



Universidad Nacional Autónoma de México

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Iztacala**

**FORMACION DE PELICULAS MICROBIANAS
EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LECHO
FLUIDIZADO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
GRACIELA GONZALEZ GIL



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco sinceramente: al M. en C. Oscar Monroy H.,
a la Ing. Florina Ramírez V.
y a todos los integrantes del
grupo de "anaerobios" de la
UAM-I.

su valioso apoyo para la realización de este trabajo.

**FORMACION DE PELICULAS MICROBIANAS EN UN REACTOR ANAEROBIO DE
LECHO FLUIDIZADO**

INDICE

- I. OBJETIVOS

- II. INTRODUCCION
 - II.1 PROCESOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS
 - II.2 REVISION BIBLIOGRAFICA SOBRE FORMACION DE PELICULAS ANAEROBIAS
 - II.3.1 FISIOLOGIA DE LA FORMACION DE PELICULAS
 - II.3.2 MICROBIOLOGIA DE BACTERIAS ANAEROBIAS

 - II.4 JUSTIFICACION

- III MATERIAL Y METODOS

- IV RESULTADOS Y DISCUSION

- V CONCLUSION

- VI BIBLIOGRAFIA

- VII ANEXOS

I. OBJETIVOS:

- 1.- Desarrollar biopelículas para un reactor de Fluidizado utilizando polietileno como material de soporte.

- 2.- Evaluar la actividad fisiológica de las biopartículas.

II INTRODUCCION

II.1 PROCESOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS

La falta de recursos financieros para controlar la contaminación que ha traído aparejada la expansión demográfica y el crecimiento industrial, ha ocasionado un impacto ambiental negativo sobre los cuerpos de agua que reciben la aportación de aguas residuales sin tratamientos adecuados. Dichos cuerpos de agua así dañados, quedan imposibilitados para usarse tanto en el abastecimiento de agua potable, como en zonas de recreación y aún para uso industrial o agrícola.

Así, el tratamiento de aguas residuales es una tarea que tanto países industrializados como en vías de desarrollo tienen que realizar.

La figura 2.1 muestra el diagrama de flujo en el proceso de purificación de un agua residual.

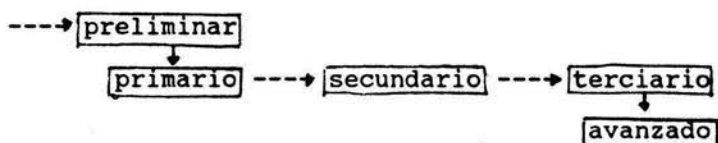


Figura 2.1 .- Tren de operación en el tratamiento de aguas residuales.

En el tratamiento preliminar se eliminan las partículas mayores de 0.5 cm, de densidad mayor a la del agua que

pueden ser retenidas en rejillas o en desarenadores (canales reductores de la velocidad de flujo) con objeto de no obstruir la tubería o dañar la bomba.

El tratamiento primario pretende sedimentar, mediante una reducción significativa de la velocidad de flujo, materia orgánica que se encuentra en suspensión; que llega a ser en ocasiones del 30% de la materia orgánica total.

El tratamiento secundario implica la eliminación de la materia orgánica. Por ser el más económico se usa el tratamiento biológico, que busca la eliminación total de la materia orgánica para evitar caer en los tratamientos fisicoquímicos que son muy costosos. Los tratamientos biológicos pueden ser del tipo anaerobio que preferentemente ataca altas concentraciones de materia orgánica transformando cerca del 90% de la misma a CH_4 y CO_2 y sólo un 10% en células (Noyola, 1986).

El tratamiento basado en las bacterias aerobias es capaz de atacar a la materia orgánica aún a muy bajas concentraciones (menos de 100 mg DBO/l). Como estas aprovechan muy bien la energía del metabolismo, sintetizan cerca del 50% de la materia orgánica degradada.

Un proceso biológico de tratamiento secundario que se ha empezado a usar hoy en día es un tratamiento anaerobio para obtener la máxima reducción de materia orgánica con producción de energía y baja generación de desechos celulares seguido de un proceso aerobio que puede llevar el agua hasta 30 mg DBO/l. Aunque este último proceso genere biomasa de

desecho o consume energía ya no será significativa porque recibirá bajas cantidades de materia orgánica.

