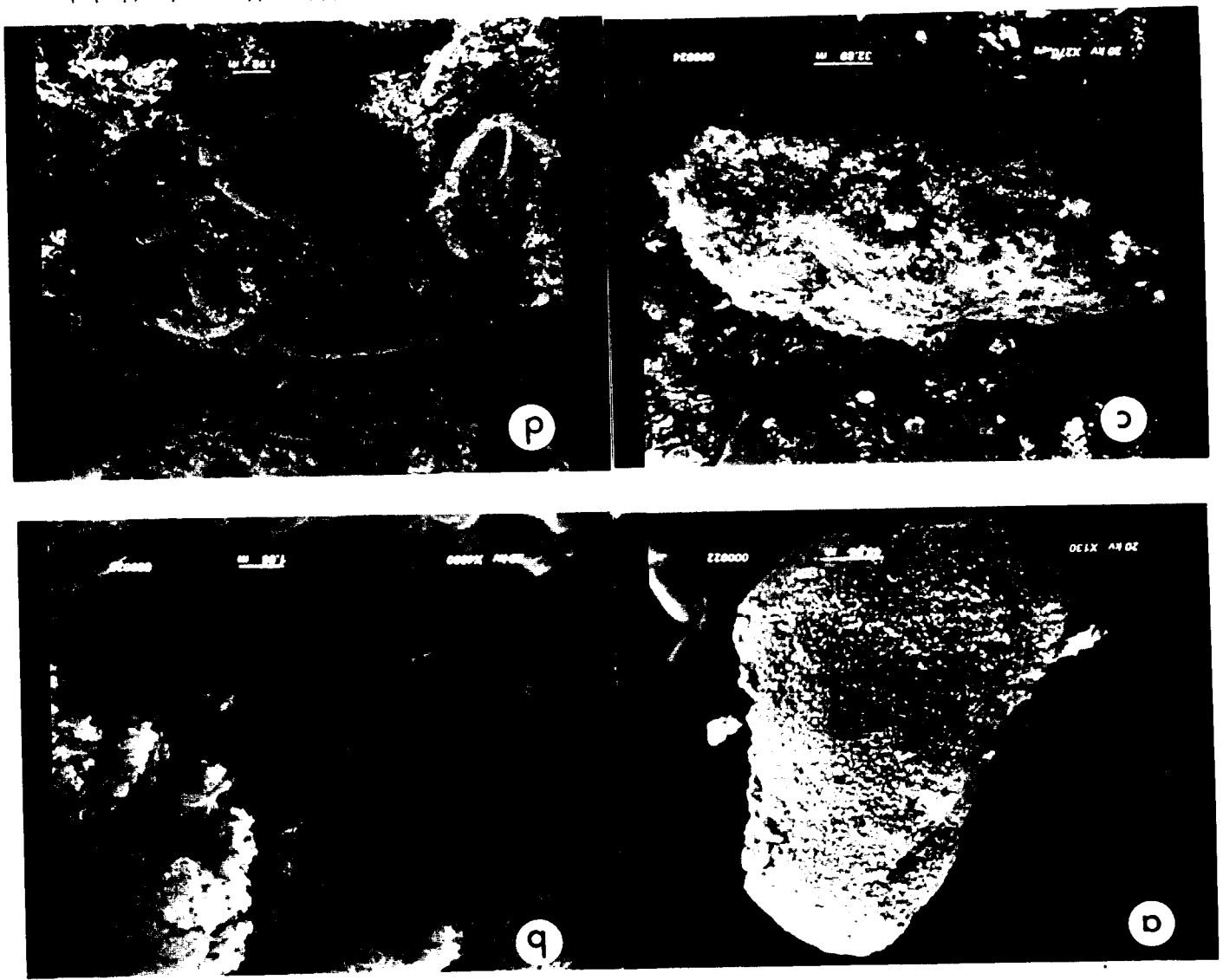
Debido a la amplia variedad de condiciones existentes para la preparación de gránulos anaerobios para MEB (Tabla 2.1, pág 57) y con el fin de encontrar las condiciones más adecuadas para los lodos estudiados en este trabajo, se realizaron diferentes modos de fijación, variando la naturaleza y tiempo de aplicación de los fijadores (glutaraldehído, Os O<sub>4</sub>) y se deshidrataron con dos métodos diferentes (ver Material y Métodos Tabla 2.2, pág. 58). Los resultados de estos tratamientos pueden verse en las Figuras 3.4 -3.7.

En nuestro caso, cuando comparamos los dos métodos de deshidratación (liofilización y punto crítico) con un mismo tiempo (18 hs) y modo de fijación se aprecia que en las muestras deshidratadas por liofilización (Fig 3.4 a-b; Fig. 3.5 a-b) resulta difícil o casi imposible visualizar los microorganismos puesto que el grado de compactación de las SEP lo impide. En cambio la deshidratación por punto crítico permite visualizar fácilmente la morfología bacteriana (Fig 3.4 d y 3.5 d). Estos resultados concuerdan con los de Dolfing y col. (1985) y Anderson y col. (1991). El motivo de esto puede deberse a que el punto crítico es un método más agresivo que la liofilización, puesto que se lleva a cabo a una presión de 72.85 bar y temperatura de 31°C (es decir, el punto crítico del CO<sub>2</sub>), en cambio la liofilización se realiza a muy bajas temperaturas (< -50°C) y en vacío, susceptible de conservar mejor las estructuras.

Cuando se disminuyó el tiempo de fijación (de 36 hs a 4 hs) se logró la mejor visualización de los microorganismos tanto en muestras deshidratadas por liofilización (Fig. 3.7 b) como aquellas por punto crítico, como se puede ver en las Figuras 3.5-3.6. Por lo tanto podemos inferir que el tiempo de fijación influye en el grado de compactación de las SEP e indicaría que la fijación prolongada (36hs) aumenta el grado de condensación de las SEP.

En resumen, si bien los tiempos de fijación largos (36 hs) y cortos (4hs) resultan en una buena conservación general de la integridad del gránulo (Figs. 3.4 a, 3.5 a y 3.6 a) a mayores aumentos una fijación prolongada se traduce en una compactación excesiva de las SEP (Figs. 3.4 b y 3.5 b) hecho que no se observa cuando el tiempo de fijación es corto.

FIG 3.4. La Caperucita, gránulos enteros. Comparación de los dos métodos de deshidratación. a y b Alcohol-Liofilización. c y d Alcohol-CO<sub>2</sub>-Punto Crítico. Todos fijados con Glutaraldehído 18 hs y Os<sub>4</sub> 18 hs.



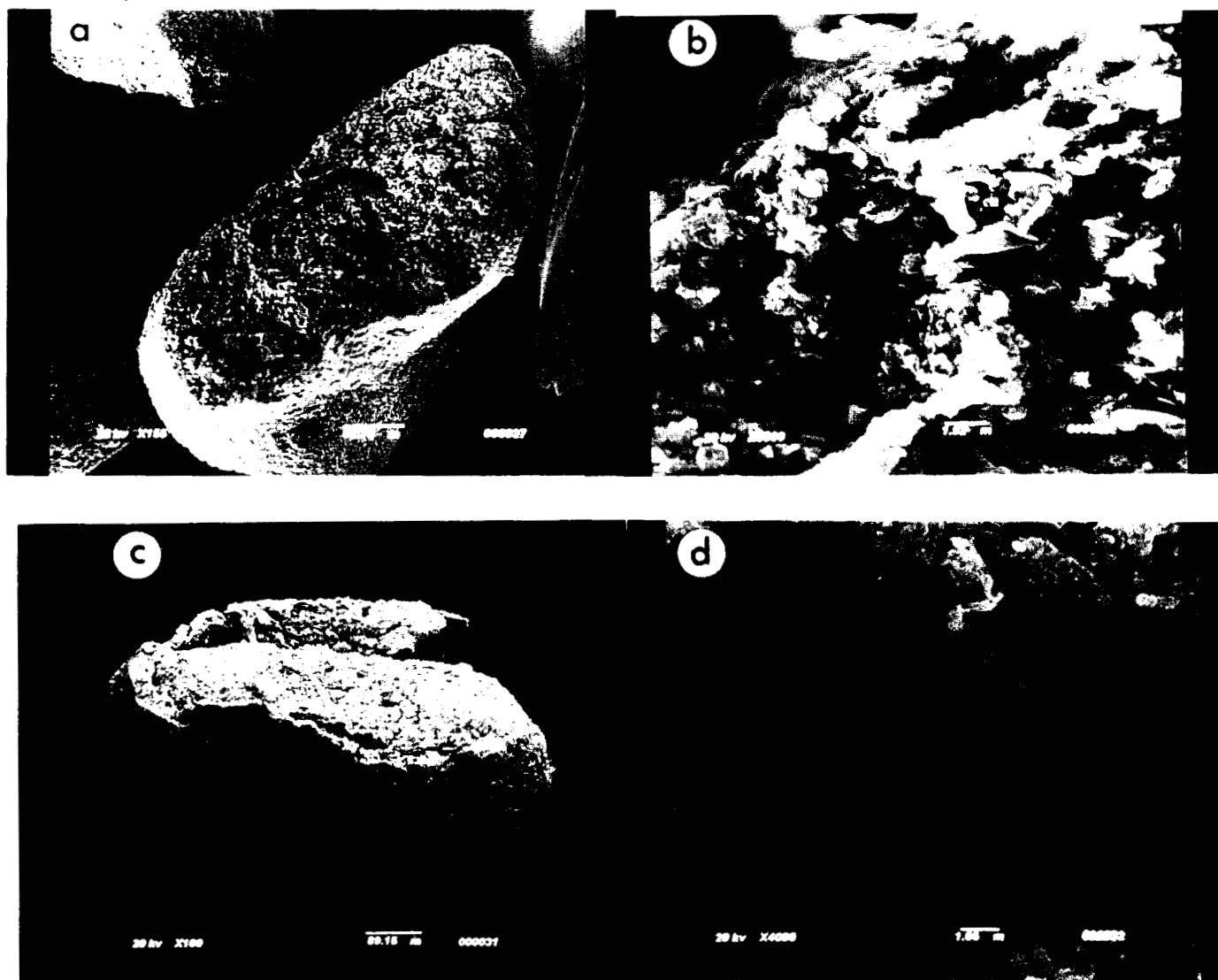


FIG 3.5. C. de Malta, gránulos criofracturados. Comparación de los dos métodos de deshidratación. a y b Alcohol-Liofilización . c y d. Alcohol-CO<sub>2</sub>-Punto Crítico. Todos fijados con Glutaraldehído 18 hs y Os O<sub>4</sub> 18 hs.

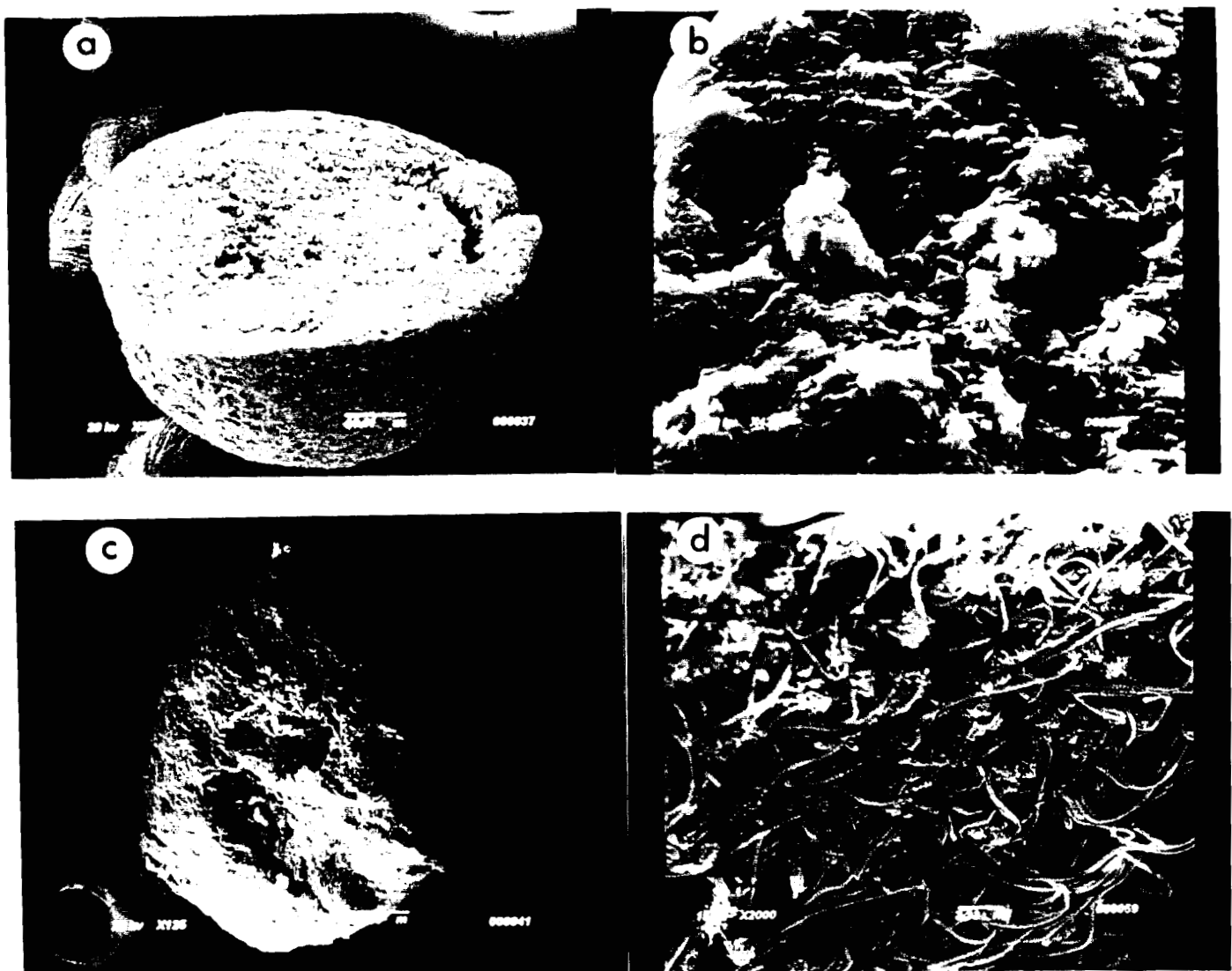


FIG 3.6. C. de Malta, gránulos crio fracturados. Comparación de los métodos de fijación. a y b. Alcohol-Liofilización c y d. Alcohol-CO<sub>2</sub>-Punto Crítico. Todos fijados con Glutaraldehído 8 hs.



