



CASA ABIERTA AL TIEMPO

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Ciencias Biológicas y de la Salud

Evaluación de una técnica de Tamizado para
determinar la granulometría de lodos de
Reactores UASB

Tesis

Para obtener el grado de
Especialidad en Biotecnología

Presenta

I.B.I. Acela del Rosario Laguna López

MEXICO, D. F.

15 de Diciembre de 1999



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
Ciencias Biológicas y de la Salud

**Evaluación de una técnica de Tamizado para
determinar la granulometría de lodos de Reactores
UASB**

Presentada por:

I.B.I Acela del Rosario Laguna López

Jurado formado por:

Dr. Jorge G. Gómez Hernández
Dr. Hervé Macarie
M. en C. Rosa Obdulia Gonzalez Robles

Presidente
Vocal
Secretario

15 de Diciembre de 1999

Dedico esta Tesis a :

JUAN por todo el amor y comprensión que me da día a día y a mi pequeño **EDGAR** que es la luz de nuestras vidas, a ellos que me motivan para seguir adelante.

A mi mamá **BERTHA** y **CUCA** que gracias al cariño y apoyo que siempre me han dado he podido superarme.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Hervé Macarie investigador del "Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération" (ORSTOM), Francia.

Agradezco muy especialmente a mi asesor el Dr. Hervé Macarie por el apoyo, dirección y comprensión que recibí durante el desarrollo de mi trabajo en el Laboratorio de Microbiología Ambiental.

Deseo expresar en particular mi agradecimiento al Dr. Oscar Monroy por haberme brindado la oportunidad de colaborar con él en éste laboratorio.

Agradezco también a mi asesora la M en C. Rosa Obdulia González Robles del Departamento de Matemáticas quien dedicó tiempo para guiar mi trabajo de estadística, con paciencia y enseñandome sus conocimientos.

Al Dr. Aboubakar S. Ouattara de la Universidad de Ouagadougou en Burkinafaso, Africa le agradezco por haberme ayudado muy amablemente a realizar el análisis de imagen desarrollado en este trabajo.

Con gratitud al Dr Jorge Gómez por el tiempo dedicado a la corrección de mi trabajo.

Al personal de la empresa Central de Malta por haber facilitado la obtención de muestras para la realización de éste trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio que siempre me apoyaron : Carmen Fajardo, Florina Ramirez, Margarita Salazar, Mónica Meraz, Maricela Ezquivel, Antonieta Sosa, Julieta Alvares, Patricia Castilla, Zenia Gutierrez, Jacobo Ramírez, Oscar García, Abelardo Hernández, Miguel Marquez, Sébastien Thierry.

	Páginas
3.2.5.1 Análisis de varianza	11
3.2.5.2 Prueba de Tukey	13
3.2.5.3 Prueba de Kolmogorov-Smirnov	14
3.2.5.4 Regresión lineal	14
3.2.5.5 Prueba t de Student	15
4. Resultados y Discusión	16
4.1 Recuperación de los sólidos suspendidos	16
4.2 Reproducibilidad	18
4.3 Efecto del volumen de lodo empleado	21
4.4 Efecto de emplear una solución amortiguadora de fosfatos o agua corriente para el lavado del lodo	23
4.5 Efecto de conservación del lodo sobre la granulometría a dos temperaturas (T ambiente y 4 °C)	25
4.6 Análisis de Imagen	27
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía.	30
7. Anexo	33

Resumen

Cuatro técnicas (observación al microscopio, cálculo a partir de las velocidades de sedimentación, análisis de imagen, análisis láser) son actualmente disponibles para determinar la distribución de tamaño de las partículas de un lodo de reactor UASB ("Upflow Anaerobic Sludge Blanket"). Estas técnicas presentan desafortunadamente la desventaja de ser laboriosas, imprecisas, ó costosas y difícilmente aplicables a escala industrial en plantas de tratamiento de aguas residuales. Por lo tanto existía la necesidad de una técnica sencilla y barata. En este estudio se evaluó una técnica de granulometría basada sobre un tamizado húmedo manual. Se mostró que no había pérdida de sólidos durante el tamizado y que el perfil de distribución de tamaño de partículas era reproducible usando 5, 10, 25 y 150 ml de lodo pero no 1 ml. Solo los resultados obtenidos con 10 y 25 ml fueron totalmente comparables. Se mostró también que el tamizado podía ser realizado sobre muestras de lodo almacenadas hasta 50 días en el refrigerador y que el agua corriente podía ser empleada para las operaciones de lavado y de retrolavado sin ningún impacto sobre el perfil de distribución de tamaño. La granulometría obtenida por el análisis de imagen no fue comparable a la obtenida por el tamizado. No obstante, ninguna evidencia de erosión de los gránulos durante el tamizado pudo ser encontrada. De todos modos esta técnica permite seguir sin problema la evolución de la granulometría de un lodo con respecto al tiempo ó comparar la granulometría de varios lodos. En consecuencia el tamizado húmedo manual parece ser una técnica adecuada para determinar la distribución de tamaño de los gránulos de lodos de reactores UASB.

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

En los últimos años la digestión anaerobia ha tenido una aceptación importante para el tratamiento de aguas residuales, tanto industriales como urbanas, debido a su bajo costo comparado con los sistemas de tratamientos biológicos aerobios y fisicoquímicos (Eckenfelder *et al.*, 1988).

De todos los tipos de digestores desarrollados, el reactor de lecho de lodo y flujo ascendente o UASB por sus siglas en inglés ("Upflow Anaerobic Sludge Blanket") ha tenido la mayor aceptación comercial. Esto es debido en gran parte a la ausencia de soporte para fijar la biomasa lo que se ha traducido en costos menores (Lettinga *et al.*, 1980).

El funcionamiento de los reactores UASB está basado sobre la retención de biomasa por sedimentación. Altas velocidades de sedimentación son obtenidas gracias a la floculación de los microorganismos en gránulos compactos que pueden alcanzar varios mm de diámetro (Lettinga *et al.*, 1980). El incremento de sedimentabilidad es debido esencialmente al aumento de tamaño de las partículas que componen el lodo. La cama de lodo de un reactor UASB generalmente no está constituida por gránulos de tamaño uniforme, al contrario presenta una distribución amplia de gránulos de varios diámetros. La determinación de la distribución de tamaño de estas partículas es entonces muy importante en el seguimiento de un reactor UASB, o para identificar los parámetros que favorecen el fenómeno de granulación. Esto ha dado origen al desarrollo de varias técnicas que permiten determinar esta distribución. Actualmente cuatro técnicas diferentes son empleadas.

La primera técnica descrita por Hulshoff Pol *et al.* (1989) y Mahoney *et al.* (1987) está basada en la inmovilización de una cantidad de gránulos en una caja petri con agar. Después de homogeneizar se observan los gránulos fijados, con un microscopio estereoscópico cuyo ocular está equipado con un graticulo y se mide el diámetro de 100 gránulos. Esta técnica es muy laboriosa, cansada para realizar y depende del operador. Además ocupa volúmenes pequeños y esto puede dar valores imprecisos.

La segunda técnica conocida como de sedimentación (Hulshoff Pol *et al.*,1989; Grotenhuis *et al.*,1991) esta basada en las diferencias de velocidad de sedimentación de los diferentes tamaños de gránulos. Arriba de una columna que contiene agua se coloca un volumen de lodo, cuyas partículas van a sedimentar a velocidades diferentes dependiendo de su diámetro. En la parte inferior de la columna hay una balanza que registra el peso en función del tiempo. Conociendo la altura de la columna se puede deducir cual fracción en peso del lodo sedimenta a una cierta velocidad. El diámetro de las partículas se obtiene por calculo a partir de los Números de Reynolds y Galileo los cuales hacen intervenir la velocidad de sedimentación de las partículas y su densidad. Esta técnica es poco precisa, y se obtiene el diámetro del gránulo de manera indirecta.

La técnica del microscopio estereoscópico puede ser refinada, acoplándole un sistema de análisis de imagen que calculará automáticamente el diámetro de las partículas, su volumen y masa (Grotenhuis *et al.*,1991; Dudley *et al.*,1993). La preparación de la muestra se hace de manera idéntica a la del microscopio esteroscópico. La diferencia consiste en que este último esta equipado de una cámara de video conectada a una computadora cargada con el programa de análisis adecuado. Esta técnica es muy costosa, laboriosa y no se pueden detectar partículas inferiores a 0.149 mm. Tiene sin embargo la ventaja de permitir hacer una serie de calculos a partir de los valores obtenidos y entre ellos determinar el diámetro promedio de las partículas. Recientemente una adaptación de esta técnica ha permitido eliminar el microscopio y la cámara de video, reemplazandolos por un escaner de computadora, lo que abarata los costos (Jeison y Chamy, 1998).

La cuarta técnica consiste en hacer un análisis de distribución de tamaño por Laser (Yan y Tay, 1997). Ha empezado a ser aplicada muy recientemente porque por fin permite determinar el diámetro de partículas grandes, hasta 2.5 mm cuando antes estaba limitada a diámetros del orden de 0.1 mm.

Ninguna de las técnicas descritas anteriormente puede ser aplicada, dado su complejidad o su costo, a nivel de las plantas de tratamiento de aguas residuales y son restringidas al laboratorio. Se necesita por lo tanto una técnica sencilla, poco costosa

que se pueda realizar tanto a escala industrial como de laboratorio. Un simple tamizado húmedo del lodo podría cumplir con este requisito, dado que necesita solamente de un juego de tamices, una centrífuga ó un dispositivo de filtración y una estufa disponibles en cualquier laboratorio de análisis de aguas residuales.

La técnica de tamizado húmedo ya ha sido empleada por varios autores para este propósito (Noyola y Kano, 1994; Tur y Huang, 1997; Yoda y Nishimura, 1997). Sin embargo su validez nunca ha sido evaluada respecto a reproducibilidad, volumen de lodo empleado, naturaleza del solvente de lavado, tiempo y temperatura de almacenamiento. Realizar tal evaluación es indispensable dado que basándose sobre los resultados de tamizados de lodos no granulares de digestores urbanos (Leschber and Haacke, 1975), algunos autores piensan que el tamizado causa una erosión de los gránulos y que por lo tanto da una distribución de diámetro errónea (Hulshoff Pol, 1989).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar y evaluar una técnica de Tamizado para determinar el tamaño de las partículas que constituyen un lodo biológico anaerobio.

2.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la presencia o ausencia de pérdida de sólidos suspendido durante el tamizado.
- Evaluar la reproducibilidad de la técnica de tamizado.
- Evaluar el efecto del volumen de lodo empleado (1, 5, 10, 25 y 150 ml)
- Comparar cual es el efecto de emplear una solución amortiguadora de fosfatos ó agua corriente (de la llave) en el lavado del lodo.
- Evaluar cual es el efecto de conservación del lodo a dos temperaturas (4 °C y T ambiente de 20 a 30 °C) sobre su granulometría.
- Comparar los resultados obtenidos con la técnica de análisis de imagen.

MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Fuente del lodo granular

El lodo empleado para el estudio proviene de un reactor UASB de 2400 m³, que trata a una carga de 2.69 Kg DQO/m³.d, el agua poco concentrada (1300 - 1700 mg DQO/l) de la maltería "Central de Malta" la cual pertenece al grupo de Cervecería Cuauhtemoc Moctezuma y esta localizada en Grajáles Puebla (Monroy *et al.*, 1997).

El lodo fue muestreado en dos ocasiones separadas por tres meses y conservado en garrafones de plástico (colocados en el refrigerador) para posteriormente hacer los análisis. El efecto del almacenamiento sobre la granulometría fue evaluado con la segunda muestra y todos los demás factores con la primera.

3.1.2 Solución amortiguadora de fosfatos

Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos para el lavado y retrolavado del lodo, cuya composición se muestra en el cuadro 1. El hecho de adicionar el fosfato dibásico como una mezcla de sales de sodio y de potasio tenía como objetivo evitar poner los gránulos en presencia de una concentración de Na ó de K potencialmente tóxica. La mezcla de Na y de K permite además ponerse en condiciones de antagonismo y por lo tanto reducir la toxicidad de cada uno de estos iones tomado individualmente.

Cuadro 1. Composición de la solución amortiguadora

REACTIVO	g/L de solución
K ₂ HPO ₄	4
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	5,09
KH ₂ PO ₄	1,08
pH de la solución 7,5	

3.2 METODOS

3.2.1. Muestreo del lodo

El lodo se homogeneizó agitando el garrafón en donde estaba almacenado y luego se transfirió a un vaso de precipitado de 2 l de donde rápidamente se tomó la muestra para analizarla. En función del volumen a probar las muestras se tomaron con cucharas calibradas (para 25 y 150 ml) o pipetas despuntadas (para 1, 5 y 10 ml)

3.2.2. Técnica de Tamizado

El tamizado se realizó con 5 tamices de acero inoxidable de 8 pulgadas de diámetro con una apertura de malla de 2, 0.925, 0.76, 0.59 y 0.23 mm. Se colocaron en forma vertical uno encima del otro en orden de mayor a menor diámetro de arriba hacia abajo, como se muestra en la Figura 1.

En la primera malla con un diámetro de 2 mm que se encuentra en la parte superior se vacía la muestra de lodo, enseguida se realiza un lavado del lodo con la solución amortiguadora de fosfatos descrita anteriormente o agua de la llave (Figura 2).

Como las mallas estan colocadas en orden de mayor a menor diámetro de arriba hacia abajo al momento de hacer el lavado, los gránulos van pasando a través de las mallas de acuerdo a su tamaño quedando en cada una, cierta porción de ellos (Figura 3).

Los gránulos retenidos sobre las mallas son recuperados en un vaso de precipitado mediante un retrolavado con la solución amortiguadora de fosfatos o agua corriente (Figura 4).



Figura 1. Tamices de diferentes diámetros utilizados para realizar la granulometría.

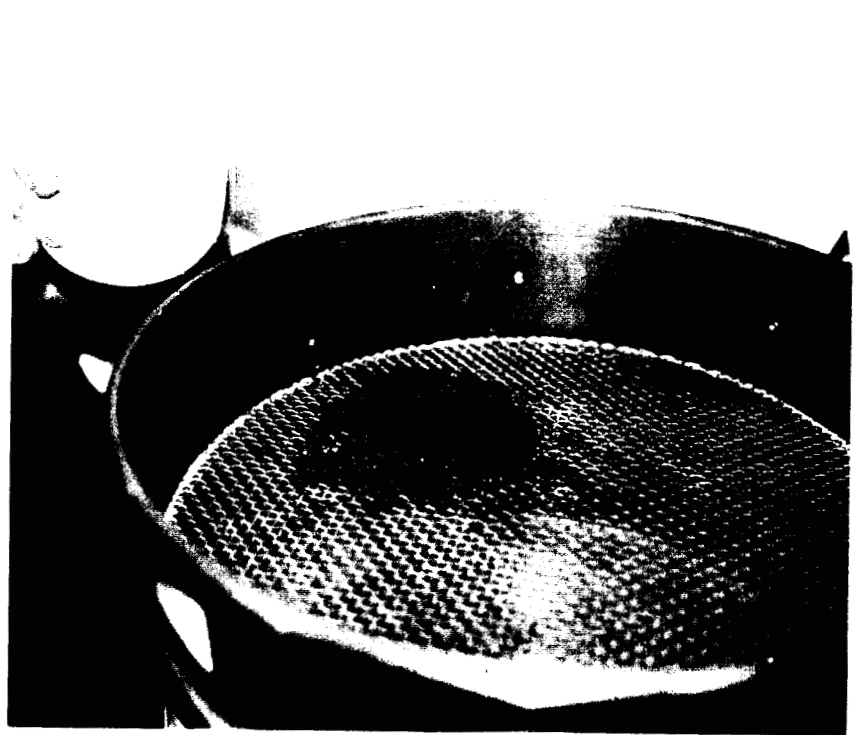


Figura 2. Tamices de 2 mm donde se colocó la muestra de lodo.

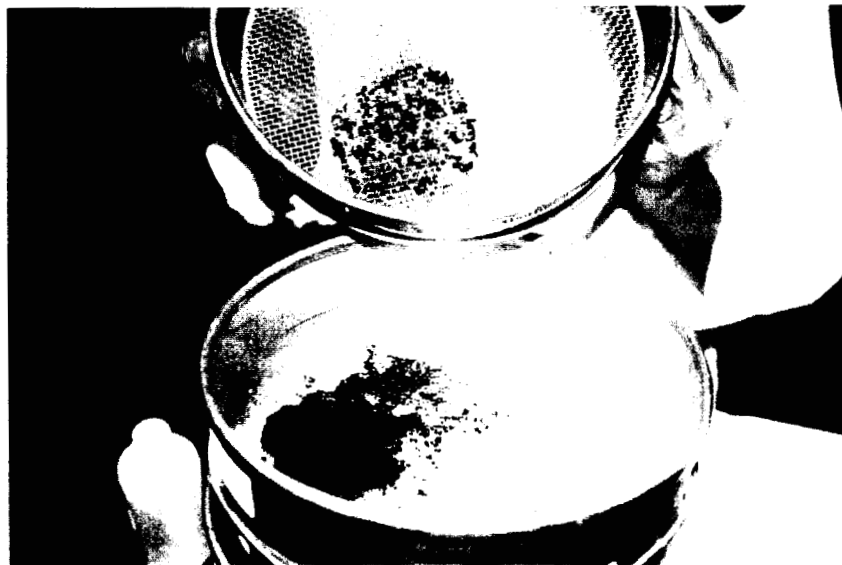


Figura 3. Tamices con lodos retenidos



Figura 4. Retrolavado de los lodos.

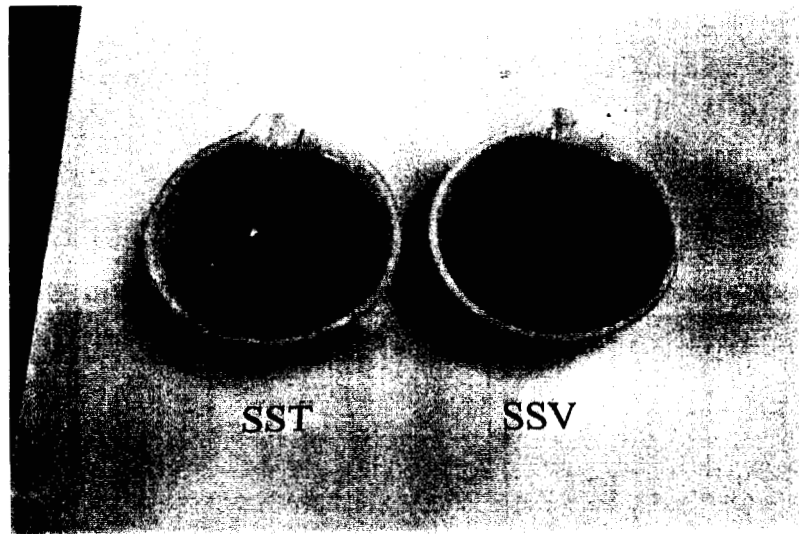


Figura 5. Crisoles donde se colocan los lodos para determinar los SST y SSV.

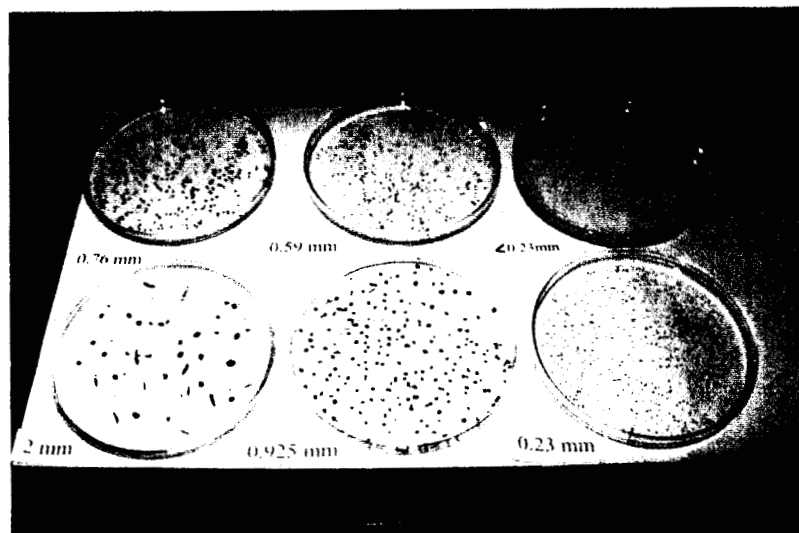


Figura 6. Distribución de los gránulos de lodo de acuerdo a su tamaño en cda tamiz.

Los gránulos recuperados son posteriormente centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos. Después se tira el sobrenadante y el residuo sólido restante se coloca en un crisol de porcelana que previamente es puesto a peso constante para determinar sus Sólidos Suspendidos Totales (SST) y sus Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) (Figura 5).

En la Figura 6 se puede apreciar visualmente la separación de los gránulos por tamaño que se logra gracias al tamizado.

3.2.3 Determinación de los SST y SSV

Los crisoles con el lodo se colocan en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Después se transfieren a un desecador durante 1 hora y posteriormente son pesados. La diferencia de peso del crisol vacío y del crisol con el lodo ya seco nos da el valor de los SST en gramos. Para determinar los SSV, estos mismos crisoles son puestos en un horno a 550°C durante una hora para volatilizar la materia orgánica, después se transfieren a una estufa a 105 °C y luego a un desecador. La diferencia de peso del crisol con lodos secos y del crisol después de calcinar nos da el valor de los SSV en gramos. Una descripción completa del procedimiento se encuentra en APHA (1992).