El tratamiento terciario implica la eliminación de los nutrimentos principalmente del N y del P. Para hacer esto, el agua tiene que estar libre de materia orgánica.

Después de este tratamiento el agua puede ser descargada a los cuerpos receptores en espera de que el ciclo natural del agua la purifique aun más.

Los tratamientos avanzados se aplican al agua si se quiere reutilizarla en procesos industriales específicos.

Hoy en día, es considerable el conocimiento de los fundamentos y la aplicación de los procesos biotecnológicos para el tratamiento secundario de las aguas residuales (Verstrate et al. 1987; Henk, 1984).

II.2 DIGESTION ANAEROBIA

En la actualidad la digestión anaerobia es una buena opción para la solución de la contaminación orgánica de aguas pues ofrece un buen número de ventajas. Lettinga (1982) menciona las siguientes:

- 1.- Baja producción de biomasa que además son sólidos biológicos estables. Esto es con base en que una bacteria anaerobia utilizará sólo el 10% de la energía contenida en su alimento o sustrato para funciones de reproducción, dando origen a nuevas células; el 90% restante lo dirigirá a la producción del gas metano (Noyola, 1986).

2.- El proceso tolera cargas elevadas de materia orgánica, aunque es importante señalar que se puede emplear con aguas medianamente contaminadas.

3.- Bajos requerimientos nutricionales.

4.- Producción de metano que es utilizable.

5.- Los lodos anaerobios pueden preservarse sin alimentación por muchos meses sin deterioro alguno.

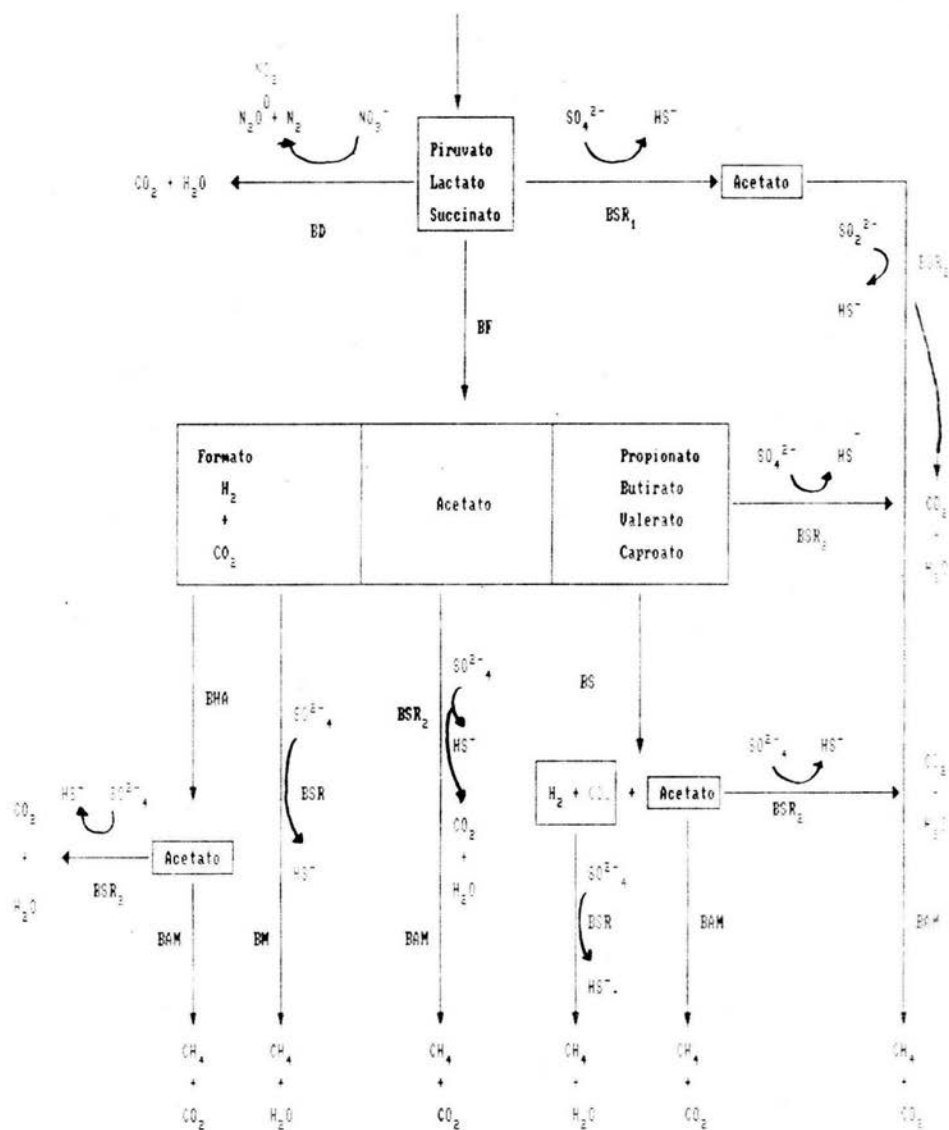
6.- No requiere de energía para llevarse a cabo.