Cuando se omitió la postfijación con  $O_4 Os$  se observa, a menores aumentos, que la integridad del gránulo se conserva bien (Figs. 3.7 a y c). Teniendo en cuenta que el  $O_4 Os$  reacciona con los dobles enlaces de compuestos insaturados entre ellos lípidos (Hayat, 1981); al no estar presente, los lípidos son lavados durante la deshidratación con alcohol. Puesto que en la composición de las SEP además de polisacáridos también hay lípidos, se podía esperar que la estructura de las SEP pudieran presentarse más laxas, sin embargo no sólo ocurrió lo contrario sino que las SEP alcanzaron el más alto grado de condensación y compactación (Figs. 3.7 b y d) comparado con los demás tratamiento aplicados en este estudio. Por lo tanto, se decidió seguir el procedimiento descrito en materiales y métodos para comparar las estructuras.

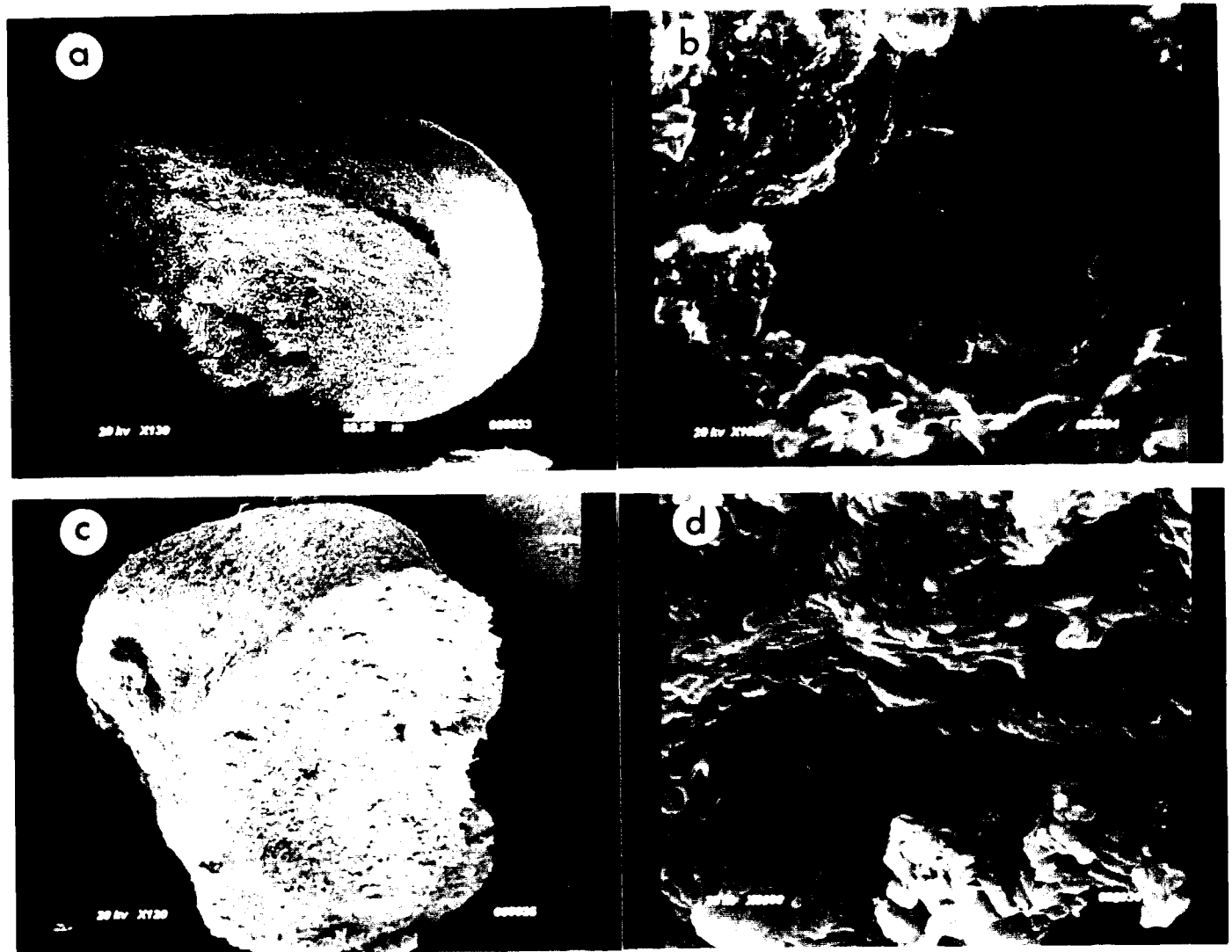


FIG 3.7. C. de Malta, gránulos crio fracturados. Comparación de los métodos de fijación. a y b. Alcohol-Liofilización. c y d. Alcohol- $CO_2$ -Punto Crítico. Todos fijados con Glutaraldehído 8 hs.

### 3.3 Observaciones con MEB de los lodos estudiados

En todas las muestras fueron observados tanto gránulos enteros, como criofracturados con nitrógeno líquido. Estos últimos permiten la observación de la distribución de los microorganismos dentro del gránulo. La fracción del lodo observada en todos los casos corresponde a los gránulos de diámetro entre  $0.925 < D < 2$  mm.

#### 3.3.1 Lodos de Imexa

En los gránulos enteros (Figura 3.8 a) no se observan poros ni aperturas, sólo se distinguen pequeñas grietas distribuidas en toda la superficie del gránulo. Una aproximación a la misma (Fig. 3.8 b) muestra que predomina una población mixta compuesta de bacilos, cocos y cocobacilos.

Los gránulos criofracturados permitieron reconocer dos tipos diferentes de gránulos de acuerdo a su composición microbiana y a la distribución de esos microorganismos. En los gránulos tipo 1 (Fig. 3.9 a-c) predominan bacilos filamentosos de extremo plano con vainas, tanto en la zona periférica (Fig. 3.9 b) como en la central (Fig. 3.9 c), aunque también se observan algunas bacterias filamentosas muy finas (aproximadamente  $0.2 \mu\text{m}$  de diámetro). En los gránulos tipo 2 (Fig. 3.9 d-f), en cambio, se presenta en la periferia una población mixta (Fig. 3.9 e) compuesta de algunos cocos aislados, algunas bacterias filamentosas muy finas, escasos bacilos de extremo plano (similares a *Methanosaeta*) y bacilos de diversa morfología (algunos con extremos agudos, otros curvos de extremos redondeados y también de forma fusoides) y SEP. En la zona central (Fig. 3.9 f) sólo se observaron abundantes bacilos cortos de extremo plano recubiertos con vainas, muy semejantes al género *Methanosaeta*.

Las observaciones con MEB no mostraron material inerte, lo que concuerda con el hecho de que esta fracción del lodo, con una relación SSV/SST de 0.82, es esencialmente orgánica. Por otra parte, teniendo en cuenta que estos lodos son alimentados con un sustrato de alta concentración tanto en materia orgánica como en sulfatos, es muy probable que una parte de la población mixta observada en la periferia de los gránulos tipo 2 y en particular los bacilos curvos de extremos redondeados, las bacterias fusoides y las bacterias filamentosas finas,

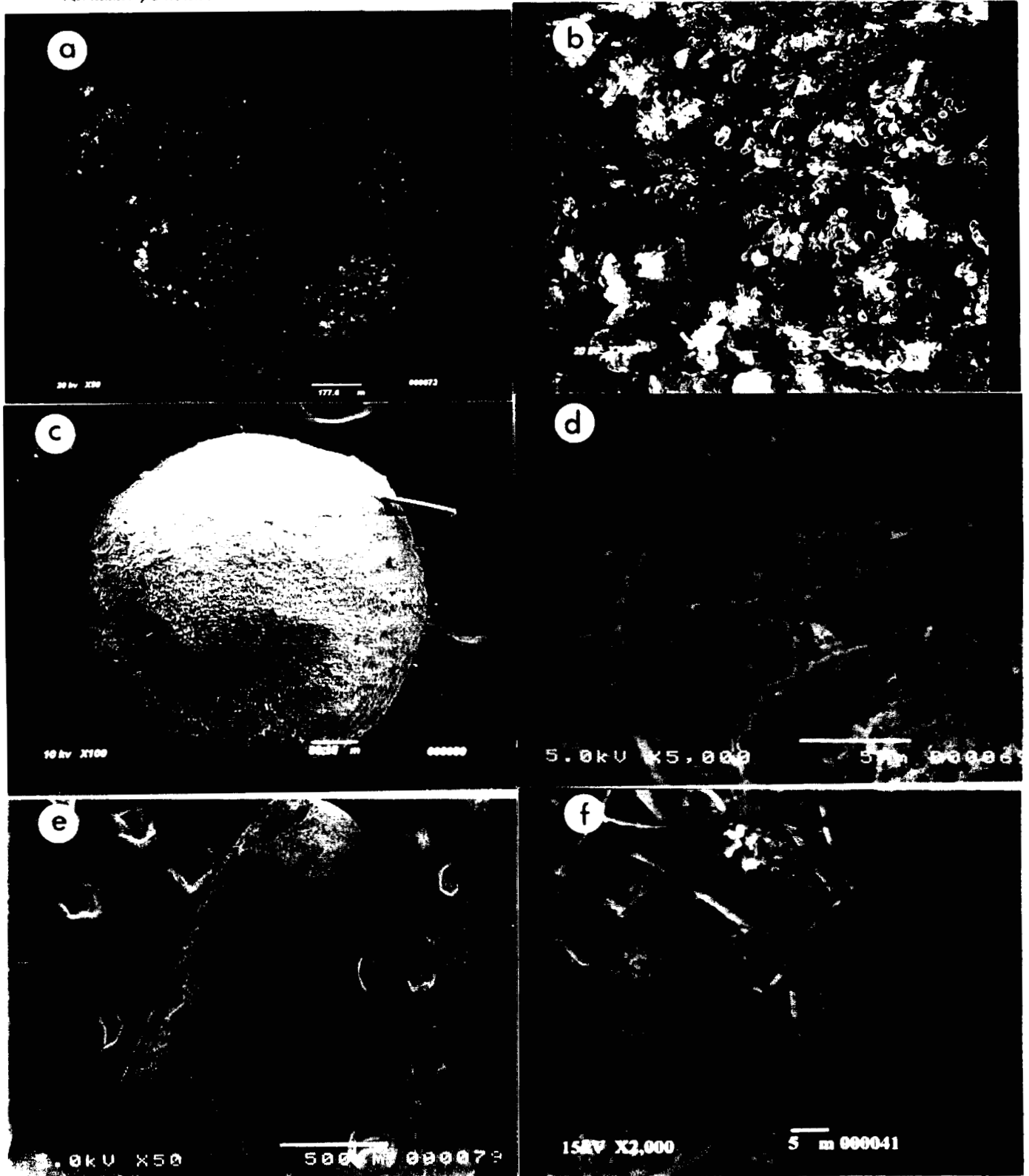


FIG 3.8. MEB de gránulos enteros y aproximación a su superficie. a-b Imexa. a) Se observan grietas ( $\downarrow$ ). b) Población mixta con bacilos, cocos y cocobacilos. c-d. C. de Malta. c) Textura homogénea, sin poros ni grietas. d) Población mixta con predominio de bacilos filamentosos con septos y vainas, cocos, filamentos finos, bacterias espiraladas ( $\uparrow$ ) y partículas inertes. e-f La Caperucita, digestor 1. e) Grandes cavidades laterales. f) Población mixta con abundantes bacilos filamentosos con septos y vainas, junto con cocos en sarcinas.