En la Tabla 1, se muestra un ejemplo de la hoja de cálculo que se utilizó para determinar los SST y SSV retenidos en cada tamiz, los cuales corresponden a gránulos con un diámetro superior o igual a la malla del tamiz donde se encuentran e inferior a la malla del tamiz superior. Este intervalo de tamaños es llamado clase de diámetro. La hoja permite también calcular el porcentaje que representa cada uno de estas clases con respecto a la masa total de SST y SSV tamizada (= a la suma de SST ó SSV sobre cada tamiz). Sólo este porcentaje es empleado para evaluar la técnica porque es teóricamente independiente de la masa de SST y SSV tamizada, lo que permite minimizar al máximo, los errores experimentales. Finalmente, a partir del volumen de lodo tamizado y de la masa de SST y SSV recuperada, la hoja permite también de calcular la concentración del lodo en SST y SSV.

Tabla 1. Resultados obtenidos después de realizar una granulometría.

Fracción del Lodo	Clases de diámetros mm	Peso crisol vacío (g)	Peso a 105 °C (g)	Peso a 550 °C (g)	SST (g)	SSV (g)	% en SST de cada fracción	% en SSV de cada fracción
1	2 < D	35.4245	35.527	35.4475	0.1025	0.0795	5.41	5.70
2	0.925 < D < 2	29.5883	30.8109	29.8363	1.2226	0.9746	64.52	69.90
3	0.76 < D < 0.925	26.3393	26.3828	26.3512	0.0435	0.0316	2.30	2.27
4	0.59 < D < 0.76	35.7579	35.7991	35.773	0.0412	0.0261	2.17	1.87
5	0.23 < D < 0.59	30.469	30.5313	30.4915	0.0623	0.0398	3.29	2.85
6	D < 0.23	31.8054	32.2279	31.9852	0.4225	0.2427	22.30	17.41
					Total SST (gramos)	Total SSV (gramos)		
volumen de la muestra: 25 ml					1.8948	1.3943		
					Total SST (g/L)	Total SSV (g/L)		
					69.41	51.07		

3.2.4 Análisis de Imagen

La técnica de análisis de imagen se realizó en el Instituto de Biotecnología (BRI/IRB) del Consejo Nacional de Investigación del Canadá (NRCC/CNRC) en Montréal.

3.2.4.1 Determinación de la fracción en masa que representan los gránulos menores de 0.149 mm

Primero se realiza una granulometría utilizando un tamiz con una malla de 0.149 mm abajo del cual se coloca un papel filtro whatman GF/F (0.7µm). Tanto el tamiz como el filtro son previamente puestos a peso constante. Se instala un equipo de filtración en el cual son colocados el tamiz y el papel filtro. Se pone sobre el tamiz 1 ml de muestra de lodo la cual es lavada con aproximadamente 30 ml de agua destilada. El

tamiz tiene como objetivo de eliminar las partículas inferiores a 0.149 mm, las cuales no pueden ser detectadas por el sistema de análisis de imagen y son retenidas en el papel filtro. Posteriormente el papel filtro y el tamiz se colocan en una estufa a 105°C durante toda la noche, después son enfriados en un desecador durante 15 minutos y luego pesados. Se calcula el porcentaje que los gránulos inferiores y mayores a 0.149 mm, representan en la masa total de SST filtrada.

3.2.4.2 Determinación de la distribución de tamaño de los granulos mayores a 0.149 mm

En el mismo equipo de filtración se coloca unicamente y sin ponerlo a peso constante el tamiz de 0.149 mm. Como en el caso anterior se coloca después 1 ml de muestra de lodo sobre el tamiz y se enjuaga con 30 ml de solución amortiguadora de fosfatos. Una fracción de los gránulos retenidos sobre el tamiz son puestos en una caja de Petri con un diámetro de 3.5 cm y se les adiciona un volumen de solución amortiguadora de fosfatos suficiente para cubrirlos. La caja de Petri es observada con un microscopio estereoscópico (Wild, Heerbrugg, Suiza) equipado de una cámara de video conectada a un sistema de Análisis de Imagen Q520 (Cambridge Instruments Ltd, Cambridge, Reino Unido). Este sistema determina automáticamente el diámetro equivalente de cada gránulo. Este valor corresponde al diámetro de una esfera con una superficie idéntica a la de las partículas. El análisis de imagen da por lo tanto, una distribución de diámetro (D) por número de gránulos. A manera de poder comparar los resultados con los del tamizado, esta distribución debe ser convertida a una distribución de diámetro por peso. Asumiendo que todos los gránulos tienen la misma densidad, las distribuciones por masa (M), y por volumen (V) son iguales dado que $M = (V * \text{densidad})$. Los gránulos siendo asimilados como esferas, su volumen puede ser fácilmente evaluado ($V = 1/6 D^3$). El procedimiento consiste después, (1) en clasificar los gránulos por incremento de diámetro, (2) en agruparlos por clases de tamaño correspondiente a los del tamizado (<0.23, [0.23 - 0.59 [, [0.59 - 0.76 [, [0.76 - 0.925 [, [0.925 - 2 [, > 2 mm), (3) en calcular para cada clase de diámetro el volumen que representan todos los gránulos que contienen y finalmente (4) determinar en porcentaje; la fracción que cada clase de tamaño representa con respecto al volumen total (V_t) de gránulos encontrados en la muestra ($V_t = \text{suma de los volúmenes individuales } (v_i) \text{ de todos los gránulos detectados por el análisis de imagen} + \text{volumen de partículas inferiores a } 0.149 \text{ mm} = \sum v_i / [M_{0.149} / M_t]$, en donde $M_{0.149}$ corresponde a la masa de gránulos < 0.149 mm y M_t a la masa total de lodo tamizado).

3.2.5 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos que se utilizaron y que se describen a continuación : Análisis de Varianza (Anova), Kolmogorov-Smirnov, prueba t de student, regresión lineal, se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 7.5 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL., USA).

3.2.5.1 Análisis de Varianza

El análisis de varianza (Anova) es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada una de los cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación o la variación total (Marques de Cantú, 1991).

En este trabajo se utilizaron tanto el análisis de varianza de dos criterios y su interacción, como el de un criterio. El primero se utilizó para probar el efecto de diámetro, solución amortiguadora de fosfato (o agua) y la interacción diámetro solución, sobre la variable % de SST. El segundo se utilizó para probar el efecto del volumen de lodo sobre el % de SST (realizandose un ANOVA para cada diámetro).

Debido a que en el ANOVA de un criterio se realizaron pruebas posteriores se describe a continuación el método utilizado.

Mediante el análisis de varianza de un sólo criterio de clasificación, se comparan más de dos medias o lo que es lo mismo, se prueba el efecto de tratamiento (el criterio de clasificación) sobre una variable respuesta determinada.

En este caso las hipótesis a probar son:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$ (todas las medias de tratamientos son iguales)

Versus.

H_a : al menos una μ_j difiere (para al menos un tratamiento la media difiere)

Cuando se rechaza la hipótesis nula (H_0), surge la pregunta acerca de cuáles pares de medias son diferentes. Por ejemplo, si se rechaza la hipótesis nula: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$, podrían deberse a uno ó varios de los seis pares de diferencias que se pueden tener, esto es: $\mu_1 \neq \mu_2$ ó $\mu_1 \neq \mu_3$ ó $\mu_1 \neq \mu_4$ ó $\mu_2 \neq \mu_3$ ó $\mu_2 \neq \mu_4$ ó $\mu_3 \neq \mu_4$.

Para determinar cuáles son los pares de medias que son diferentes, una vez que se ha rechazado la hipótesis nula en el ANOVA, se realiza cualquier prueba de comparaciones múltiples de medias (Duncan, Tukey, Honesta de Tukey, etc.). A continuación se describe la de Tukey por ser la que se utilizó en este trabajo (Marques de Cantú, 1991).

3.2.5.2 Prueba de Tukey

El estadístico (q) de la prueba de Tukey para probar que cualquier pareja de medias μ_i y μ_j no difieren es:

$$q = \frac{|\bar{X}_i - \bar{X}_j|}{\sqrt{cme/n}}$$

donde: \bar{X}_i y \bar{X}_j son las medias estimadas de μ_i y μ_j respectivamente
 $n =$ es el número de repeticiones
 $cme =$ es el cuadrado medio del error

En este trabajo se desea probar que las medias difieren a lo más en una cantidad δ que se fijó a 10%, es decir, el tipo de contraste de hipótesis a probar es:

$$H_0: |\mu_i - \mu_j| \leq \delta \text{ versus } H_a: |\mu_i - \mu_j| > \delta$$

y el estadístico que prueba que entre dos medias cualesquiera no existe una diferencia por arriba de δ , en este caso $\delta = 10$ es:

$$q = \frac{|\bar{X}_i - \bar{X}_j| - \delta}{\sqrt{cme/n}}$$

En cada caso el valor de q se contrasta con un valor de las tablas de rango studentizado (Marques de Cantú, 1991), tomando los grados de libertad del error en la tabla de anova.

3.2.5.3 Prueba de Kolmogorov - Smirnov

La prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov - Smirnov es una alternativa para probar que una muestra proviene de una determinada distribución (uniforme, normal etc.). Esta prueba se basa en la comparación entre la función de distribución acumulada de una distribución teórica $F(x)$ con la función de distribución acumulada de la muestra $F_m(x)$ (Marques de Cantú, 1991).

En este trabajo se utilizó la prueba de Kolmogorov - Smirnov con el fin de corroborar que los % de SST obtenidos para cada clase de diámetro en varias muestras de mismo volumen seguían una distribución uniforme. Permittiendonos este método probar la reproducibilidad de la técnica.

3.2.5.4 Regresión Lineal

El análisis de regresión es útil para determinar la forma probable de la relación entre las variables (la ecuación que relaciona a ambas variables) cuando hay un fenómeno de causa y efecto; y su objetivo principal es el de predecir o estimar una variable dependiente (y) en función de otra variable, llamada variable fija o independiente (x) (Marques de Cantú, 1991).

En este trabajo se utilizó regresión lineal simple para ajustar el modelo rectilíneo:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$$

donde:

x = el tiempo, medido en días

y = %SST (para un diámetro determinado)

ε = error

β_0 = ordenada al origen

β_1 = pendiente

Realizándose los ajustes al modelo anterior para cada diámetro, tanto cuando las muestras se conservaron en el refrigerador, como cuando se conservaron a temperatura ambiente.

La hipótesis a probar, en cada uno de los casos es :

$$H_0 : \beta_1 = 0 \quad \ll \text{La pendiente es cero} \gg$$

versus

$$H_a : \beta_1 \neq 0 \quad \ll \text{La pendiente no es cero} \gg$$

3.2.5.5 Prueba t de Student

La prueba t de student permite comparar las medias de dos poblaciones independientes.

En este trabajo se compararon las medias de % de SST obtenidos por el método de tamizado (volumen de muestra de 1 ml) y por el de análisis de imagen , para cada diámetro.

Las hipótesis a probar en cada caso son :

$$H_0 : \mu_t = \mu_i$$

versus.

$$H_a : \mu_t \neq \mu_i$$

Donde μ_t es la media de % de SST obtenida por tamizado, en un diámetro determinado, y μ_i la obtenida por análisis de imagen.