II.2.1 BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA DIGESTION ANAEROBIA

En la figura 2.2 se muestra el esquema de las rutas metabólicas que conforman la digestión anaerobia. Un primer grupo de bacterias, las fermentativas, hidrolizan polímeros biológicos (proteínas, carbohidratos, lípidos) a unidades químicas más simples como azúcares, alcoholes y aminoácidos, y los fermentan produciendo ácidos grasos, hidrógeno y dióxido de carbono; posteriormente, las bacterias acetogénicas oxidan los alcoholes, ácido butírico y propiónico, así como los ácidos grasos no volátiles a acetato e hidrógeno. Por su parte, las bacterias metanogénicas concluyen el trabajo transformando estos compuestos simples a metano y dióxido de carbono (García, 1982).

Las bacterias metanogénicas pertenecen al grupo de las arqueobacterias, las cuales presentan ciertas diferencias con las bacterias "clásicas", tanto fisiológicas como estructurales, entre las que se pueden mencionar la presencia de las coenzimas M, F₄₂₀ y F₄₃₀; diferencias en la

POLIMEROS BIOLÓGICOS



BF: Bacteria fermentativa

BD: Bacteria denitrificante

BSR: Bacteria sulfato reductora

BHA: Bacteria homoacetogénica

BS: Bacteria sintrofica

BAM: Bacteria acetofílica metanogénica

EM: Bacteria metanogénica

FIG. 2.2 Esquema de vías metabólicas implicadas en la digestión anaerobia (García 1962).

composición de la pared celular, así como la respuesta a antibióticos. Son bacterias anaerobias estrictas, su pH óptimo es de 6 a 8, el NH_3 y el H_2S son las principales fuentes de N y S; el níquel es el átomo central de la coenzima F_430 que actúa como grupo prostético de la enzima metil-coMreductasa que cataliza el paso final de la formación del metano (Schoberth et al., 1980; Woese, 1980).

En el proceso metanogénico se pueden distinguir dos grupos bacterianos: las bacterias acetoclásticas cuyo sustrato es el ácido acético para la formación del metano, y las bacterias hidrogenotróficas que utilizan, con el mismo fin, el H_2 y el CO_2 (García, 1982).

La oxidación anaerobia de los ácidos grasos es un proceso microbiano en donde el hidrógeno molecular es el principal receptor de electrones. El hidrógeno se produce aquí por la oxidación de los dinucleótidos de piridina y ferredoxina (transfiriendo electrones a protones) que tienen un potencial redox = -0.32 volts a pH 7 mayor que la deshidrogenación del piruvato). Esta reacción sufre inhibición por producto, es decir, que a presiones de hidrógeno mayores a 0.3 mm de Hg se retiene la reacción; por lo tanto es necesaria una transferencia de hidrógeno entre especies. Esta clase de relación fisiológica implica un intercambio de hidrógeno entre un organismo quimioheterotrófico y una bacteria metanogénica u otro organismo que utilice H_2 no metanogénico. Las reacciones

dependientes de este fenómeno son de primer importancia para la digestión anaerobia (Guyot et al 1988)

Como el acetato es el principal precursor en la metanogénesis se debe tener un buen control de su concentración pues su acumulación reduce el pH ocasionando una baja actividad de las bacterias metanogénicas que oxidan el hidrógeno y por lo tanto sucede una acumulación de éste. Lo anterior causará, como resultado, que el propionato se acumule y se detenga la metanogénesis.