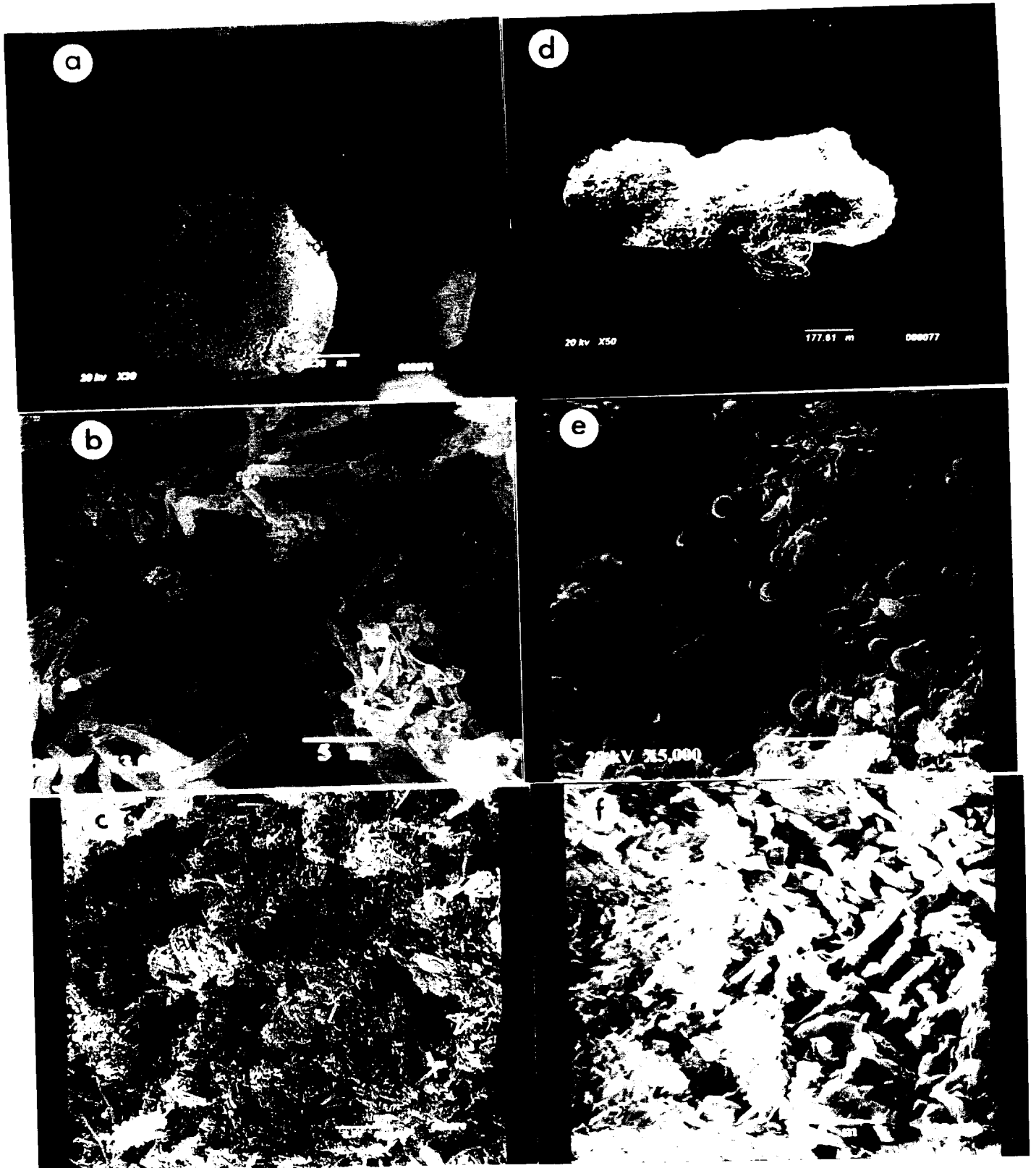


FIG 3.9. MEB de gránulos crio fracturados. Imexa. a, b y c. Tipo 1. a) Algunas grietas. b) Periferia con bacilos filamentosos de extremo plano. c) Zona central con bacilos de extremo plano. d, e y f Tipo 2. e) Periferia con población mixta de cocos aislados, coccobacilos, bacilos con extremo agudo, filamentosos finos ( $\downarrow$ ), escasos bacilos de extremo plano f) Zona central con abundantes bacilos cortos de extremo plano y con vainas.

correspondan a bacterias sulfato reductoras (SBR). Estas últimas son similares a las observadas por Alphenaar (1994) en gránulos sulfidogénicos.

Cabe decir que en la literatura no se han encontrado observaciones con MEB de este tipo de lodo, que nos permita comparar, puesto que si bien existen publicaciones sobre la aplicación del UASB al tratamiento de aguas residuales de efluentes de levaduras, los mismos están centrados en las condiciones generales de operación y sólo hacen alguna referencia al lodo, como por ejemplo Viñas y col. (1994). En general no se han indicado problemas de granulación con este tipo de influentes, siendo el principal inconveniente en el tratamiento de estas aguas residuales, la eliminación de los compuestos del azufre (tanto solubles como gaseosos) y el efecto inhibitorio de sales de K, Ca y Na. En nuestro caso a pesar de existir una alta concentración de Ca y K en el influente no se han observado abundantes precipitados en los gránulos.

Respecto a la distribución de los microorganismos en el gránulo, se encontraron dos tipos de distribuciones diferentes en gránulos de una misma muestra, hecho del cual no hay antecedentes en la literatura.

### 3.3.2 Lodos de Central de Malta

Los gránulos enteros (Fig.3.8 c) presentan una textura superficial homogénea y no se observan poros. Una aproximación a la superficie (Fig 3.8 d) muestra una población mixta compuesta por abundantes bacilos filamentosos de extremo plano, con septos y vainas (semejante a *Methanosaeta*), cocos y bacilos, escasas bacterias espiraladas (espiroquetas), bacterias filamentosas muy finas y filamentos muy finos que constituyen como una telaraña. También hay partículas inertes.

En los gránulos crio fracturados se encontraron dos tipos diferentes en cuanto a la composición microbiana de la zona periférica. En el tipo 1 (Fig. 3.10 a-b) predominan bacilos filamentosos largos de extremo plano (semejantes a *Methanosaeta*) junto con cocos agrupados formando sarcinas semejantes a *Methanosarcina* (Fig. 3.10 b) y en el tipo 2 (Fig. 3.10 c-f) se observa en la periferia (Fig. 3.10 d y e) una población mixta con abundantes cocos agrupados (semejantes a *Methanosarcina*), cocobacilos, bacilos cortos de diferentes morfologías: algunos de extremos

redondeados y otros de extremo plano (*Methanosaeta*), escasos bacilos con espora terminal semejantes a *Clostridium* y bacterias filamentosas muy finas. En ambos tipos de gránulos, en la zona central se observan bacilos cortos de extremo plano (semejantes a *Methanosaeta*) junto con algunas partículas inertes (Fig. 3.10 f, no mostrado para gránulos del tipo 2). Por otra parte, los gránulos tipo 2 presentan cavidades (Fig 3.11 c) mientras que los del tipo 1 son compactos (Fig. 3.11 a). Estas cavidades también han sido observadas en gránulos alimentados con aguas residuales de cervecería (Hickey y col., 1991; Wu y col., 1991), de la fabricación de helados y con sacarosa (Anderson y col, 1991). Es posible que no sólo sirvan para conducir el gas formado dentro del gránulo sino también para intercambiar sustratos disueltos y gaseosos hacia el interior del gránulo reduciendo las limitaciones en la transferencia de masa. Por otra parte, Anderson y col (1991) relacionan la presencia de estas cavidades con el grado de empaquetamiento de los microorganismos, es decir, que cuando la superficie del gránulo consiste de bacilos filamentosos flojamente entretejidos, prácticamente no se forman cavidades, pues el gas puede escapar fácilmente, mientras que cuando en la periferia del gránulo los microorganismos están densamente empaquetados hay más resistencia al flujo del gas y, por lo tanto, se forman cavidades. Estas interpretaciones también coinciden con nuestras observaciones.

Respecto a la composición microbiana y distribución de los microorganismos en el gránulo, no hay antecedentes en la literatura de gránulos alimentados con aguas residuales de la producción de malta, sino con aguas residuales de cervecería. La principal diferencia entre estos dos tipos de aguas residuales es que las provenientes de la producción de malta como sólo proceden del remojo, germinación y transporte, tienen una concentración orgánica más baja que las de cervecería. Como en éstas además de malta, se prepara el mosto de la cerveza y se realiza fermentación por levaduras, presentan más alta concentración de materia orgánica y además contienen etanol, vitaminas y sulfatos, estos últimos en concentraciones mínimas (Wu y col., 1991).

Wu y col. (1993) obtuvieron dos tipos de gránulos diferentes utilizando sustratos distintos. Con el que no contenía etanol, ni glucosa ni urea, sólo AGV, obtuvieron un tipo de gránulo "bacilar", es decir, con predominio de bacilos cortos en caña de bambú de 3 a 5 células, densamente empaquetados. En cambio con el sustrato que contenía etanol, glucosa y urea,

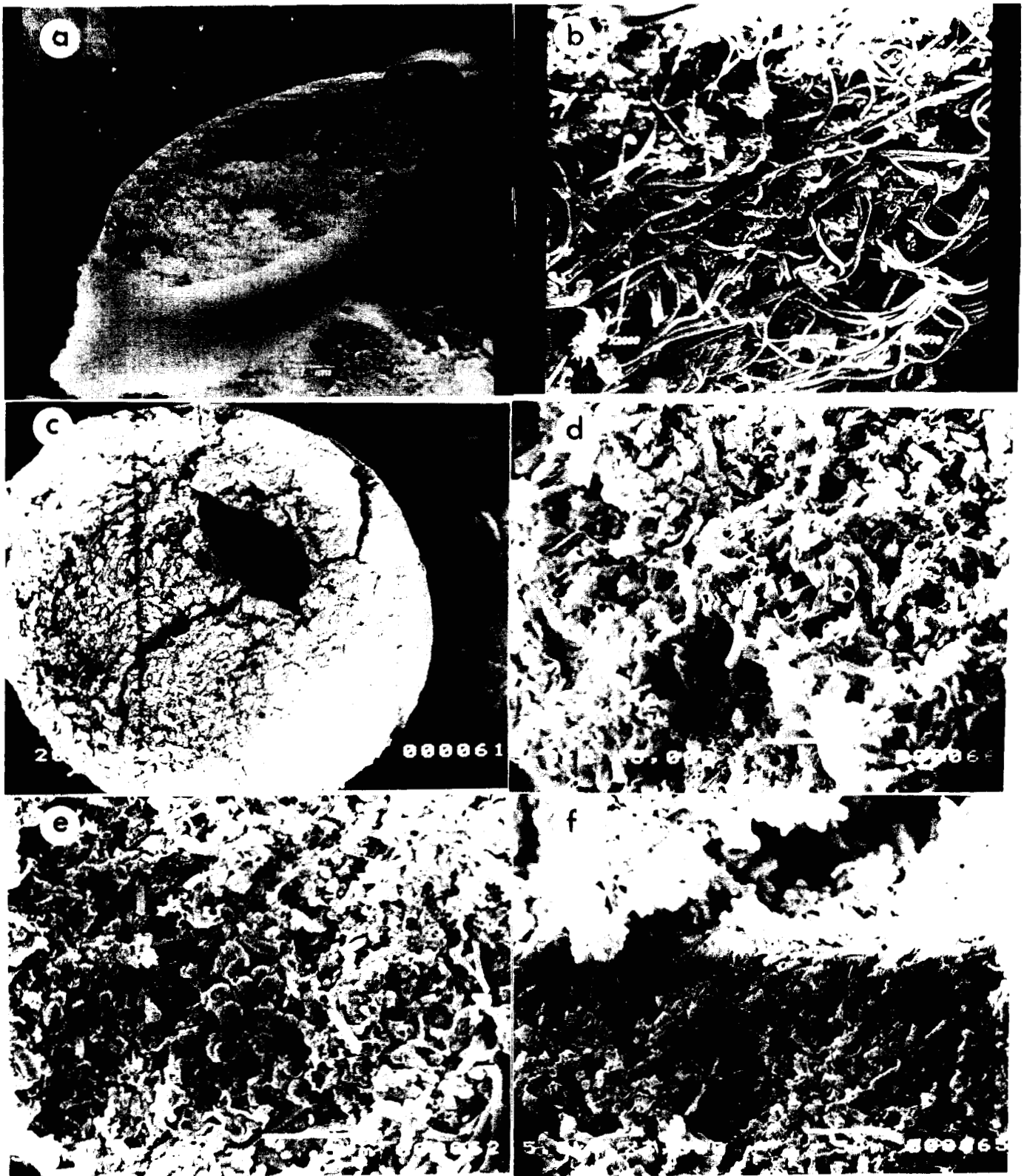


FIG 3.10. MEB de gránulos crio fracturados. C. de Malta. a-b. Tipo 1. a) Gránulo compacto. b) Periferia con abundantes bacilos filamentosos y cocos agrupados en sarcinas. c-f Tipo 2. c) Dos capas bien diferenciadas y una gran cavidad d) Periferia con población mixta. e) Zona periférica con cocos agrupados en sarcinas ( $\downarrow$ ). f) Zona central con bacilos cortos de extremo plano.

además de los AGV, encontraron gránulos tipo “filamentoso”, con predominio de cadenas largas de bacilos (10 ó más células) similares a *Methanotherix soehngenii* tanto en la superficie como en el interior. Sin embargo no atribuyen estas diferencias a la composición de los sustratos empleados, sino más bien al inóculo, puesto que cuando cambiaron de sustrato (eliminando el etanol, glucosa y urea) a los gránulos “filamentosos” no hubo cambios significativos en los gránulos al menos durante 4 meses que duró el experimento. Estos autores sostienen que el morfotipo del metanógeno acetoclástico predominante afecta la estructura, densidad y diámetro del gránulo. El tipo “bacilar” tiene una estructura compacta y densa, mientras que el tipo “filamentoso” da una estructura floja y de menor densidad.