RESULTADOS Y DISCUSION

RECUPERACION DE LOS
SOLIDOS SUSPENDIDOS

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Recuperación de los Sólidos Suspendidos

Un punto importante a evaluar fue saber si la determinación de la granulometría por tamizado incluía bien todas las partículas suspendidas (SS) presentes en las muestras. Es decir comprobar si existía una pérdida de SS durante el tamizado.

Para esto, por un lado, se hicieron las determinaciones directas sin tamizado de los SST y SSV de 10 muestras de lodo utilizando un volumen de 25 ml para cada una. Por otro lado, se hicieron 10 granulometrías (tamizados) utilizando 25 ml de lodo y se determinó para cada una, la suma de los SST y SSV retenidos en los diferentes tamices. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.

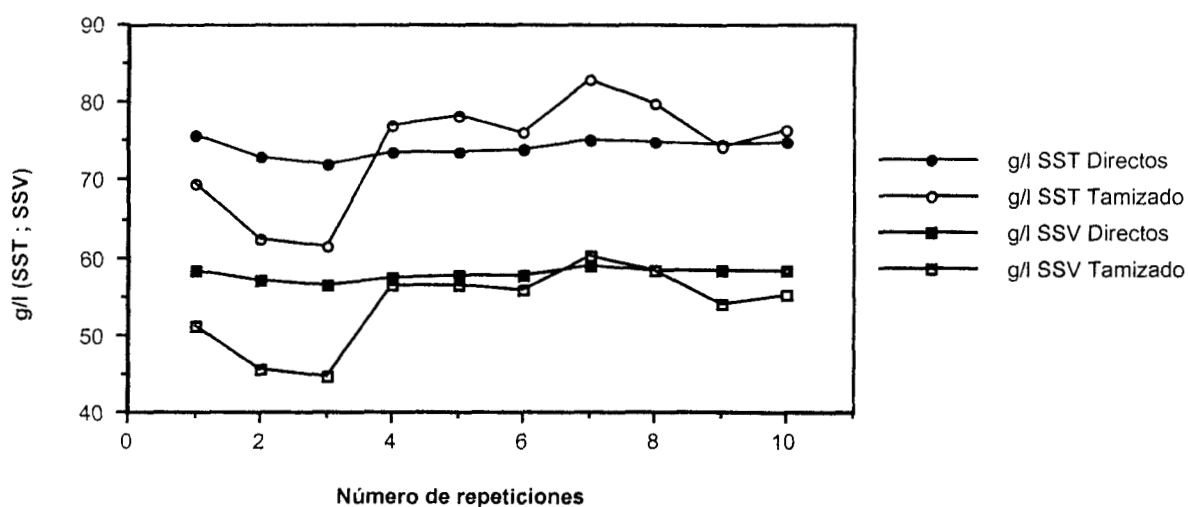


Figura 7. SST y SSV de 10 muestras de lodo determinados directamente y después de tamizado

Los valores de las medias obtenidas para los SST después de realizar el tamizado y sin tamizar fueron muy similares 73.79 g/l (± 7.12) y 74.08 g/l (± 1.08), respectivamente. Para los SSV la diferencia fue más notable, las medias obtenidas siendo 57.84 g/l (con una desviación estandar de 0.75) sin tamizar y 53.75 g/l (con una desviación estandar de 5.21) después de tamizar. Un análisis de varianza que comparó los valores de las medias para los SST y SSV con y sin tamizar confirmó que no existe diferencia significativa para los valores de los SST, pero si existe diferencia significativa (a un nivel de 2.5 %) para los SSV. Ninguna explicación pudo ser encontrada para esta variación, excepto tal vez que la prueba debería haber sido realizada con un número más elevado de repeticiones. El análisis de varianza confirmó también la diferencia significativa en el caso de los SSV después de eliminar los 3 primeros puntos que parecían ser los que aportaban la variación más importante. Dado este resultado, para el resto de la evaluación de la técnica de tamizado, solo los SST fueron considerados.

REPRODUCIBILIDAD

4.2 Reproducibilidad

Otro criterio importante que debe cubrir una técnica de granulometría es la reproducibilidad. Con el fin de probarla, en una primera etapa se realizaron 10 tamizados usando 25 ml de lodo y solución amortiguadora de fosfatos para el lavado y retrolavado del lodo. Se determinó el % SST para cada clase de tamaño de gránulo (Figura 8). Como se puede observar un mayor % de SST corresponde a partículas con un tamaño superior a 0.925 mm (75.6%), así como un tamaño inferior a 0.23 mm (17%).

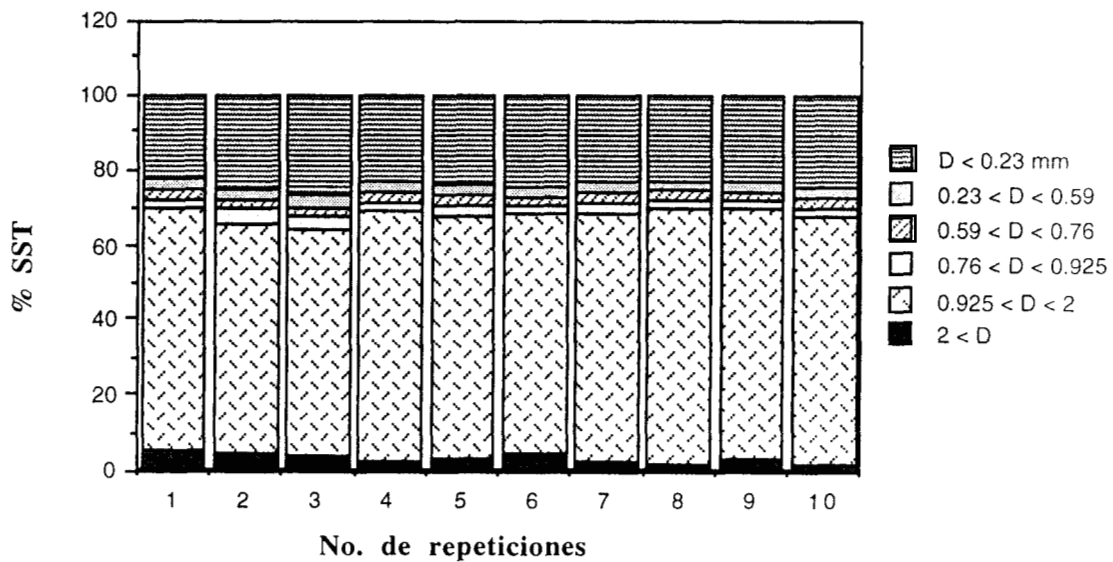


Figura 8. Reproducibilidad del tamizado para cada clase de tamaño de diámetro usando 25 ml de lodo y solución amortiguadora de fosfatos.

De los datos obtenidos en cada experimento se probó si seguían una distribución uniforme mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov, planteando las siguientes hipótesis.

H_0 : La distribución de los % de SST en cada diámetro es uniforme

Versus.

H_a : La distribución de los % de SST en cada diámetro No es uniforme

H_0 se rechaza si se tienen valores de significancia ≤ 0.05

Los resultados de la prueba de Kolmogorov Smirnov se muestran en la Tabla 2. Estos confirman que para ninguna de las clases de diámetros la hipótesis de distribución uniforme se puede rechazar, ya que los valores de significancia son muy altos (0.688, 0.629, 0.551, 0.348, 0.335, 0.323). Esto indica que efectivamente los % de SST se distribuyen de manera uniforme y por consiguiente el método es reproducible.

Tabla 2. Resultados de la prueba de Kolmogorov Smirnov para evaluar la reproducibilidad de 10 tamizados utilizando un volumen de 25 ml de lodo y solución amortiguadora de fosfatos para el lavado.

Clase de diámetro en mm	>2	[0.925-2[[0.76-0.925[[0.59-0.76[[0.23-0.59[<0.23	
Número de repeticiones	10	10	10	10	10	10	
Parámetro Uniforme							
Mínimo	1.83	60.11	2.30	2.09	2.35	22.30	
Máximo	5.41	67.11	3.63	2.66	3.63	26.61	
Extremo Mayor	Absoluto	0.226	0.299	0.302	0.237	0.295	0.252
Diferencias	Positivo	0.226	0.100	0.302	0.237	0.295	0.252
	Negativo	-0.100	-0.299	-0.100	-0.207	-0.100	-0.100
Kolmogorov - Smirnov Z	0.714	0.944	0.953	0.749	0.934	0.796	
Significancia	0.688	0.335	0.323	0.629	0.348	0.551	

A manera de confirmar, por otro lado, la reproducibilidad de la técnica se realizó también un análisis de Anova (Tabla 3), en el cual se comparó si las diferencias de las medias se debían a las clases de diámetros (<0.23, [0.23 - 0.59[, [0.59 - 0.76[, [0.76 - 0.925[, [0.925 - 2[, > 2 mm) o bien a cada uno de los experimentos realizados.

Tabla 3. Resultados del Análisis de Anova, utilizando los datos de los 10 tamizados realizados con 25 ml de lodo y solución amortiguadora de fosfatos.

		Método Unico				
		Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Distribución de Fisher	Significancia
Porcentaje	(Combinaciones)	31020.92	14	2215.780	1275.514	0.000
Efectos	experimento	6.507E-05	9	7.230E-06	0.000	1.000
	diámetro	31020.92	5	6204.184	3571.438	0.000
Error		78.172	45	1.737		
Total		31099.09	59	527.103		

Al realizar la comparación de medias se encontró que no existía diferencia significativa en cuanto a experimentos realizados, es decir, que al realizar cada experimento los porcentajes de SST obtenidos para cada diámetro fueron similares (significancia de 1 para el efecto experimento en la tabla 3). Sin embargo, como era de esperarse sí existe diferencia significativa (0.000) en cuanto a clase de diámetro, (esto es de un diámetro a otro), debido a que esto depende de las características de los lodos. Efectivamente, un lodo nunca tiene % SST idénticos para cada clase de tamaño.

También se realizaron granulometrías con un volumen de muestra de lodo de 1, 5, 10 y 150 ml. Para cada uno se hicieron los mismos análisis Kolmogorov Smirnov y Anova. Para todos ellos excepto 1 ml, se confirmó la reproducibilidad de la técnica.

EFECTO DEL VOLUMEN DE
LODO EMPLEADO

4.3 Efecto del volumen de lodo empleado

Es importante saber si no existe ninguna diferencia al utilizar un volumen de lodo pequeño o grande. A nivel industrial se pueden muestrear volúmenes grandes sin afectar el funcionamiento del reactor, sin embargo para un reactor de laboratorio no es posible ya que la cantidad de lodo es limitada generalmente a algunas centenas de ml.

Para esto, se realizaron en triplicado tamizados con 1, 5, 10, 25, y 150 ml de lodo. Excepto para 1 ml que presentaba una distribución de tamaño de partículas muy diferente a los demás volúmenes (Tabla 4), los resultados obtenidos con 5, 10, 25 y 150 ml fueron sometidos a un análisis de Anova para un factorial donde los factores a probar fueron diámetro y volumen (Tabla 5).

Tabla 4. Resultados de las medias obtenidas al realizar los tamizados por triplicado para los diferentes volúmenes (1, 5, 10, 25 y 150 ml)*.