La metanogénesis puede ser la reacción más rápida y, además ser un mecanismo para evitar la acumulación de hidrógeno en el reactor si, como se mencionó antes, existe una estrecha relación con las productoras de hidrógeno.

Como todos los procesos biológicos, la digestión anaerobia es muy susceptible a cargas de choque. Hay compuestos más tóxicos que otros, sin embargo, su acumulación ocasiona alteraciones en el proceso que, eventualmente, lleva al incremento de la concentración de ácidos grasos volátiles, contribuyendo a la acidificación del medio y, por lo tanto, a detener el proceso metanogénico (Sam Soon et al., 1988).

II.2.2 REACTORES ANAEROBIOS

En general, todos los diseños de reactores anaerobios tratan de cubrir varios requisitos, entre los más importantes se tienen (Monroy et al., 1986): a) facilitar la acumulación de la biomasa activa prolongando su tiempo de retención en el reactor, b) eliminar el producto formado, c) tratar altas

concentraciones de contaminantes con corto tiempo de retención hidráulico y tasas elevadas de conversión.

La tasa de consumo de sustrato depende estrechamente de su concentración y de la cantidad de biomasa activa presente cuyo crecimiento sin embargo, es lento y, como ya se mencionó, a menudo es inhibido por los distintos productos generados durante la digestión.

Para que el sistema se mantenga estable y con buena velocidad de degradación es necesario primero que el hidrógeno y los ácidos grasos volátiles no se acumulen, y segundo que tanto las concentraciones de biomasa activa como de sustrato sean elevadas y constantes de acuerdo a la ecuación:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{m_{max} S X}{K_s + S Y} \quad (\text{Ec.1})$$

En donde:

- X** = Concentración de biomasa. (mg SSV/l)
- S** = Concentración de sustrato. (mg DQO/l)
- K_s** = Constante de afinidad por el sustrato (mg DQO/l)
- m_{max}** = Constante específica de crecimiento máximo (d⁻¹)
- Y** = Coeficiente de rendimiento celular (g SSV/gDQO)

De esta manera se tendrán a las bacterias en un ambiente invariable que les permita metabolizar con eficiencia el sustrato (Noyola *et al.*, 1988).

Es necesario dejar al sustrato el tiempo que tarde en degradarse. Como el sustrato está disuelto o suspendido en el agua a tratar, este tiempo será igual al tiempo de retención hidráulica (TRH) .

Por todo lo anterior, es de importancia vital considerar varios parámetros en el diseño de un reactor. Monroy (1986) considera de gran importancia la concentración de biomasa, la eficiencia de conversión y la relación de sustrato a microorganismos.

Sin embargo, mientras que la degradación de la materia orgánica se lleva a cabo en horas, los tiempos de duplicación de la biomasa se lleva a cabo en días como se muestra en el cuadro 2.1.

CUADRO 2.1.-Constantes cinéticas de las reacciones de la digestión anaerobia (Monroy, 1986)

REACTIVO	M max (d ⁻¹)	Y gSSV/gDQO	Ks mgDQO/l
Celulosa	1.7	0.837	37(g/l)
Monosacáridos y aminoácidos	3-7.2	0.1	22
Lípidos	0.1-0.56	0.04-0.11	417-4620
AGV propionato	0.155-0.31	0.025-0.042	60-246
butirato	0.37	0.047	13
acetato	0.34-0.44	0.04-0.05	165-250
Hidrógeno	1.4	0.04	0.6

Es importante entonces que el tiempo de retención de sólidos (TRS) sea igual al tiempo de crecimiento de la biomasa y el tiempo de retención hidráulico (TRH) sea igual al tiempo que se tarda en degradar la biomasa . Mientras

mayor sea el cociente TRS/TRH mayor eficiencia se tendrá y mientras menor sea el TRH menor será el volumen requerido por el reactor.