Es decir, que ellos obtuvieron gránulos con una distribución compleja (aparentemente estratificada) cuando el sustrato sólo contenía AGV, mientras que con un sustrato más complejo (AGV, etanol, glucosa y urea) se desarrollaron gránulos filamentosos homogéneos. En nuestro caso se observaron los dos tipos diferentes de gránulos en una misma muestra y con un sustrato en el que predominan los AGV (principalmente acetato) y proteínas (ver Tabla 3.1).

Fang y col. (1995b) trabajando con aguas residuales de cervecería, observaron gránulos cuya estructura es de multicapa. La capa externa densamente empaquetada con varios tipos de bacterias incluyendo cocos, bacilos, *Methanosarcina* y *Methanosaeta*. La segunda capa presenta *Methanosaeta* con dos tipos de microcolonias sintróficas entre acetógenos productores de hidrógeno y metanógenos consumidores de hidrógeno. En el interior del gránulo predominó *Methanosaeta* con microcolonias dispersas de asociaciones sintróficas que desaparecen en el centro del gránulo. Estos autores sostienen que este sería el gránulo típico alimentado con aguas residuales de cervecería. Nuestras observaciones de la capa externa e interna, coincide con la de ellos, aunque sólo se distinguen dos capas en lugar de tres.

La presencia de bacterias espiraladas (espiroquetas) no ha sido detectada en lodos de cervecería sino con sustratos de alto contenido en grasas (Anderson y col., 1991) o en digestores que recibían efluentes de la fabricación de azúcar (Toerien y Hattingh, 1969), o en gránulos crecidos sobre aguas residuales del procesamiento de almidón de maíz (Howgrave-Graham y col., 1991). Las espiroquetas tienen requerimientos nutricionales complejos incluyendo ácidos grasos de cadena larga, Las espiroquetas tienen requerimientos nutricionales complejos



incluyendo ácidos grasos de cadena larga, aminoácidos y vitaminas. En nuestro caso, sin embargo, el influente presenta un contenido bajo de grasas y aceites comparado con el contenido en proteínas y AGV, y se supone que el metabolismo fermentativo de las proteínas es el predominante, por lo tanto cabría suponer que la presencia de espiroquetas estaría más relacionado con los aminoácidos provenientes de la hidrólisis de las proteínas, lo que también se explica por la presencia de bacterias semejantes al género *Clostridium*.

La presencia de bacterias filamentosas muy finas (0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro) ha sido observada también por Wu y col. (1993) utilizando un sustrato con etanol, AGV, glucosa y urea. Le atribuyen un carácter hidrolítico puesto que las mismas desaparecen cuando se cambia a un sustrato que sólo contiene AGV y amonio como fuente de nitrógeno. Por otra parte, Alphenaar (1994) observó bacterias filamentosas finas (0.2  $\mu\text{m}$ ) en biofilm sulfidogénicos alimentados con sustratos ricos en sulfato y les atribuye carácter sulfato reductor puesto que las mismas permanecen cuando se suprime la metanogénesis con cloroformo. Como en nuestro caso no hay sulfatos en el influente y si lo hay debe ser muy bajo, todo indica que las bacterias filamentosas finas observadas deben ser hidrolíticas.

La presencia de bacterias similares a *Methanosarcina* y *Methanosaeta* concuerda con la composición de este influente, en el cual predomina los AGV principalmente acetato. Se ha indicado que en lodos de digestores anaerobios, con bajas concentraciones de acetato predomina *Methanosaeta* y prevalece *Methanosarcina* con concentraciones altas de acetato, y este fenómeno ha sido explicado sobre la base de una considerable diferencia del  $K_s$  para acetato por parte de estos microorganismos (Ten Brummeller y col., 1985; Colleran, 1988; Hulshoff Pol, 1989). *Methanosaeta* tiene una alta afinidad para acetato ( $K_s$  de 20-42 mg/l) pero una relativamente baja velocidad máxima específica de utilización ( $K_{max}$  de 2-4 g DQO/g SSV.  $\text{d}^{-1}$ ). Por otra parte *Methanosarcina mazei* tiene más baja afinidad por el sustrato ( $K_s$  de 400 mg/l), pero tiene una muy alta velocidad máxima específica ( $K_{max}$  de 6-10 g DQO/g SSV.  $\text{d}^{-1}$ ); de tal modo que puede predecirse que el predominio de *Methanosaeta* será favorecido a concentraciones bajas de acetato y que *Methanosarcina* predomina con altas concentraciones de acetato. Además a concentraciones entre 70-150 mg/l de acetato *Methanosaeta* tiene ventaja competitiva y por encima de este nivel predominaría *Methanosarcina*. Sin embargo como *Methanosarcina* tiene la capacidad de utilizar otros sustratos (etanol, metanol, metilaminas y

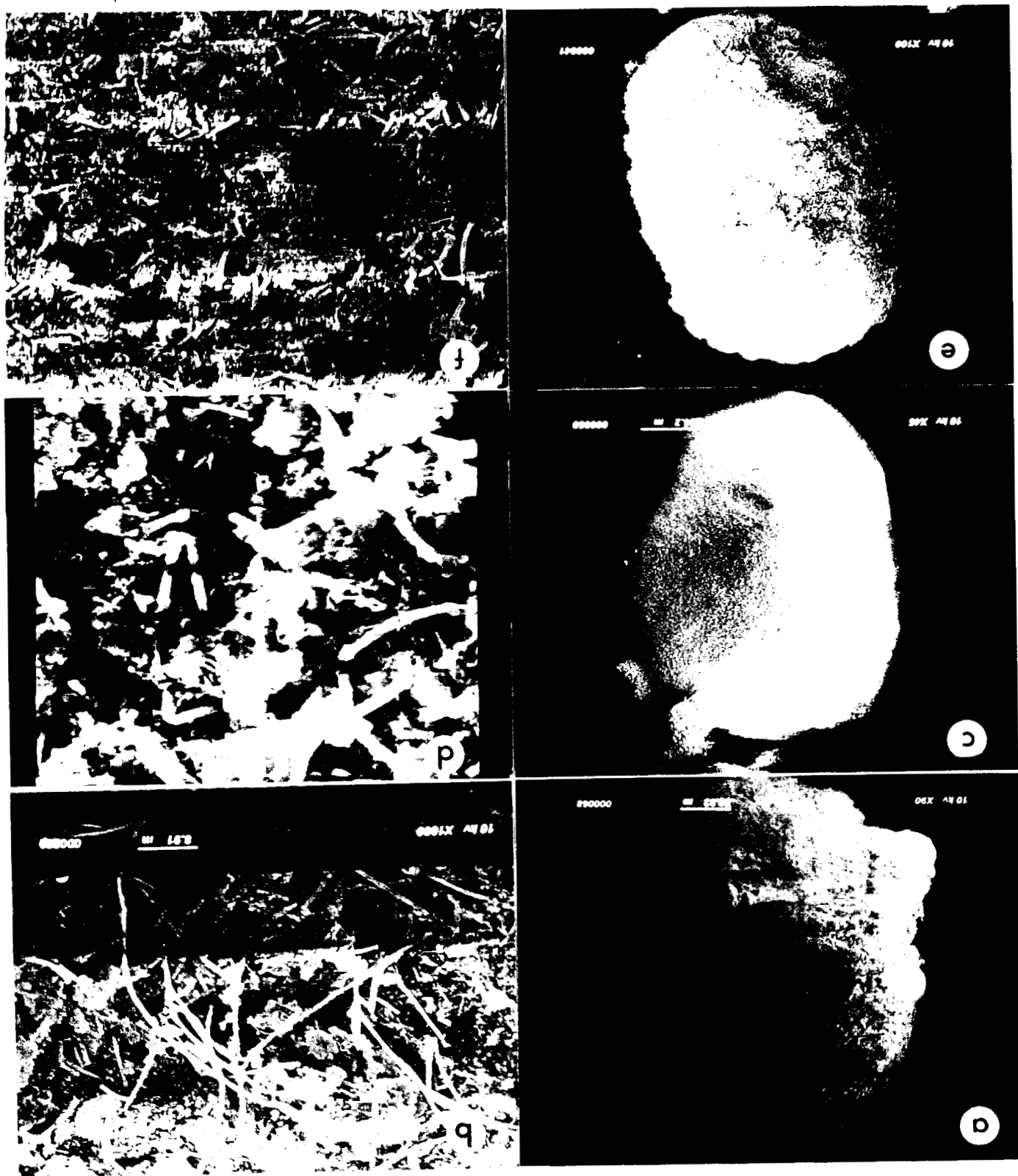
*Methanosarcina*. Sin embargo como *Methanosarcina* tiene la capacidad de utilizar otros sustratos (etanol, metanol, metilaminas y algunas cepas  $H_2 - CO_2$ ) su predominio no puede estar basado sólo en el metabolismo del acetato. algunas cepas  $H_2 - CO_2$ ) su predominio no puede estar basado sólo en el metabolismo del acetato. En nuestro caso hemos observado un tipo de gránulo en cuya composición microbiana hay predominio de bacterias similares a *Methanosaeta* junto con microorganismos semejantes a *Methanosarcina*, mientras que en el tipo 2, en la periferia prácticamente no hay *Methanosaeta*. Estas observaciones podrían estar indicando que hay un gradiente de sustratos en la cama de lodo y además la presencia de compuestos intermediarios del metabolismo fermentativo de las proteínas en las proximidades del gránulo tipo 2.

### 3.3.3 Lodos de La Caperucita

Los gránulos enteros del digestor 1 (Fig. 3.8 e) muestran una textura homogénea en su superficie y la presencia de grandes cavidades laterales. Una aproximación a la superficie de los mismos (Fig. 3.8 f) permite apreciar abundantes bacilos filamentosos de extremo plano, con septos y vainas parecidos a *Methanosaeta* junto con cocos agrupados como sarcinas (semejantes a *Methanosarcina*). En cambio los del digestor 2 (Fig. 3.11 a) muestran una textura superficial rugosa, sin poros, y a mayor aumento (Fig. 3.11 b) se observan sólo bacilos filamentosos de extremo plano; presentándose las SEP en forma de hojuelas.

En los gránulos criofracturados del digestor 1 (Fig. 3.12 a-d) se observan en la periferia bacilos filamentosos de extremo plano con vaina (semejantes a *Methanosaeta*) junto con cocos en cadenas, algunos aislados y otros agrupados (*Methanosarcina*), bacterias filamentosas muy finas y abundantes SEP cubriendo los cocos (Fig. 3.12 b y c). La zona central presenta una composición similar (Fig. 3.12 d). En la periferia de algunos gránulos se observa un objeto no identificado de forma oval ( $48.6 \times 26.73 \mu m$ ), con placas poligonales regulares. Estas observaciones de gránulos con predominio de población microbiana y SEP concuerdan con el hecho de que la fracción granular observada de este lodo, es la que tiene la más alta relación SSV/SST (0.6) comparada con las otras fracciones granulares. Por otra parte, estos lodos pertenecen al digestor alimentado con una carga volumétrica más alta ( $4.98 \text{ Kg DQO}/m^3/\text{día}$ ) al haber sido operado con un TRH más corto (23.7 hs) que el digestor 2 (Tabla 2.1).

FIG 3.11. MFB de gránulos enteros y aproximación a su superficie. a-b La Caperucita, Digestor 2. a) Se observan grietas (↓). b) Escasos bacilos filamentosos y probables SFP como "hojuelas". c-d. El Sauz. c) Textura homogénea, sin poros ni grietas. d) Bacilos filamentosos curvos con vainas y cocos aislados. e-f. UAM-1. e) Algunas grietas. f) Bacilos de extremo plano y probables SFP como "hojuelas".