Volúmenes ml	Tamaño de los gránulos en mm					
	>2	[0.925-2[[0.76-0.925[%SST	[0.59-0.76[[0.23-0.59[<0.23
1	0	36.02	4.5	14.07	15.06	30.36
5	1.46	63.07	2.91	4.34	5.13	22.49
10	1.56	64.23	2.82	2.49	3.33	25.56
25	1.96	67.85	2.61	2.12	2.88	22.55
150	0.85	70.72	1.71	1.57	4.58	20.56
Promedio	1.45	66.47	2.51	2.63	3.98	22.79

*Por razones de claridad solo los promedios son presentados.

Como era de esperarse hubo diferencia significativa debido a diámetro, pero no a volumen. Sin embargo, en la interacción diámetro volumen se encontró diferencia significativa (significancia de 0). Esto indica que hay diferencia entre medias de porcentajes de SST en algunos volúmenes para algunos diámetros.

Como tenemos 4 volúmenes (5, 10, 25 y 150 ml) se pueden realizar 6 diferentes comparaciones de medias para cada intervalo de diámetro, para saber en cual de ellos

las medias de porcentajes difieren. Se realizó una prueba de Tukey para comparaciones múltiples permitiendo un 10% de diferencia en las medias (10% es tolerable para este tipo de análisis).

Tabla 5. Resultados del Análisis de Anova, para probar el efecto de emplear diferentes volúmenes.

		Método Unico				
		Suma de Cuadrados	grados de libertad	Cuadrado medio	Distribución de Fisher	Significancia
Porcentaje	Efectos Medidos					
	Diámetros	39690.860	5	7938.172	60467.23	0.000
	Volumen	0.125	3	4.17E-02	0.318	0.812
	2 Interacciones					
	Diámetros *	175.521	15	11.701	89.133	0.000
	Volumenes					
	Error	6.301	48	0.131		
	Total	39872.80	71	561.589		

No se encontró diferencias significativas entre medias de porcentajes para los volúmenes de 10 y 25 ml. Sin embargo, algunas diferencias aparecieron para algunos diámetros entre los volúmenes de 5 y 150 ml y entre ellos y los demás volúmenes. Para el diámetro de 0.925 mm la media del volumen 5 difiere con la del volumen de 150, para el diámetro de 0.59 mm la media del volumen 5 difiere con la de los volúmenes 10, 25, y 150 ml y para el diámetro de 0.23 mm la media del volumen 5 difiere con la de 10 y 25. En el caso del volumen de 150 ml, las diferencias observadas con los demás volúmenes podría ser relacionada al hecho de que a pesar de usar más solución amortiguadora de fosfatos para lavar los gránulos (1600 ml contra 700 para 25 ml, 300 para 10 y 150 para 5 ml) la relación volumen de solución amortiguadora de fosfatos sobre volumen de lodo fue solamente de 10 en contra de 28 - 30 ml en los otros casos. Esto indica que la eficiencia del lavado fue baja y como consecuencia algunos gránulos pequeños no pudieron separarse de los grandes lo que se tradujo en una disminución del % SST en los diámetros menores y un aumento del % de SST en la fracción [0.925 - 2 [mm (Tabla 4).

EFECTO DE EMPLEAR UNA
SOLUCION AMORTIGUADORA
DE FOSFATOS O AGUA
CORRIENTE
PARA EL LAVADO DEL LODO

4.4 Efecto de emplear una solución amortiguadora de fosfatos o agua corriente para el lavado del lodo

Al iniciar la evaluación de la técnica para el lavado y retrolavado del lodo se utilizó una solución bufer de fosfatos, esto con el fin de mantener a los gránulos en un ambiente adecuado en terminos de pH y fuerza iónica. Sin embargo, a manera de simplificar el procedimiento, disminuir el costo de reactivos y tiempos de preparación, fue interesante determinar si era posible reemplazar la solución amortiguadora por agua corriente. Con este objetivo se realizaron tres tamizados utilizando solución amortiguadora y otros tres con agua corriente, ambos con 25 ml de lodo como muestra. Los resultados (Tabla 6) se sometieron a un Análisis de Varianza (Tabla 7) y posteriormente a una prueba de Tukey para comparaciones multiples con el fin de saber si la diferencia resultante entre las medias de % SST al usar las dos soluciones amortiguadora o agua, no era mayor de un 10%. Se encontró que no existía diferencia entre medias de % SST para ambas soluciones (significancia de 0.993 en la tabla 7). Estos resultados coinciden con los de Leschber y Haacke (1975), quienes también observaron que no había ninguna diferencia entre la distribución del tamaño de partículas de un lodo urbano digerido después de tamizarlo en presencia de agua destilada o agua corriente . Esto nos indica que el pH y la fuerza iónica del agua corriente son adecuados para este propósito o que el tamaño del gránulo es suficiente para que no sea afectado por el estress osmótico durante el tiempo (60 minutos al máximo) que dura el tamizado.

Tabla 6 Resultados de los porcentajes de SST promedios obtenidos al realizar los tamizados con agua corriente y solución amortiguadora de fosfatos*.

Soluciones	Diámetros de los gránulos en mm					
	>2	[0.925-2[[0.76-0.925[[0.59-0.76[[0.23-0.59[<0.23
	%SST					
Agua	0.98	71.18	2.28	1.81	2.57	21.17
Solución de fosfatos	1.96	67.86	2.61	2.13	2.88	22.56
Promedio	1.47	69.52	2.45	1.97	2.73	21.86

*Por razones de claridad solo los promedios son presentados.

Tabla 7. Resultados del Análisis de Anova, para probar el efecto de usar agua corriente o solución amortiguadora de fosfatos.

		Método Unico				
		Suma de Cuadrados	grados de libertad	Cuadrado medio	Distribución de Fisher	Significancia
Porcentaje	Efectos Medidos					
	Diámetros	21983.64	5	4396.729	33080.22	0.000
	Soluciones	1.111E-05	1	1.11E-05	0.000	0.993
	2 Interacciones					
	Diámetros * soluciones	21.354	5	4.271	32.132	0.000
	Error	3.190	24	0.133		
	Total	22008.19	35	628.805		

EFECTO DE LA CONSERVACION
DEL LODO A DOS
TEMPERATURAS (T ambiente y
4 °C) SOBRE
SU GRANULOMETRIA

4.5 Efecto de la conservación del lodo a dos temperaturas (T ambiente y 4 °C) sobre la granulometría.

El efecto de la conservación del lodo sobre la granulometría es un parámetro muy importante a estudiar, porque en ocasiones el análisis no puede hacerse al momento de tomar la muestra o bien se tiene que hacer en otro lugar. Por eso es necesario conocer cuanto tiempo la muestra puede estar almacenada y bajo que condiciones sin que se afecten las características que deben ser medidas. Para este objetivo se realizaron las siguientes pruebas. Se tomó una muestra de lodo que fue repartida en dos frascos, uno se dejó a temperatura ambiente y el otro se puso en el refrigerador. De ambas muestras cada 2 semanas se tomó un volumen de 25 ml de lodo y se realizó una granulometría por duplicado durante un periodo de 50 días.

A la temperatura del refrigerador, las curvas de % SST contra tiempo (Figura 9), son rectas horizontales con pendiente cero en las cuales no varia el % SST con respecto al tiempo. Esto nos muestra que a esta temperatura el % SST no cambia significativamente con el tiempo, indicando que el lodo puede estar almacenado hasta 50 días sin afectar sus características.

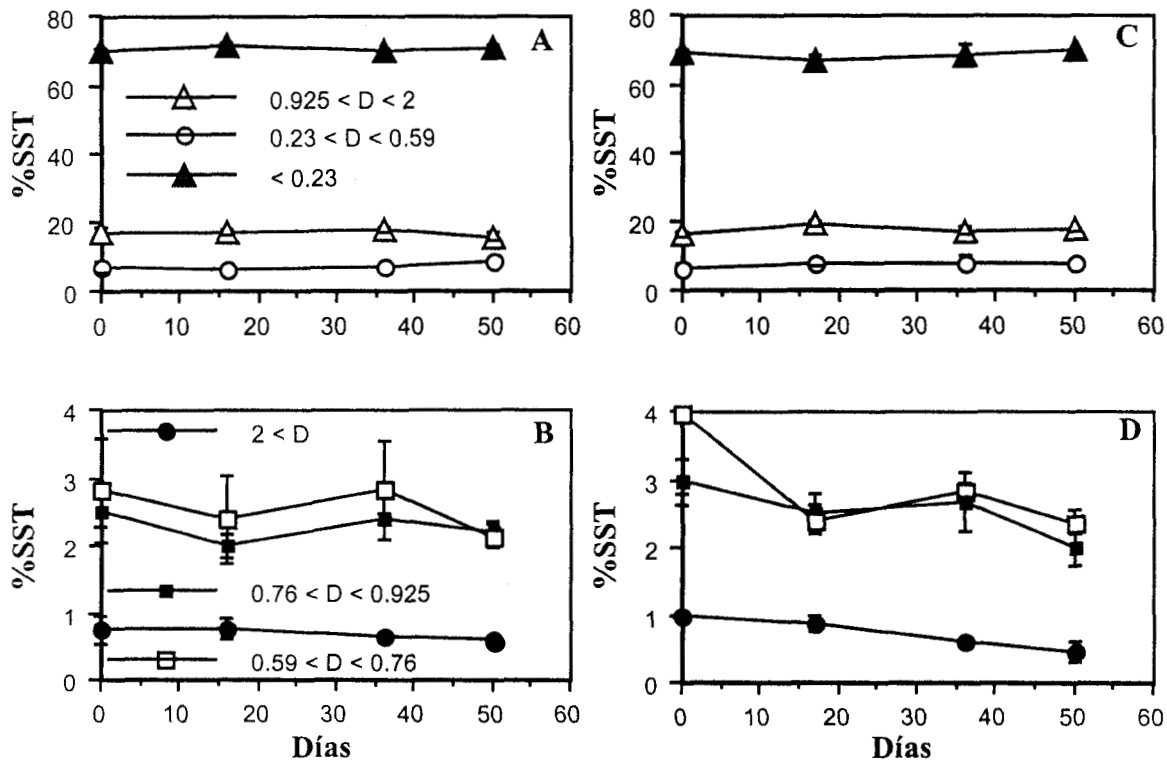


Figura 9. Evolución de la granulometría del lodo conservado a la temperatura del refrigerador (A,B) y a la temperatura ambiente (C,D). (Las barras representan la desviación estandar cuando no son visibles tienen el tamaño de los símbolos)

A temperatura ambiente, la situación fue diferente para los gránulos teniendo un diámetro $> 2\text{mm}$ y entre 0.76 y 0.925 mm . La pendiente de las líneas trazadas para estas dos clases de diámetro fueron significativamente diferentes de cero, indicando que el % SST en estos dos casos evolucionó con respecto al tiempo (Figura 9). El análisis estadístico de los datos se hizo usando una simple regresión lineal y una prueba t de student para el coeficiente tiempo. Los cambios con respecto a la temperatura ambiente, pudieron deberse a que en el periodo durante el cual los análisis fueron realizados la temperatura se incrementó arriba de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. En consecuencia, el comportamiento diferente observado a las dos temperaturas podría ser el resultado de actividades metabólicas distintas. La tasa de lisis bacteriana en condiciones de hambruna es efectivamente más importante a alta que a baja temperatura (Wu *et al.*, 1995), lo que podría explicar la reducción de tamaño observada.

ANALISIS DE IMAGEN

4.6 Análisis de Imagen

El análisis de imagen fue realizado sobre 12 muestras de 1 ml del lodo empleado para los tamizados. La distribución de tamaño obtenida (Tabla 8) fue muy diferente a los resultados del tamizado cual que sea el volumen de lodo empleado. Por ejemplo, en el análisis de imagen los gránulos mas grandes de 2 mm representan el 15 % del total de los SST contra menos del 2 % en el caso del tamizado.

Tabla 8. Medias de porcentajes de SST obtenidas para cada clase de tamaño de gránulo usando análisis de imagen y diferentes volúmenes para el tamizado

Volumen de muestra ml	Tamaño del gránulo (mm)					
	>2	[0.925-2[[0.76-0.925[[0.59-0.76[[0.23-0.59[<0.23
	% SST					
Tamizado						
1	0	36.02	4.5	14.07	15.06	30.36
5	1.46	63.07	2.91	4.34	5.13	22.49
10	1.56	64.23	2.82	2.49	3.33	25.56
25	1.96	67.85	2.61	2.12	2.88	22.55
150	0.85	70.72	1.71	1.57	4.58	20.56
Análisis de Imagen						
1	15.48	52.5	2.24	0.9	0.4	28.48

Se realizó una prueba t de student, para comparar los resultados del análisis de imagen con los obtenidos tamizando 1 ml de lodo, la cual demostró que para cada clase de tamaño de gránulo, excepto para el <0.23 mm la diferencia entre el % de SST de las dos técnicas fue significativa a un nivel de 0.05 o mayor. La variación observada no puede ser explicada sin embargo por la erosión del gránulo, dado que el tamiz de 2 mm es el primero que esta en contacto con el lodo y que su malla es demasiada grande para causar fuerzas cortantes importantes durante el paso de los granulos. En realidad la diferencia parece ser debida al hecho que el diámetro para el análisis de imagen es calculado asumiendo que los gránulos son esferas. Los lodos de Central de Malta contienen desafortunadamente una cierta cantidad de gránulos con forma fusoides. La superficie de estas partículas puede corresponder a una esfera con un diámetro mayor a 2 mm pero el hecho de que sean estrechas podría permitir

su paso en posición vertical a través del tamiz de 2 mm. Esto podría resultar para el análisis de imagen en un incremento artificial del % SST correspondientes a los gránulos grandes y a un decremento de esta fracción por el procedimiento de tamizado sin ninguna correlación con erosión.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

No se observó ninguna pérdida de SST durante el tamizado lo que indica que la determinación de la granulometría por este método incluye todas las partículas en suspensión del lodo estudiado.

Los tamizados realizados con 5, 10, 25 y 150 ml dieron resultados reproducibles pero no los realizados con 1 ml. Además las distribuciones del tamaño de partículas obtenidas después de tamizar 10 y 25 ml fueron idénticas. Por consiguiente, este rango de volumen debe ser preferido a manera de poder comparar los tamizados realizados por diferentes laboratorios.

El agua corriente (de la llave) puede ser usada para el lavado y retrolavado del lodo sin que afecte los gránulos, pues al usar agua corriente o solución amortiguadora de fosfatos no hubo ninguna diferencia.

El lodo puede ser almacenado por un periodo de 50 días en un refrigerador sin afectar la distribución del tamaño de partículas.

La técnica de análisis de imagen a pesar de ser reproducible, no es comparable con la técnica de tamizado. No se puede por lo tanto descartar que haya erosión de los gránulos durante el tamizado. Esto sin embargo es poco importante dado que la técnica de tamizado empleada en el laboratorio para otros experimentos permitió perfectamente seguir cambios en la granulometría de un lodo con respecto al tiempo, o comparar la granulometría de diferentes lodos entre sí.

Todos estos resultados confirman que el tamizado húmedo manual es una técnica adecuada para determinar la granulometría de los lodos de digestores anaerobios.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

APHA/AWWA/WPCT (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th edition, Washington D.C.

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. In: *Proc. 5th Int. Symp., Anaerobic Digestion* Hall. E. and Hobson P.N. (eds.) Pergamon Press., London, UK, pp. 105-114.

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** (1), 21-27.

Hulshoff Pol., L.W. (1989). The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. PhD. Thesis, Agricultural University of Wageningen, Wageningen, The Netherlands. pp. 95-107.

Jeison, D. and Chamy, R. (1998). Novel technique for measuring the size distribution of granules from anaerobic reactors for wastewater treatment. *Biotechnol. Tech.*, **12** (9) 659-662.

Lettinga, G., van Velsen, A. F. M., Hobma, S. W., de Zeeuw, W., Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 699-734.

- Leschber, R. and Haacke, W. (1975). Sewage sludge research with special emphasis in the particle size distribution. *Vom Wasser.*, **45**, 305-325. (en Aleman)
- Mahoney, E. M., Varagu, L. K., Cairns, W. L., Kosaric, N. and Murray. R. G. E. (1987). The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. *Wat. Sci. Tech.*, **19**, 249-260.
- Marques de Cantú M.J. (1991). Probabilidad y Estadística. McGraw - Hill Interamericana de México S.A de C.V., México D.F., pp. 340, 361, 378, 425.
- Monroy, O., Meraz, M., Montoya, L., Famá, G., Macarie., H. (1997). Where is anaerobic digestion in Mexico? State of the technology, limitations and potential use for its development. In: *Proc 8th Int. Conf. Anaerobic Digestion*, 25 - 29 may 1997. Sendai, Japan, Vol 2, pp. 272-284.
- Montgomery C. Douglas, (1991). Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V., México, D.F. pp.70, 429-438.
- Noyola, A. and Kano, G. (1996) Experiencia en tres años de operación de una planta de tratamiento anaerobia para aguas residuales industriales. In: *Memorias del X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 14-16 de Febrero 1996, Toluca, Edo. México, SMISAAC, 6 páginas.
- Tur, M. Y. and Huang, J. C. (1997). Treatment of phthalic waste by anaerobic hybrid reactor. *J. Environ. Eng.*, **123** (11), 1093-1099.
- 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** (6), 1445-1452.

ANEXO



A SIMPLE AND LOW COST TECHNIQUE FOR DETERMINING THE GRANULOMETRY OF UPFLOW ANAEROBIC SLUDGE BLANKET REACTOR SLUDGE

A. Laguna*, A. Ouattara**, R. O. Gonzalez***,
O. Baron*†‡, G. Famá*, R. El Mamouni†,
S. Guiot†*, O. Monroy* and H. Macarie*‡

* *Depto de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av.*

Michoacan y La Purisima, Col. Vicentina, 09340 México D. F., A. P. 55 535, Mexico

** *Université de Ouagadougou, Département de Microbiologie et Biochimie, 03 B. P.*
7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso

*** *Depto de Matemáticas, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av.*
Michoacan y La Purisima, Col. Vicentina, 09340 México D. F., A. P. 55 535, Mexico

† *Biotechnology Research Institute, NRCC, 6100 Royalmount Avenue, H4P 2R2,*
Montréal (Québec), Canada

‡ *Institut de Recherche pour le Développement (IRD, ex-ORSTOM), Ciceron 609, Col.*
Los Morales, 11530 México D. F., Mexico

ABSTRACT

Four techniques (microscope sizing, calculation from settling velocities, image and laser analysis) are available nowadays for determining the particle size distribution of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor sludge. These techniques present however the disadvantage of being either tedious, imprecise or expensive and hardly applicable in full scale treatment plants. There was then the need for a simple and low cost technique. In this study, a granulometry procedure based on manual humid sieving was evaluated. It was shown that no solid loss occurred during the screening and that the particle size profiles were reproducible when performed with sludge samples of 5, 10, 25 and 150 ml, but not 1 ml. Only the results between 10 and 25 ml were however fully identical. It was shown also that the sieving could be performed on sludge samples stored for as long as 50 days at refrigerator temperature and that tap water could be used for the wash and backwash operations without any impact on the particle size profile. The granulometry obtained by image analysis was not comparable to that given by sieving. Nevertheless, no evidence of granule erosion could be found. In any case, the technique allowed us to follow the evolution of sludge granulometry perfectly over time. As a consequence, the manual humid sieving appears to be an adequate technique for determining the granule size distribution of UASB sludges. © 1999 Published by Elsevier Science Ltd on behalf of the IAWQ. All rights reserved.

KEYWORDS

Anaerobic reactor; granular sludge; image analysis; particle size distribution; sieving; UASB.

INTRODUCTION

Among all the different types of anaerobic digesters applied at full scale, UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reactors present the best commercial acceptance. The success of these reactors is related to their capacity for biomass accumulation by settling without the need of a carrier. Good settling properties are obtained through the flocculation of the biomass in the form of dense granules with diameters up to several millimetres. Actually, as individual cells and granules have similar densities, the greater settling velocity of the latter is only related to its larger particle size. The study of this phenomenon has led to the development of several techniques for characterizing the resistance of the granules, their porosity, settling properties, bacterial composition and organization, activity, nature and composition of exopolymers, as well as their size distribution. This last parameter is particularly useful for studying the physico-chemical factors promoting sludge granulation.

To date, four techniques are routinely used to determine the particle size distribution of UASB sludge. Two of them consist in the direct size measurement with a microscope of at least 100 sludge granules immobilized in a petri dish. This can be done either manually with a porton graticule or automatically using image analysis and computerized data processing (Hulshoff Pol, 1989; Dudley *et al.*, 1993). The third method is indirect and consists in determining the settling velocities of a sludge sample and extrapolating the corresponding diameters using equations such as Stokes' law (Hulshoff Pol, 1989; Grotenhuis *et al.*, 1991). The last method involves particle size analysis by laser and has been introduced only recently (Yan and Tay, 1997). Unfortunately all these procedures present several disadvantages. The graticule one is very tedious while the image and laser analysis are expensive (at least \$US 10 000 for image analysis and between 30 000 and 60 000 for the laser one) and the settling velocity procedure assumes that some correlations between size and velocity are correct which may not be always the case. This last procedure is also poorly sensible and presents a low degree of precision (Grotenhuis *et al.*, 1991). Finally, none of the previous techniques, because of their complexity or cost can be easily set up in treatment plants and as a consequence are almost confined to laboratory studies.

There is then the need for a low cost and simple granulometry technique which could be applied both at lab and full scale. A humid sieving could be such a method since it only requires a set of sieves which cost a few hundred dollars, a furnace and a centrifuge or a filtering device always available in laboratories realizing water analysis. Such sieving has been used before for that purpose by several researchers (Tur and Huang, 1997; Yoda and Nishimura, 1997), nevertheless its validity has never been assessed. For instance, based on some studies with digested sludge and automatic sieving (Leschber and Haacke, 1975), it is believed that this method causes granule erosion and yields erroneous measurements (Hulshoff Pol, 1989).