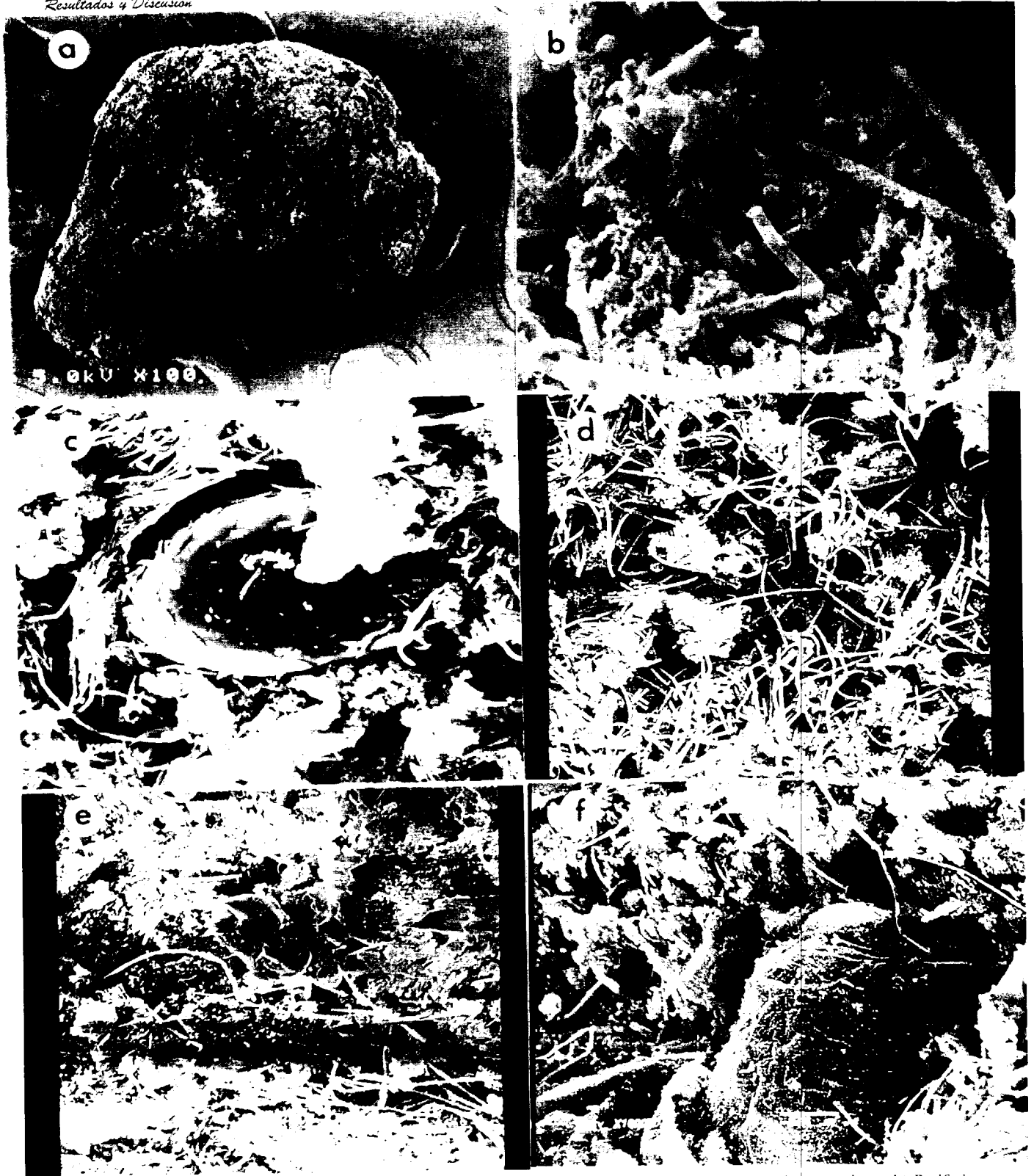


FIG 3.12. MEB de gránulos crio fracturados. La Caperucita. a-d Digestor 1. a) Gránulo compacto con algunas grietas. b) Periferia con bacilos filamentosos de extremo plano y cocos agrupados en cadenas y en sarcinas. c) Objeto no identificado. d) Zona central con bacilos de extremo plano y cocos agrupados en sarcinas. e-f Digestor 2. e) Periferia con escasos bacilos filamentosos de extremo plano f) Zona central con escasos bacilos de extremo plano, y partículas inertes.

A diferencia de los gránulos del digestor 1, los del digestor 2 presentan una población bacteriana más escasa, representada principalmente por bacilos filamentosos de extremo plano como *Methanosaeta*, tanto en la periferia (Fig. 3.12 e) como en el centro (Fig. 3.12 f). Estos gránulos presentan mayor cantidad de partículas inertes como la que se observa en la Figura 3.12 f, lo que concuerda con la baja relación SSV/SST (0.45) de esta fracción. Cabe notar que la forma de condensación de las SEP es muy diferente al observado en los gránulos del digestor 1, puesto que en estos últimos se presentan como “racimos” (Fig. 3.12 b), en cambio en los del digestor 2 se presentan como hojuelas (Fig. 3.12 e) semejantes a las observadas en los gránulos de la UAM-I (Fig. 3.11 f).

Teniendo en cuenta que la composición del influente es la misma en ambos reactores, pero que el digestor 2 recibió aproximadamente la mitad de la carga volumétrica sumado al hecho de las deficientes condiciones de mezclado del lecho de lodo, las diferencias observadas a nivel de los gránulos, podrían ser resultantes de las diferentes condiciones de operación de ambos reactores. Por otra parte nuestras observaciones concuerdan con el hecho de que en el digestor 2 la eliminación fisicoquímica es mayor (52.22% de los SST) que la eliminación biológica (31% de la DQO). Otra diferencia que podría ser significativa es que el digestor 1 no elimina las grasas y aceites, las que se encuentran en baja concentración en el influente, mientras que el digestor 2 lo hace pobremente (10.41%)

La población microbiana aislada de digestores de lecho empacado, alimentados con suero agrio por Winter y col., (1988) está compuesta por *Lactobacillus* y *Eubacterium*, responsables de la fermentación de lactosa, lactato y proteínas. El único acetogénico aislado fue *Desulfovibrio*, probablemente responsable de la conversión de etanol, lactato, formato hasta acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> en condiciones de bajo contenido de sulfato. Los metanógenos aislados fueron *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanospirillum*, *Methanocorpusculum parvum* y el único acetoclástico fue *Methanothrix soehngenii*.

No hay en la literatura descripciones sobre la distribución de los microorganismos en estos tipos de gránulos que tratan aguas residuales de lácteos en UASB. En los lodos estudiados aquí se ha observado que los gránulos presentan una distribución uniforme y los microorganismos predominantes son semejantes a *Methanosaeta* y a *Methanosarcina*. Estos microorganismos

también fueron encontrados por Zellner y col. (1987) trabajando con suero y con suero filtrado. También observaron que la capa de *Methanotherix soehngeni* desaparece cuando se alimenta con suero filtrado, y predomina *Methanosarcina* debido a la disminución del pH resultante de la digestión de este sustrato, sin embargo, esta bacteria se mantuvo suspendida y ocasionalmente atrapada en los poros del soporte.

### 3.3.4 Lodos de El Sauz

Los gránulos enteros (Fig. 3.11 c) presentan una textura superficial muy homogénea, sin poros. Una aproximación a la superficie de los mismos (Fig. 3.11 d) muestra que está cubierta de bacilos filamentosos curvos con vainas (semejantes a *Methanospirillum*), cocos aislados y SEP.

En los gránulos criofracturados se observan dos tipos de acuerdo a su composición microbiana predominante. En el tipo 1 (Figs. 3.13 b, c y d) predominan en la periferia bacilos filamentosos curvos con vainas similares a *Methanospirillum* y en el centro (Figs. 3.13 e y f) se encuentran junto con bacilos filamentosos rectos (parecidos a *Methanosaeta*). En algunos gránulos se observó en la periferia, un objeto no identificado (Fig. 3.13.c) de forma oval, muy similar al descrito para el digester 1 de La Caperucita. Los gránulos tipo 2 (Figs. 3.14 a, b y c) presentan en la periferia una población mixta con cocos aislados, bacilos de diversas morfologías (Fig. 3.14 a) y algunos bacilos filamentosos curvos con vainas como en el tipo 1 (Figs. 3.14 b y c) y en la zona central (Fig.3.14 d) sólo se observan bacilos rectos de extremo plano (semejantes a *Methanosaeta*).

La presencia de bacterias del género *Methanospirillum*, ha sido observada en gránulos alimentados con aguas residuales del procesamiento de azúcar de remolacha y papas (Alibhai y Forster, 1986); en yuxtaposición con *Syntrophobacter* en gránulos alimentados con propionato (Fang y col., 1995a) y con etanol (Grotenhuis y col., 1991) y también junto con *Methanosarcina* (Wu y col., 1992). Por otra parte, el género *Methanospirillum* es el microorganismo hidrogenofílico predominante asociado con microorganismos oxidantes de benzoato, de ácidos grasos de cadena larga y de butirato (Stams, 1994).

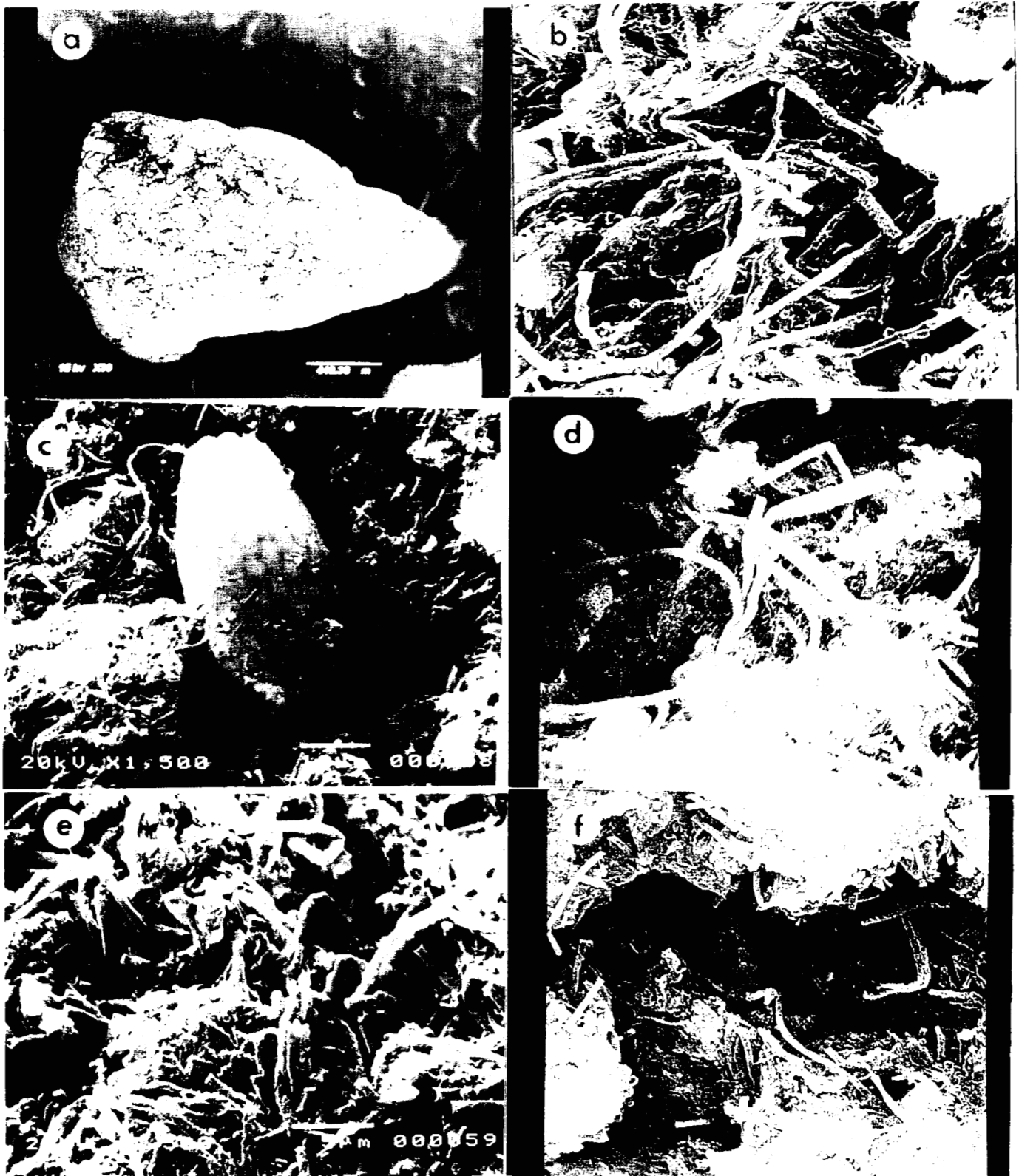


FIG 3.13. MEB de gránulos criofracturados. El Sauz. a-f. Tipo 1. a) Gránulo compacto. b, c y d) Periferia con abundantes bacilos filamentosos curvos de extremo plano. c) Objeto no identificado. e-f) Zona central con bacilos filamentosos curvos y rectos de extremos planos.

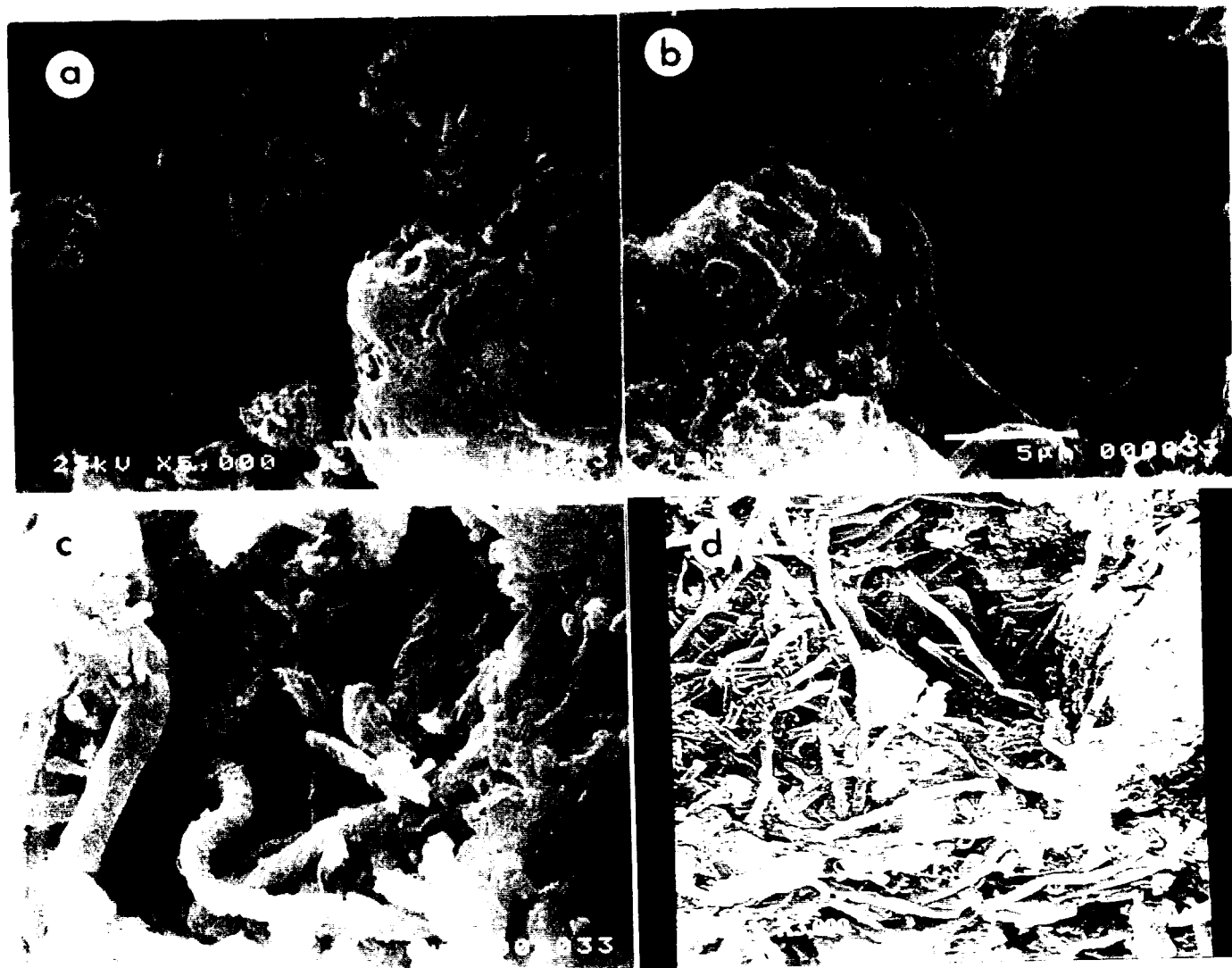


FIG 3.13. MEB de gránulos criofracturados, El Sauz. a-d. Tipo 2. a, b y c. Zona periférica con población mixta y algunos bacilos filamentosos curvos con vainas. d) Zona central con bacilos de extremos planos.



Si bien este lodo en general tiene una concentración orgánica baja (19.39 g/l de SSV) y una relación SSV/SST también baja (0.46), la fracción granular observada presenta un predominio neto de microorganismos.

Por otra parte, no se ha encontrado antecedentes en la literatura sobre gránulos de lagunas anaerobias.

### 3.3.5 Lodos de la UAM-I

En este lodo los gránulos observados corresponden a la fracción menos representada (6.09% de los SSV). Esta fracción, a pesar de ser la más orgánica de todas, tiene relación SSV/SST de apenas 0.48, lo cual indica que los gránulos están mineralizados.

En los gránulos enteros (Fig. 3.11 e) no se observan poros ni aperturas, sólo se ven grietas en toda la superficie y las SEP se presentan como hojuelas, similares a las antes descritas. A mayor aumento (Fig. 3.11 f) predominan bacilos de extremo plano semejantes a *Methanosaeta*.

En los gránulos crio fracturados (Fig. 3.15 a) se observa un gránulo compacto con inclusiones de partículas inertes. En la zona periférica (Fig 3.15 b y c) se ven escasos bacilos filamentosos y algunos cocos aislados junto con partículas inertes y probables SEP. En la zona central (Fig. 3.15 d) no se distinguen bacterias sino abundantes partículas inertes, algunas de las cuales tienen el aspecto de ser precipitados orgánicos, probablemente formados a partir de las grasas, pues la degradación de éstas en pH alcalino libera glicerina y sales alcalinas de ácidos grasos, las cuales pueden dar origen a la formación de sales de ácidos grasos de calcio y magnesio, llamados jabones minerales, que son insolubles y precipitan (Metcalf & Eddy, 1991).

La mayoría de los gránulos observados se presentan “vacíos” como el de la Figura 3.15 e, pero éstos tienen un aspecto muy diferente a los mostrados en la literatura con otros tipos de aguas residuales, puesto que en este caso no son gránulos con centro hueco sino más bien “descascarados”. Esta configuración nos podría estar indicando que el mecanismo de adhesión entre esta red de microorganismos y el molde al cual estaban fijados, es reversible.

Desde el punto de vista de la composición microbiana, nuestras observaciones son similares a las de Barbosa y Sant’Anna (1989), quienes encontraron gránulos con predominio de bacterias filamentosas de *Methanosaeta*, pero son muy diferentes en cuanto a la calidad del gránulo

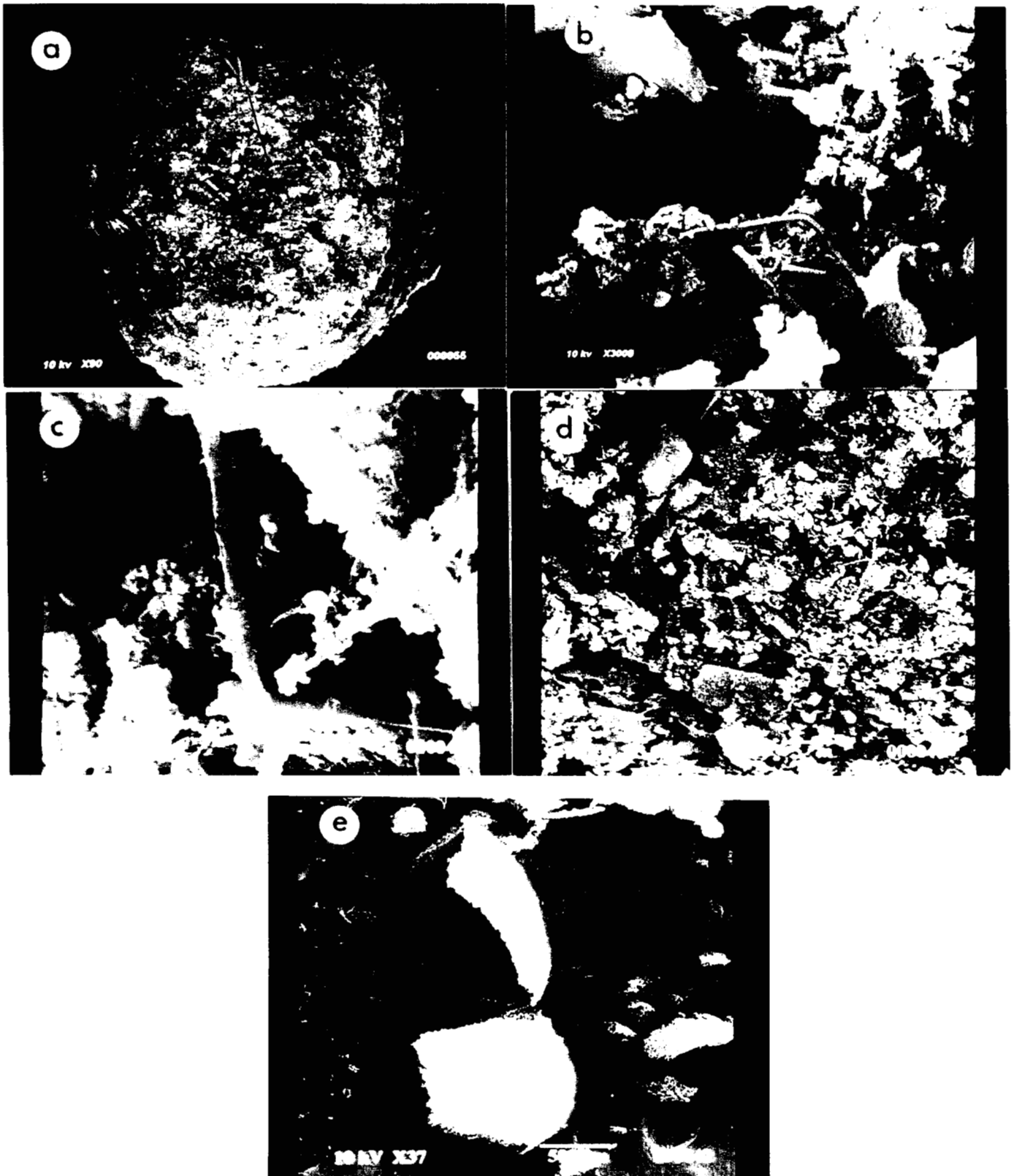


FIG 3.15. MEB de gránulos crio fracturados. UAM-I. a) Gránulo compacto con inclusiones de partículas inertes ( $\downarrow$ ). b y c) Periferia con escasos bacilos filamentosos con vainas y cocos aislados. Abundantes partículas inertes. d) Zona central donde no se observan microorganismos, solamente se ven partículas inertes. e) Gránulo "vacío".

obtenido por ellos, los cuales son esféricos con un aspecto muy uniforme y de hasta 8 mm de diámetro, y prevalece la forma granular sobre la floculenta, es decir lo opuesto a nuestro caso. Ellos trabajaron con un sustrato más concentrado ( $DQO_{Tot}$  de 627 mg/l) y menos particulado (SST/DQO de 0.6) que el nuestro (Tabla 3.1). Aún así, sostienen que el 65% de la DQO total fue eliminada físicamente. Por otra parte, Sayed y Fergala (1995) encontraron que el lodo granular, alimentado con aguas residuales urbanas, fue más efectivo en la eliminación de los SS gruesos, teniendo un potencial pobre para eliminar la fracción coloidal. En nuestro caso, el reactor presenta un alto porcentaje de eliminación de SST (89.31%) y por lo que se observó en el MEB, una buena parte de los mismos están atrapados en los gránulos, lo que indicaría que predomina un mecanismo de eliminación física de los sólidos.

### 3.3.3 Síntesis de las observaciones realizadas

En las Figuras 3.16 A-F se sintetizan de manera esquemática todas las observaciones con MEB y la composición química de las aguas residuales con que se alimentaron los lodos. Estos esquemas están basados únicamente en la microflora predominante y en su respectiva ubicación en el gránulo. No constituyen un modelo ni tampoco reflejan una escala determinada de tamaños o distancias entre capas.

Como se puede apreciar la mayor variedad de morfotipos microbianos se presentan en la periferia de los gránulos alimentados con influentes provenientes del proceso de levaduras y de malta (Fig. 3.16 A y B) lo que concuerda con la composición compleja de estas aguas residuales. En los lodos de Imexa se observaron dos tipos de gránulos de acuerdo a la distribución de los microorganismos (homogéneos y estratificados). Cabe notar que los morfotipos observados en la periferia de los gránulos tipo 2 de Imexa, concuerdan con la morfología de microorganismos que participan en la degradación sintrófica del etanol en presencia de sulfatos (cocos, cocobacilos, bacterias filamentosas finas) y en la metanogénesis acetotrófica (similares a *Methanosaeta*).

En los lodos de Central de Malta, también se observaron dos tipos diferentes de gránulos, pero en este caso ambos tipos presentan distribución estratificada de los microorganismos. Los morfotipos presentes en la periferia del gránulo tipo 2 (Fig. 3.16 B), son similares a los de