This paper presents the evaluation of a manual granular sludge sieving procedure. The points investigated are (1) the suspended solids recovery after sieving compared to the initial amount present in the sample, (2) the reproducibility of the technique for each sludge volume tested, (3) the range of sample volumes for which the technique gives comparable results, (4) the possibility of using tap water instead of phosphate buffer for granule washing, and (5) the effect of sludge storage at two temperatures on granulometry. The results are also compared to those obtained with image analysis in order to assess if erosion takes place during the sieving.

MATERIALS AND METHODS

Source of granular sludge

The sludge used for the study came from a 2400 m³ UASB reactor treating the wastewater of "Central de Malta", a malt factory belonging to the "Cerveceria Cuauhtémoc Moctezuma" Mexican brewery group. This sludge was chosen because it is a good example of granular biomass. It was sampled at two different dates separated by 3 months. The effect of storage on granulometry was evaluated on the second sample and all the other factors on the first one as well as the image analysis.

Sieving procedure

The screening was performed with five stainless steel sieves of 8" diameter having respective mesh openings of 2, 0.925, 0.76, 0.59 and 0.23 mm which allowed us to cover the usual granule size range. The sieves were mounted vertically one on the top of the other in increasing order of mesh opening (from bottom to top). A plate of the same diameter was located at the bottom to recover the particles smaller than 0.23 mm. Before analysis, the sludge was vigorously homogenized by hand shaking its storage container several times, and then transferred in a beaker of 2 litres where it was quickly sampled. Depending on the sludge volume tested, sampling was made either with calibrated spoons (25, 150 ml) or pipettes (1, 5, 10 ml). In that last case, the pipette tip was broken in order to have a mouth of around 5 mm which is at least twice the size of the biggest granules. The spoons had a larger diameter (4 cm for the 25 ml one, 8.6 cm for the 150 ml one), so that the ratio of spoon to granule diameter was very high. The sample was afterwards deposited on the 2 mm mesh opening sieve and washed with phosphate buffer (KH_2PO_4 4 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5.09 g/l, K_2HPO_4 1.08 g/l, pH 7.3) or tap water to allow the particles less than 2 mm, to separate from the others and flow to the following sieve. The same washing operation was done successively for each sieve until reaching the last one. The granules retained on the different screens were recovered by a backwash using the same solvent. Each fraction was collected in a different beaker and was later centrifuged at 5000 rpm for 15 min in order to obtain the solids and determine their TSS and VSS. Once the amount of TSS and VSS retained on each sieve was determined, it was possible to calculate by simple addition of these data, the total amount of solids screened and then to determine for each class of size (< 0.23, [0.23-0.59], [0.59-0.76], [0.76-0.925], [0.925-2], > 2 mm) the percentage of the total weight that they represent.

Image analysis

The first step in the image analysis consists of screening a sludge sample of 1 ml through a sieve of 0.149 mm in order to eliminate the small particles which cannot be detected by the system. The TSS of the sieved portion ($M_{0.149}$) are measured in parallel to the TSS of an unscreened 1 ml sample (M_t). Thereafter, an aliquot of the granules retained on the sieve is placed in a petri dish (with a diameter of 3.5 cm) followed by the addition of enough phosphate buffer (an equimolar solution of sodium and potassium phosphate, 0.1 M) to cover them. The petri dish is then observed with a stereomicroscope (WILD, Heerbrugg, Switzerland) equipped with a video camera coupled to a Quantimet Q520 Image Analysis System (Cambridge Instruments Ltd, Cambridge, UK) which automatically determines the equivalent diameter of each granule. This value corresponds to the diameter of a sphere with a surface identical to that of the particles. The image analysis gives therefore, a distribution of diameter (D) by number of granules. In order to compare it with the results obtained by sieving, this distribution must be converted to a distribution of diameter by weight. Assuming that all granules have equal densities, mass (M) and volume (V) distributions are equivalent since $M = V \cdot \text{density}$. The granules being assimilated to spheres, their volumes can be easily assessed ($V = 1/6 \pi D^3$). The procedure consists afterwards, (1) to classify the granules by increasing diameter, (2) to group them into classes of size corresponding to the sieving (< 0.23, [0.23-0.59], [0.59-0.76], [0.76-0.925], [0.925-2], > 2 mm), (3) to calculate for each class the volume that represents all the granules that they contain (= sum of granule individual volumes) and finally (4) to determine in percentage the fraction that every class represents with respect to the total volume (V_t) of the granules found in the sample ($V_t = \text{sum of individual volumes (vi) of all granules detected by image analysis + volume of particles inferior to 0.149 mm} = \sum v_i / [M_{0.149} / M_t]$).

Statistical analysis and suspended solids (SS)

All the statistical analyses (Anova, Kolmogorov-Smirnov, Student t test, etc) of the data have been performed with the software SPSS version 7.5 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The sludge TSS (Total SS) and VSS (Volatile SS) were determined respectively after drying at 105°C for 24 h and combustion during 1 h at 550°C of the dried solids following the procedure described in Standard Methods (1992). Before analysis, the suspended solids were obtained from the samples by centrifugation as indicated above.

RESULTS AND DISCUSSION

Except when mentioned differently, all screening experiments were performed using phosphate buffer as solvent.

Suspended solids recovery

To be valid, as first criterion, a granulometry technique must be able to take into account all the suspended particles present in a sample without any loss. It was therefore important to check if the total mass of solids recovered after screening was identical to that of the original unscreened sludge. For that purpose, the TSS and VSS of 10 sludge samples of 25 ml were determined directly, while 10 other 25 ml-samples were submitted to screening and the sum of the TSS and VSS retained on the different sieves was calculated for each of them. As can be seen on Figure 1A, the direct measurements gave TSS and VSS values much more regular than those obtained after sieving. For TSS, the averages were however very similar, 73.7 (SD 7.12) and 74.08 g/l (SD = 1.08) with and without screening, respectively. The difference was somewhat more important for VSS (mean of 57.84 g/l with a SD of 0.75 without sieving against 53.75 g/l and SD of 5.21 after sieving). A variance analysis which compared the means for the TSS and VSS with and without screening confirmed that no significant difference existed for the TSS values but that a significant difference (at a 2.5% level) existed for the VSS. No explanation could be found for this variation, except maybe, that the test should have been performed on a higher number of samples. Because of this result, for the rest of the evaluation only TSS were considered.

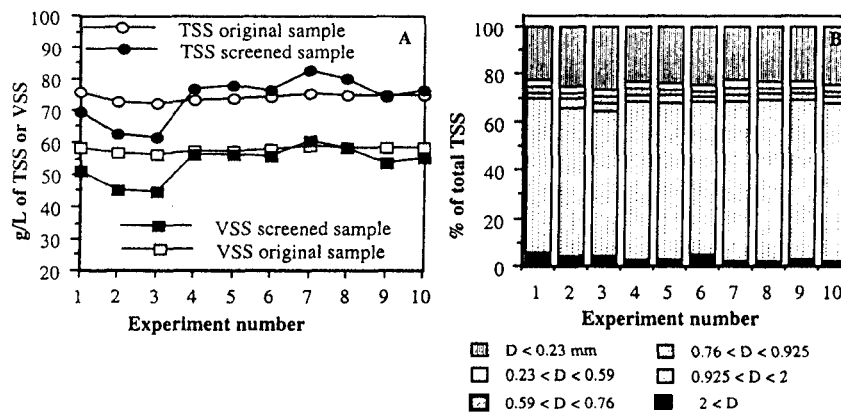


Figure 1. Values of the TSS and VSS obtained for ten sieved and unsieved sludge samples (A) and reproducibility of sieving for each class of size using a sludge volume of 25 ml (B).

Reproducibility

Another important criterion that must cover a granulometry technique is reproducibility. In a first step, this one was tested again on 10 screening using a sludge sample of 25 ml. The results (Figure 1B) were analyzed in order to test that the %TSS obtained for each class of granule size followed a uniform distribution. The data were hence submitted to a Kolmogorov-Smirnov test which confirmed that for none of the classes could the uniform distribution hypothesis be rejected. Such uniform distribution indicated that the results obtained for the different sieving are similar and that as a consequence the method is reproducible. Later the same analysis was performed for sludge samples of 1, 5, 10 and 150 ml. For all of them, except 1 ml, the reproducibility was also confirmed (data not shown).

Effect of sludge volume

Sludge sampling is not at all a problem for full-scale reactors due to their huge volumes. Actually, various litre samples can be taken several times without any consequence on their performance. Unfortunately, this is not the case at lab scale where the total amount of sludge is usually limited to a few hundred millilitres. It

was then important to know if the volume of sample to be screened could be reduced to less than 25 ml without affecting the results of size distribution. As a consequence, a series of screenings in triplicate were performed with 1, 5, 10, 25 and 150 ml of sludge. This last value was included in order to see also the impact of using large volumes.

It appeared immediately from the results (Table 1, for clarity only mean values are given) that the screening of 1 ml of sludge gave a size distribution pattern completely different from the others. The fraction with a diameter higher than 2 mm disappeared while the fraction with a size between 0.925 and 2 mm was almost reduced by two. The rest of the fractions increased with respect to the other volumes. Such a result is probably related to the fact that it is difficult for a 1 ml sample to be representative of the sludge. As shown by Pereboom (1994), usually in UASB sludge, the number of granules found in each class of size decreases with the increase of diameter. The number of small granules in the sludge, is then, always higher than the number of big ones. Since big granules have the weight of several small granules, their impact on mass is important even if their number is low. In case the granules bigger than 2 mm are only present at the density of 5 granules for each 25 ml of sludge, the probability to pick one in 1 ml is low. This will also affect the reproducibility, since the mass particle size distribution of such 1 ml samples will be highly different depending on the presence or absence of a big granule. The same argument can be used to explain the decrease of the [0.925-2] mm fraction and the increase of the small ones.

Table 1. Mean %TSS obtained for each class of granule size using different sludge sample volumes, phosphate buffer or water as solvent and image analysis instead of screening

Sample volume ml	Granule size (mm)					
	> 2	[0.925-2]	[0.76-0.925]	[0.59-0.76]	[0.23-0.59]	< 0.23
% TSS						
Sieving						
Phosphate buffer						
1	0	36.02	4.5	14.07	15.06	30.36
5	1.46	63.07	2.91	4.34	5.13	22.49
10	1.56	64.23	2.82	2.49	3.33	25.56
25	1.96	67.85	2.61	2.12	2.88	22.55
150	0.85	70.72	1.71	1.57	4.58	20.56
Tap water						
25	0.98	71.18	2.28	1.81	2.57	21.17
Image analysis						
1	15.48	52.5	2.24	0.9	0.4	28.48

For the other volume tested, on first approach, the size distribution looked like much more similar. For each class of granule size, the mean %TSS obtained at the distinct volumes were compared by a variance analysis. Later, with a multiple Tukey comparison, the means differing by more than 10% were identified (a 10% difference is tolerable for this type of analysis). No differences could be found between 10 and 25 ml, but some differences appeared between 5 and 150 ml and between them and the other volumes. For the 150 ml sample, one of the uncomparable values corresponded to the %TSS of the granules included in the [0.925-2] and < 0.23 classes. In that case, the difference may be related to the fact that despite using more phosphate buffer for washing the granules when screening 150 ml (1600 ml against 700 for 25 ml of sample, 300 for 10 and 150 for 5 ml), the ratio of buffer volume to sample volume was only 10 compared to 28-30 ml/ml in the other cases. This implies that the washing efficiency was probably lower and that as a consequence some small granules could not be separated from the big one in the [0.925-2] class and stayed on the 0.925 mm sieve. Concordingly the %TSS of the granules smaller than 0.23 mm decreased.