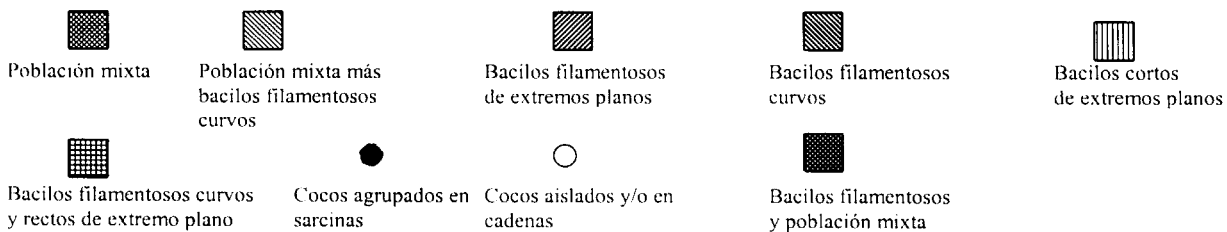
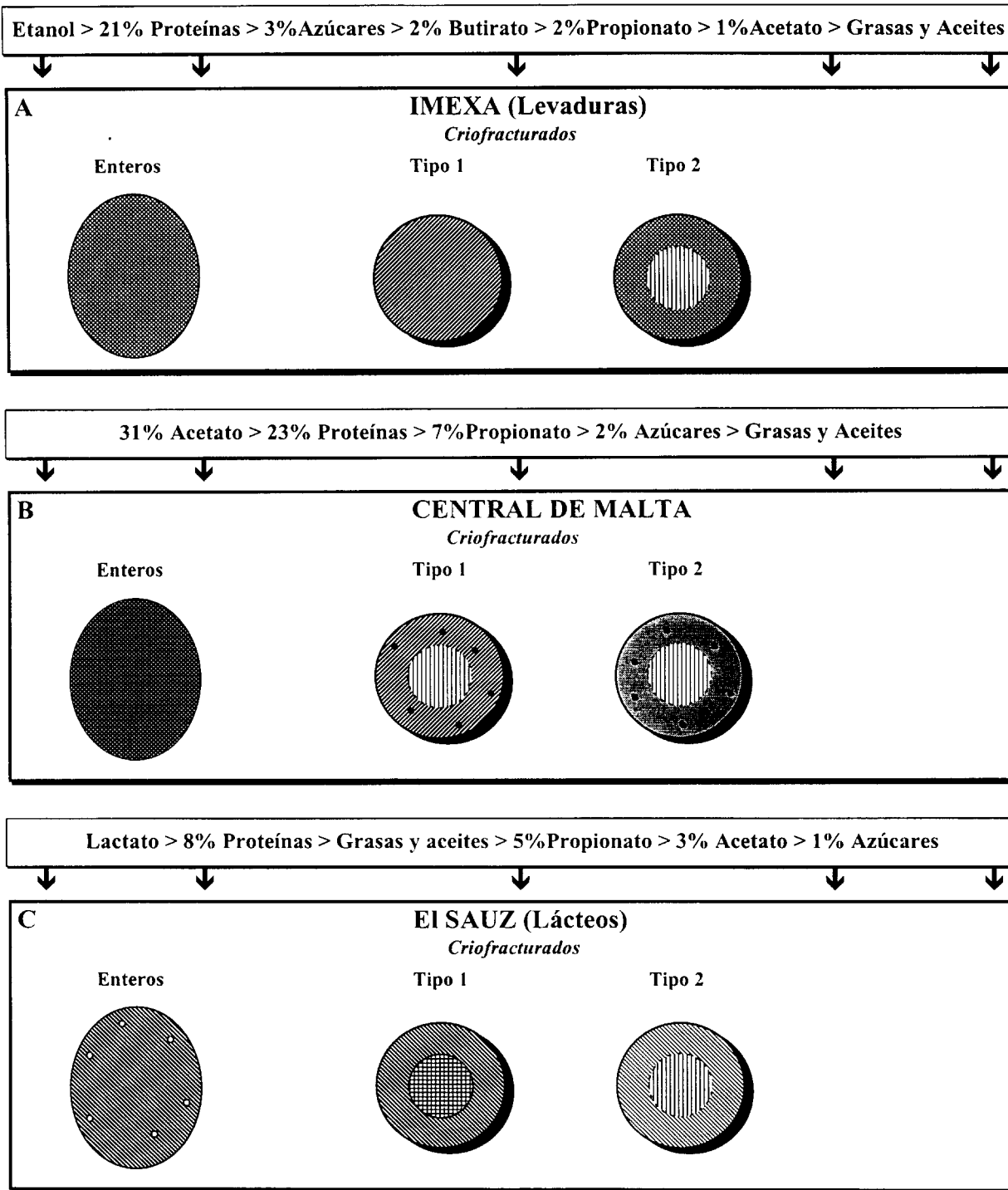
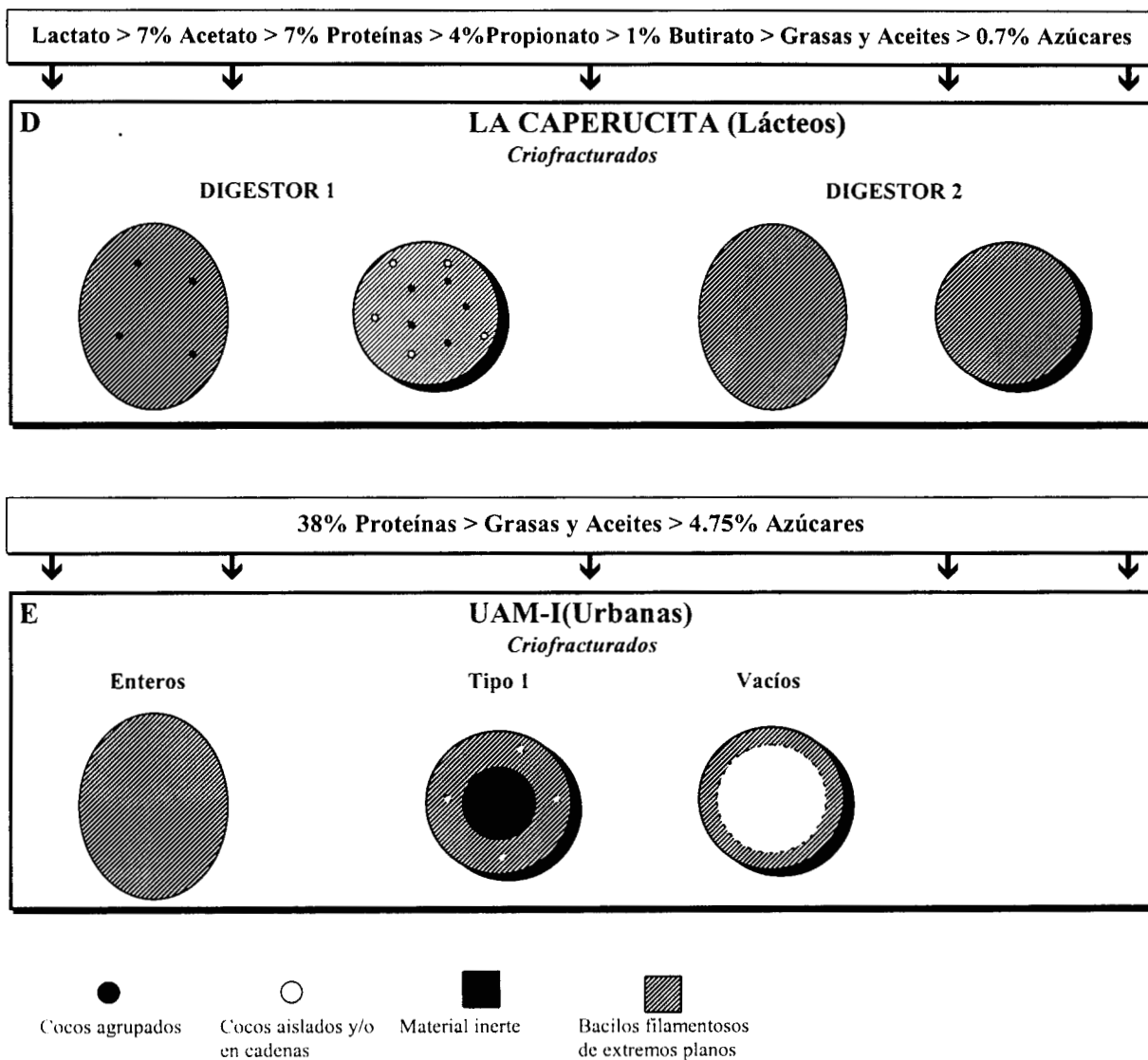


Fig. 3.16: SINTESIS DE LAS OBSERVACIONES CON MEB Y DE LA COMPOSICIÓN DELSUSTRATO (Los porcentajes corresponden a la DQO)



Continuación

Fig. 3.16: SINTESIS DE LAS OBSERVACIONES CON MEB Y DE LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO (Los porcentajes corresponden a la DQO)

microorganismos proteolíticos o fermentadores de aminoácidos, como por ejemplo *Clostridium* y *Peptococcus*, también se presentan bacilos de extremos redondeados muy similares a *Methanobacterium*, lo que hace pensar que en la periferia de estos gránulos se podría estar llevando a cabo la hidrólisis de las proteínas y fermentación de los aminoácidos. Se observó además y, a diferencia de los gránulos de Imexa, la presencia de cocos agrupados en sarcinas (parecidos a *Methanosarcina*) tanto en periferia del gránulo tipo 1 como del tipo 2. La presencia de estos últimos morfotipos es consistente con la elevada concentración de acetato en este influente.

Aparentemente en la periferia de los gránulos de El Sauz (Fig. 3.16 C) no hay morfotipos proteolíticos, salvo que los cocos aislados observados sean microorganismos del género *Peptococcus*, aunque también podrían tratarse de bacterias consumidoras de lactato (por ejemplo *Veillonella alcalescens* antes *Micrococcus lactilyticus*) puesto que debido a las bajas concentraciones de azúcares medidas en el influente, se presume que no hay lactosa sino lactato. Observamos también la presencia de abundantes morfotipos semejantes a *Methanospirillum*, los cuales se observan solos en los gránulos tipo 1 y junto con los cocos aislados en la periferia del gránulo tipo 2. En la zona central de ambos tipos de gránulos se observaron morfotipos similares a *Methanosaeta*.

Los gránulos observados en los lodos de los digestores 1 y 2 de La Caperucita (Fig. 3.16 D) presentan una distribución homogénea de la población microbiana, aunque difieren en los morfotipos predominantes. Los gránulos del digestor 1 (Fig. 3.16 D) presentan más amplia variedad de morfotipos que los del digestor 2, en los cuales sólo se presentan microorganismos similares a *Methanosaeta*. Los cocos en cadenas presentes en la periferia de los gránulos del tipo 1 podrían ser tanto bacterias fermentativas o metanogénicas hidrogenofílicas. Por otra parte, llama la atención que los gránulos de La Caperucita presenten diferente composición microbiana, siendo que tratan el mismo influente, pero es consistente con el hecho de que el lodo del digestor 1 presenta mayor actividad específica (1.34 Kg DQO/Kg SSV. d<sup>-1</sup>) que el digestor 2 (0.41 Kg DQO/Kg SSV. d<sup>-1</sup>) y las condiciones de operación de ambos reactores son muy diferentes (Tabla 2.4, pág. 72).

Por otra parte, cuando se compara la composición microbiana de los gránulos de El Sauz con los de La Caperucita, vemos que los mismos presentan morfotipos muy diferentes y

probablemente éste sea uno de los factores que hacen que las eficiencias de eliminación de la DQO de El Sauz sean muy superiores a las de La Caperucita (Tabla 2.4, pág. 72)

Los gránulos alimentados con aguas urbanas diluídas (Fig. 3.16 E) presentan predominantemente morfotipos acetoclásticos (probablemente *Methanosaeta*) y algunos cocos aislados en la periferia, mientras que el centro de los mismos es completamente inerte. Estos gránulos presentan abundantes partículas inertes, indicando que existe adsorción de los sólidos.

### 3.4 Discusión general

La siguiente discusión se basará principalmente en la comparación de nuestros resultados con los de Guiot y col. (1992 a y b) y los de Fang (1997), puesto que estos autores son los que proponen modelos de estructura de gránulo en relación a la composición del sustrato y utilizaron MEB como método de estudio. Guiot y col. (1992 a), basados en el modelo de difusión de Mc Carty y Smith (1986), en observaciones con MEB y en medidas de actividades metabólicas, sostienen que los gránulos alimentados con sacarosa presentan tres capas bien diferenciadas, en la externa se disponen los microorganismos acidógenos y consumidores de hidrógeno, en la capa media, microcolonias sintróficas (acetógenos productores de hidrógeno y consumidores de hidrógeno), y en el núcleo central se encuentran metanógenos semejantes a *Methanosaeta*. Siendo cada una de esas capas zonas tróficas especializadas.

Fang (1997) por su lado, sintetizando los estudios, realizados por su equipo entre 1993-1996, sostiene que la estructura de los gránulos depende marcadamente de la termodinámica y cinéticas de degradación de los sustratos sobre los cuales crecen, realizando la siguiente generalización: Los gránulos que consumen carbohidratos muestran una distribución en capas, con una capa superficial poblada de bacterias acidógenas hidrolíticas/fermentativas, una capa media con colonias sintróficas y centro ocupado por metanógenos acetotróficos, mientras que los gránulos alimentados con sustratos que presentan una etapa hidrolítica/fermentativa limitante (hidrólisis de las proteínas, acetogénesis del propionato, acidogénesis del glutamato), no presentan un patrón de distribución en capas, sino que las bacterias están uniformemente distribuídas en todo el gránulo.

En este estudio se han observado la distribución de diferentes morfotipos microbianos en gránulos provenientes de seis lodos alimentados con influentes de composición química compleja y diversa. Los lodos provenientes de UASB alimentados con aguas residuales del proceso de levaduras, de malta y de lácteos con una considerable concentración de grasas y aceites (El Sauz), presentan gránulos con una distribución estratificada de los microorganismos en dos capas, una central y otra periférica, y difieren en los morfotipos presentes en su capa periférica. En cambio, los gránulos alimentados con aguas residuales del proceso de lácteos con una concentración muy reducida de grasas y aceites (La Caperucita) presentan una distribución homogénea de los microorganismos. Los gránulos provenientes del tratamiento de aguas urbanas diluídas (UAM-I) presentan dos capas pero una de ellas, la central, es inorgánica. Por otra parte, en todos los demás gránulos estratificados el centro de los mismos está compuesto por microorganismos similares a *Methanosaeta*.

Si bien, el análisis preciso de las vías de degradación de estos influentes está limitado por la composición desconocida de la fracción no identificada de la DQO, se puede inferir, a partir de las eficiencias de los reactores y de la composición química detectada, que todos estos influentes pueden presentar durante su depuración una etapa limitante hidrolítica/fermentativa (hidrólisis de las proteínas y/o materia orgánica particulada). Por lo tanto, los patrones de distribución de microorganismos observados en los gránulos de Central de Malta, Imexa tipo 2, El Sauz y la UAM-I, no concuerdan con la generalización de Fang (1997) dado que los mismos presentan una patrón de distribución en capas de su población microbiana y, según lo planteado por dicho autor, estos gránulos deberían presentar una distribución homogénea, siendo el de La Caperucita el único de nuestros resultados que concuerda con dicha generalización.