Phosphate buffer versus tap water as washing agent

Phosphate buffer was used at the beginning of the evaluation for the washing and backwash operations in order to provide to the granules an adequate environment in terms of pH and osmotic pressure. It was actually important to avoid any damage to the cells which could result in granule disruption. The preparation

of phosphate buffer being time consuming and having a cost related to the chemicals, it was interesting to test the possibility of replacing it by tap water. With this objective, three sievings with phosphate buffer and three others with tap water were performed on sludge samples of 25 ml (Table 1). For each class of size, as previously, using a variance analysis and a Tukey test for multiple comparison, it was tested if the differences between the mean %TSS resulting from the use of the two solutions were not higher than 10%. Actually, no difference was found. This result is in accordance with those of Leschber and Haacke (1975) who also observed no differences between the particle size distribution of sewage sludge screened in presence of distilled or tap water. This absence of difference seems to indicate that the pH and ionic strength of tap water are adequate for that purpose or that the size of the granules is sufficient to make them not affected by osmotic stress during the time of the sieving operation.

Impact of sludge storage on granulometry

Analysis may not be always performed at the time of sampling, particularly when facilities are not available on site and the samples must be sent to another place. It is then important to know how long a sample can be stored without affecting the characteristics to be measured. Storage also allows us to better organize the working schedule since several samples taken at different times can be processed at the same moment. In order to determine this parameter, two identical volumes of sludges sampled on the same day were stored for 50 days, one in a refrigerator and the other at ambient temperature. Every 2 weeks, the granulometry of both sludges was determined by duplicate using a sample volume of 25 ml.

At refrigerator temperature, the curves of %TSS versus time (Figure 2) which could be drawn for each class of size were horizontal lines (slopes of zero). This means that at this temperature the %TSS did not change significantly with time, indicating therefore, that the sludge can be stored for 50 days in such conditions without any effect on its particle size distribution. At ambient temperature, the situation was different since for the [0.76-0.925] and > 2 mm classes of granule size, the slopes of the lines drawn were significantly different to zero. Statistical analysis of the data were performed using simple linear regression and the t-test for the time coefficient. It must be noted that by the time of performing the analysis, the ambient temperature increased above 30°C. As a consequence, the different comportment observed at the low temperatures could be the result of different metabolic activities. Decay rate (cell lysis) in starving conditions is actually more important at higher than lower temperature (Wu *et al.*, 1995) which could probably explain the reduction of size which was observed.

Image analysis

The image analysis involving only one screening in order to remove the undetectable small particles, the granules are supposed to be submitted to much less shear stress than during screening on multiple sieves and to keep their size integrity better. As a consequence, image analysis was supposed to allow the detection of any damage caused to granules by erosion during the sieving procedure. Image analysis was therefore performed on 12 samples of the sludge used for the screening evaluation. The size distribution obtained (Table 1) appeared to be very different to those resulting from the sieving of the various sludge volumes even when using 1 ml. For instance, with image analysis, the granules bigger than 2 mm represented more than 15% of the total TSS against less than 2% for screening. The variations observed cannot be explained however by granule erosion since the 2 mm sieve is the first to be in contact with the sludge and its mesh opening is too high to cause an important shear stress during granule flowing. In fact the difference seems due to the point that the diameter given by image analysis are calculated assuming that granules are spherical. Central de Malta's sludge contained unfortunately a certain amount of thin granules with a fusoid form. The surface of such particles may correspond to that of a sphere with a diameter higher than 2 mm, but their narrow width compared to their length could permit them to cross the 2 mm sieve in vertical position. This would result for image analysis in an artificial increase of the %TSS corresponding to the big granules and for the screening procedure to decrease this fraction without any correlation with erosion.

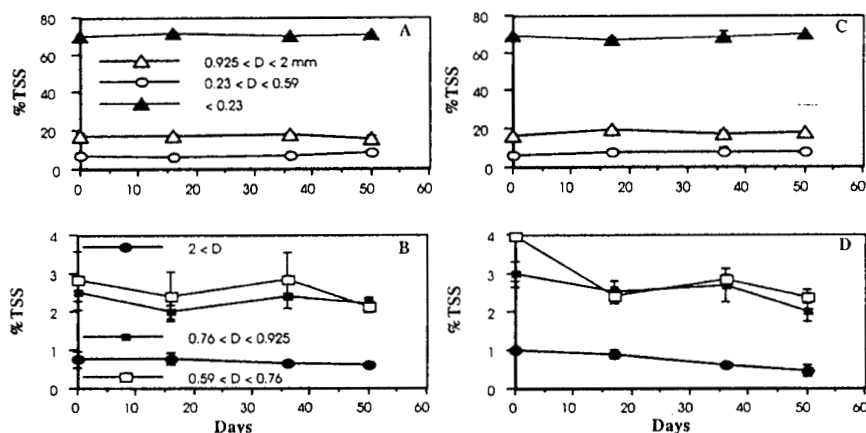


Figure 2. Evolution of sludge granulometry kept in a refrigerator (A, B) or ambient temperature (C, D) (bars represent standard deviation, when not visible they have the size of the symbols).

Practical application of the technique

The sieving procedure with 25 ml-samples and phosphate buffer as washing agent was used to follow during 54 days the granulometry of a 2 l UASB reactor operated on cheese wastewater with an upflow velocity of 0.5 m/h, but also to determine the granulometry of various samples of Central de Malta's (CM) 2400 m³ reactor sludge collected at different dates between 1995 and 1998. As can be seen in Figure 3A, for the lab scale reactor, the sieving technique permitted perfectly to visualize (1) a segregation of the sludge bed, the biggest granules being more abundant at the bottom and the smallest at the top, and (2) an increase of the fraction corresponding to the biggest granules with time, both at the bottom and top of the sludge bed. In the same manner, the evolution of Central de Malta's sludge could be followed (Figure 3B).

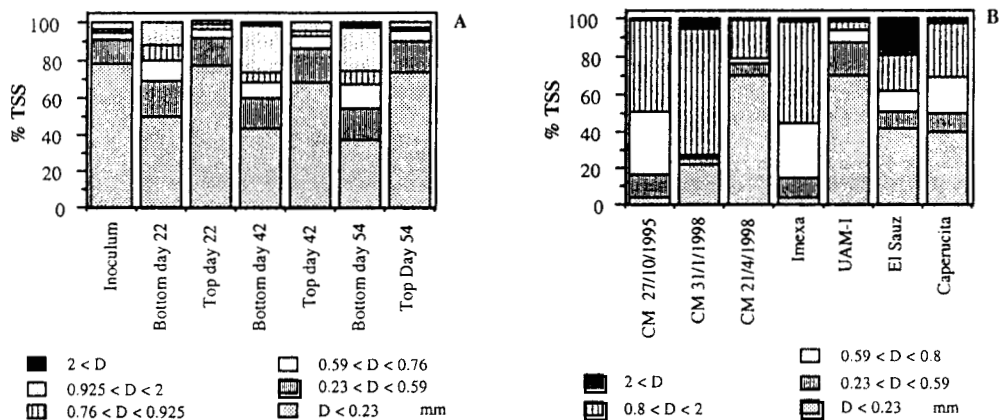


Figure 3. Evolution of the sludge bed granulometry of a lab scale UASB reactor fed with cheese wastewater (A) and comparison of the granulometry of sludges from different full scale digesters (B).

Using the same procedure (25 ml sample, phosphate buffer), the technique was finally applied to characterize the sludge granulometry of two full scale UASB reactors of 50 and 500 m³ treating respectively domestic sewage (UAM-I) and yeast wastewater (Imexa), but also to a UASB reactor of 80 m³ (Caperucita) and an anaerobic lagoon of 4000 m³ (El Sauz) both treating cheese wastewater. The results obtained (Figure 3B) demonstrate equally that the sieving technique is valuable to compare the granulometry of sludges from different sources.

CONCLUSIONS

The sieving technique can be used to determine the granulometry of UASB reactor sludges. All screening performed with 5, 10, 25 and 150 ml will give reproducible results while only screening performed in the range of 10-25 ml will give identical values. In order to compare the screening done by different laboratories, this range of volume should be preferred. Tap water can be used for the washing and backwash operations since it yields identical results with phosphate buffer. The sludge can be stored up to 50 days in a refrigerator without any impact on its particle size distribution. Since screening and image analysis gave uncomparable distributions, the possibility of sludge erosion could not be discarded, but this is of little importance because the technique allows us to observe the evolution of the sludge particle size profile over time. The main disadvantage of the technique is that it does not give any information on the number of granules and that as a consequence, a mean diameter cannot be determined unless similar intervals of mesh opening between sieves are used. However, an advantage of the technique is that it can be performed in series with SVI determinations. Three parameters (SVI, granulometry and TSS concentration) can, hence, be obtained with only one sludge sample. Finally, it should be mentioned that the sludge granulometry can be known with greater precision, simply by increasing the number of sieves. Sieving with automatic shakers is not advised unless no impact on granule size integrity can be demonstrated. Such apparatus would require nevertheless probably higher sample volumes.

ACKNOWLEDGEMENTS

Aboubakar Ouattara was financially supported by IRD and the Mexican National Council for Science and Technology (Conacyt). All the companies cited in Fig. 3B are thanked for having facilitated the sampling of the sludge of their respective anaerobic treatment plants. We thank also Dr. Alberto Castillo for his fine suggestions in statistical analysis.

REFERENCES

- APHA, AWWA, WPCF. (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition, Washington D. C.
- 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.
- 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**(1), 21-27.
- Hulshoff Pol, L. W. (1989). The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. PhD thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 120 pages.
- Leschber, R. and Haacke, W. (1975). Sewage sludge research with special emphasis in the particle size distribution. *Vom Wasser*, **45**, 305-325 (in German).
- 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.
- Tur, M. Y. and Huang, J. C. (1997). Treatment of phthalic waste by anaerobic hybrid reactor. *J. Environ. Eng.*, **123**(11), 1093-1099.
- 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**(6), 1445-1452.
- Yan, Y. G. and Tay, J. H. (1997). Characterization of the granulation process during UASB start-up. *Wat. Res.*, **31**(7), 1573-1580.
- Yoda, M. and Nishimura, S. (1997). Controlling granular sludge floatation in UASB reactors. *Wat. Sci. Tech.*, **36**(6/7), 165-173.