Además, en el caso de Imexa, se observaron gránulos con patrones de distribución diferentes, uno homogéneo y otro estratificado en un mismo lodo, lo cual no ha sido reportado antes en la literatura. Esto no resulta del todo extraño puesto que algunos autores han encontrado, basándose en mediciones de actividades metabólicas y en el color de los gránulos, que puede haber gránulos diferentes en un mismo lecho de lodo (Kosaric, 1990; Bhatti, 1995; Quarmby



y Forster, 1995; Thaveesri y col., 1995). La presencia de diferentes tipos de gránulos en una misma muestra (todas las fracciones de tamaño similar), sería consistente con el hecho de que como ha sido planteado por Lettinga (1994) pueden existir gradientes de sustrato en el lecho de lodo de los reactores UASB cuando las condiciones de operación no permiten que exista un flujo mezclado ideal. Esto no sólo puede ocurrir en reactores industriales sino que también ha sido observado en reactores de laboratorio (Sam Soon, 1987; Chang y col., 1993, 1995).

Nuestras observaciones de los gránulos de Imexa junto con el hecho de que dos lodos alimentados con influentes de composición química similar (El Sauz y La Caperucita) muestren patrones muy diferentes de distribución de los microorganismos (estratificados y homogéneos, respectivamente) obliga a incorporar en el análisis otros factores además de los difusionales (planteado por Guiot y col. 1992a) y de las cinéticas de degradación de los sustratos individuales, como lo sostiene Fang (1997). Ambos autores sólo se limitan a la difusión de sustratos solubles como único mecanismo de transporte, siendo que existen otros como el transporte turbulento y advectivo de componentes disueltos y particulados (Wanner y Reichert, 1996). Tampoco toman en cuenta las velocidades de crecimiento, muerte y desprendimiento de las bacterias involucradas ni tampoco las condiciones de operación de los reactores. No tienen en cuenta el papel de las bacterias en suspensión y de los sólidos suspendidos, puesto que explican todo considerando que la etapa inicial de degradación de los sustratos ocurre en la superficie de los gránulos, siendo que esa etapa puede ser realizada por los microorganismos en suspensión, en particular cuando se trata de aguas urbanas.

Por otra parte, aún no se puede explicar el hecho de que otros autores utilizando sustratos con cinéticas de degradación rápida como sacarosa (Anderson y col., 1991; Fukusaki y col., 1995) o glucosa (Chang y col., 1993) encontraron distribución homogénea de los microorganismos, así como también ha sido encontrado lo inverso, es decir estructura en capas en gránulos alimentados con acetato (Bochem y col., 1982) y AGV (Macario y col., 1991; Visser y col., 1991; Harmsen, 1996).

Todo lo anteriormente expuesto plantea que las teorías sobre la distribución de los microorganismos elaboradas hasta la fecha corresponden a modelos teóricos demasiado apegados a sistemas ideales. Sin embargo, en condiciones reales de operación de los reactores UASB las situaciones son mucho más complejas y, a la luz de nuestros resultados, es evidente

que además de la composición química del influente intervienen otros factores en la distribución de los microorganismos en el gránulo, como pueden ser las concentraciones de los diferentes compuestos, las cargas aplicadas y las temperaturas de operación.

### **3.5 Conclusión**

Contrariamente a lo planteado como hipótesis, la baja concentración de azúcares en las aguas residuales del presente estudio, no se tradujo en la ausencia de estructura estratificada de los gránulos. De la misma forma, la presencia de proteínas o AGV no estuvo asociada a gránulos con un patrón de distribución homogéneo. Esto indica que la organización de los microorganismos en los gránulos no depende únicamente de la composición química de las aguas residuales y que los modelos de Guiot y col., (1992a) y Fang (1997) no son directamente extrapolables a aguas complejas.

**BIBLIOGRAFIA**

- Alibhai, K.R.K and Forster, C.F. 1986. Physicochemical and biological characteristics of sludges produced in anaerobic upflow sludge blanket reactors. *Enz. Microb. Technol.* **8**: 601-606.
- Alphenaar, P.A. 1994. Anaerobic granular sludge: Characterization and factors affecting its functioning, Ph. D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Anderson, G.K., Yang, G. and Evison, L.M. 1991. Light and SEM examination of the effect of substrate changes on the structure of granular anaerobic sludge, pp. 346-351. *International Symposium Environmental Biotechnology 22-25 April Oostende Belgium.*
- Badui Dergal, S. 1994. Química de los alimentos, pp. 75-84. Edit. Alhambra Mexicana S.A. de C.V. 1º reimpresión de la 3ª edición. México.
- Barbosa, R.A. and Sant'Ana, G.L. 1989. Treatment of raw domestic sewage in an UASB reactor. *Wat. Res.* **23** (12): 1483-1490.
- Bhatti, Z.I, Furukawa, K. and Fujita, M. 1995. Comparative composition and characteristics of methanogenic granular sludges treating industrial wastes under different conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 273-280.
- Bochem, H.P., Schoberth, S.M., Sprey, B. and Wengler, P. 1982. Thermophilic biomethanation of acetic acid: morphology and ultrastructure of a granular consortium. *Can. J. Microbiol.* **28**: 500-510.
- Bough, W.A., Burk, E.D., Bybee, E.C., Eckert, R.W. and Clark Thomas, D. 1987. The evolution of a treatment system for high strength dairy processing waste. *In: Proc. Food Processing Waste Conference Atlanta, Georgia Tech. Research Institute, USA.*
- Carozzi, A. 1993. Pretratamiento de las aguas residuales de la industria lechera, pp. 1-20. *En: Actas del 5º Seminario "Depuración Anaerobia de Aguas Residuales". Valladolid 26-28 de Mayo de 1993, España.*
- Chang, Y.J., Nishio, N., Maruta, H. and Nagai, S. 1993. Characterizatic of granular methanogenic sludge grown on glucose in a UASB reactor. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 430-434.
- Chang, Y.J., Nishio, N. and Nagai, S. 1995. Characteristics of granular methanogenic sludge grown on phenol synthetic medium and methanogenic fermentation of phenolic wastewater in UASB reactor. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 348-353.
- Ciftci, T. and Öztürk, Y. 1995. Nine years of full-scale anaerobic-aerobic treatment experiences with fermentation industry effluents. *Wat. Sci. Tech.* **32**(12): 131-139.
- Colleran, E. 1988. Report on the technological aspects of granulation, pp. 237-240. *In: G Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis and L.W. Hulshoff-Pol (eds). Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. Pudoc Wageningen, The Netherlands.*
- Dolfing, J., Griffioen, A., van Neerven, A.R.W. and Zevenhuizen, L.P.T.M. 1985. Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.* **31**: 744-750.
- El Mamouni, R., Guiot, S:R., Mercier, P., Safi, B. and Samson, R. 1995. Liming impact on granules activity of the multiplate anaerobic reactor (MPAR) treating whey permeate. *Bioprocess Eng.* **12**: 47-53.
- Fang, H.H.P. 1997. Microbial distribution and syntrophic association in UASB granules, Vol 1, pp. 83-90. *In: 8<sup>th</sup> International Conference on Anaerobic Digestion. Sendai. Japan.*
- Fang, H.H.P., Li, Y.Y. and Chui, H.K. 1995a. Performance and sludge characteristics of UASB process treating propionate-rich wastewater. *Wat. Res.* **29**: 895-898.

- Fang, H.H.P., Chui, H.K. and Li, Y.Y. 1995b. Microstructural analysis of UASB granules treating brewery wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 31(9): 129-135.
- Fukusaki, S., Nishio, N. and Nagai, S. 1995. High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in UASB reactors fed with various defined substrates. *J. Ferment. Bioeng.* 79: 354-359.
- Grotenhuis, J.T.C., Smith, M., Plugge, C.M., Yuansheng, X., van Lammeren, A.A.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. 1991a. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1942-1949.
- Grotenhuis, J.T.C., van Lier, J.B., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. 1991b. Effect of ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N-tetraacetic acid (EGTA) on stability and activity of methanogenic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 109-114.
- Guiot, S.R., Pauss, A. and Costerton, J.W. 1992a. A structured model of the anaerobic granule consortium. *Wat. Sci. Tech.* 25(7): 1-10.
- Guiot, S.R., Arcand, Y. and Chavarie, C. 1992b. Advantages of fluidization on granule size and activity development in upflow anaerobic sludge bed reactors. *Wat. Sci. Tech.* 26(3/4): 897-906.
- Harmsen, H.J.M. 1996. Detection, phylogeny and population dynamics of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in anaerobic granular sludge. Ph. D.Thesis. Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Hayat, M.A. 1981. Fixation for electron microscopy, pp. 1-471. Academic Press, Inc. New York.
- Hickey, R.F., Wu, W.; Veiga, M.C. and Jones, R. 1991. Start up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Wat. Sci. Tech.* 24(8): 207-255.
- Howgrave-Graham, A.R., Wallis, F.M. and Steyn, P.L. 1991. A bacterial population analysis of granular sludge from an anaerobic digester treating a maize-processing waste. *Biores. Technol.* 37: 149-156.
- Hulshoff-Pol, L.W. 1989. The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. Ph.D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Kosaric, N., Blaszcayk, R., Orphan, L., Valladares, J. 1990. The characteristics of granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Wat. Res.* 24: 1473-1477.
- Kugelman, Y.J. and Chin, K.K. 1971. Toxicity, synergism and antagonism in anaerobic waste treatment processes. *Adv. Chem. Ser.* 105: 55-90
- Lettinga, G. 1994. Anaerobic treatment of very low strength and cold industrial and domestic sewage, pp. 155-167. *In*: M. Viñas, M. Soubes, L. Borzacconi, L. Muxi (eds.). III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, Uruguay, 25-28 Octubre 1994.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W. and Klapwijk, A. 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 699-734.
- Macario, A.J.L., Visser, F.A., van Lier, J.B. and Conway de Macario, E. 1991. Topography of methanogenic subpopulation in a microbial consortium. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2179-2189.
- Mc Carty, P.L. and Smith, D.P. 1986. Anaerobic wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 20: 1200-1206.

- Mahoney, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N. and Murray, R.G.E. 1987. The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. *Wat. Sci. Tech.* 19(1/2): 249-260.
- Metcalf & Eddy, Inc. 1991. *Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse*. Mc Graw Hill, Inc., third edition.
- Monroy, O., Vázquez, E.F., Derramadero, J.C. and Guyot, J.P. 1995. Anaerobic-Aerobic treatment of cheese wastewater with national technology in Mexico: The case of "El Sauz". *Wat. Sci. Tech.* 32(12): 149-156.
- Monroy, O., Famá, G., Laguna, A., Prunier, S. et Macarie, H. 1996. Pulvérisation de boues granulaires traitant des eaux usées de fromagerie. 6 pp. *In: Journées Industrielles sur la Digestion Anaérobie JIDA-96*. Narbonne, Francia.
- Ojeda Urbano, E.O. 1996. Tratamiento anaerobio de aguas residuales de Bavaria S.A. pp. 293-301. *In: O. Rojas y L. Acevedo (eds). IV Seminario Taller Latinoamericano de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales*. Bucaramanga. Colombia.
- Perle, M., Kimchie, S. and Shelef, G. 1995. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Wat. Res.* 29: 1549-1554.
- Quarmby, J. and Forster, C.F. 1995. A comparative study of the internal architecture of anaerobic granular sludges. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 63: 60-68.
- Speece, R.E. 1996. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press. New York, USA.
- Stams, A.J.M. 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 66: 271-294.
- Ten Brummeler, E., Hulshoff-Pol, L.W., Dolfing, J., Lettinga, G. and Zehnder, A.J.B. 1985. Methanogenesis in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at pH 6 on an acetate-propionate mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1472-1477.
- Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B. and Verstraete, W. 1995a. Different types of sludge granules in UASB reactors treating acidified wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 329-337.
- Toerien, D.F. and Hattingh, W.H.J. 1969. Anaerobic Digestion. I. The microbiology of anaerobic digestion. *Review Paper. Wat. Res.* 3: 385-416.
- van der Merwe, M. and Britz, T.J. 1993. Anaerobic digestion of Baker's yeast factory effluent using an anaerobic filter and a hybrid digester. *Biores. Technol.* 43: 169-174.
- Viñas, M., Borzacconi, L. and Martínez, J. 1994. Anaerobic treatment of yeast manufacturing wastewater in UASB reactors. *Environ. Technol.* 15: 79-85.
- Visser, F.A., van Lier, J.B.; Macario, A.J.L. and Conway de Macario, E. 1991. Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1728-1734.
- Wanner, O. and Reichert, P. 1996. Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 172-184.
- Winter, J., Zellner, G. and Vogel, P. 1988. Comparison of anaerobic whey and whey permeate treatment by immobilized and suspended methanogenic consortia, pp. 617-618. *In: A. Tilche and A. Rozzi (eds). Poster Papers, Proc. of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion*. Monduzzi Editore, Bologna.
- Wu, W.M., Hickey, R.F. and Zeikus, J.G. 1991. Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3438-3449.

Wu, W., Jain, M., Conway de Macario, E., Thiele, J.H. and Zeikus, J.G. 1992. Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 282-290.

Wu, W., Thiele, J.H., Jain, M.K., Pankratz, H.S., Hickey, R.F. and Zeikus, J.G. 1993. Comparison of rod versus filament-type methanogenic granules: Microbial population and reactor performance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 795-803.

Zellner, G., Vogel, P., Kneifel, H. and Winter, J. 1987. Anaerobic digestion of whey and whey permeate with suspended and immobilized complex and defined consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 306-314.

---