Existen varios tipos de diseño de reactores anaerobios, de flujo continuo, los cuales se pueden agrupar en dos categorías:

1.-REACTORES CON LA BIOMASA SUSPENDIDA .

Este tipo de reactores son los de la primera generación de reactores anaerobios. Su prototipo es el reactor continuo de tanque agitado (RCTA),(figura 2.3) o en flujo de piston (RCFP),(figura 2.4). Su principal desventaja es que el TRH y el TRS son iguales y elevados por tanto, el volumen del reactor tiene que ser grande (Speece, 1983).

2.-REACTORES QUE RETIENEN LA BIOMASA.

Pueden ser reactores con o sin material de soporte, sin embargo, en todos ellos se incrementa el cociente TRS/TRH.

Un reactor sin material de soporte es el sistema UASB o reactor de lecho de lodos con flujo ascendente (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (figura 2.5), que es un reactor que forma un lecho de lodos granulares de alta densidad que le permiten a la biomasa estar depositada en el fondo del reactor. La alimentación de agua se hace por la base para que fluya a través de todo el lecho. La parte superior al lecho es una zona que permite la resedimentación de la biomasa que

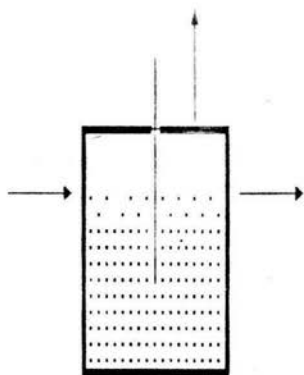


Fig.2.3 RCTA

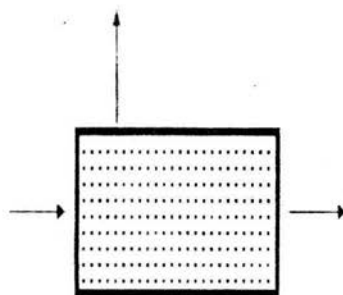


Fig. 2.4 RCFP

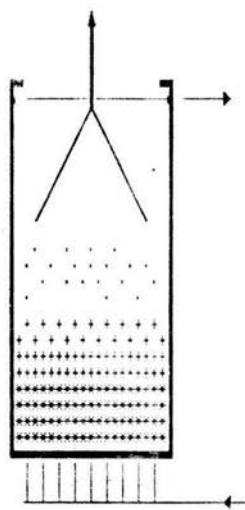


Fig. 2.5 UASB

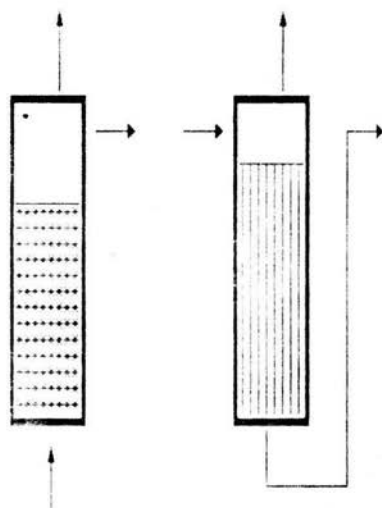


Fig. 2.6 FA

Fig. 2.7 RPFDD

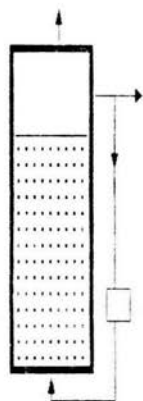


Fig. 2.8 IF

TIPOS DE REACTORES ANAEROBIOS

haya sido arrastrada por el agua. La biomasa producida en exceso se debe purgar periódicamente.(Briones et al.,1988;Noyola et al.,1988).

El objetivo de los reactores con material de soporte es distribuir la biomasa a todo lo largo del reactor haciendo uso precisamente de dicho material. La biomasa producida en exceso sale con el efluente y se separa en un sedimentador.

Ejemplos de este tipo de digestores son el reactor de filtro anaerobio(figura 2.6); el reactor de película fija de flujo descendente (RPFFD) (figura 2.7) y el reactor de lecho fluidizado (RLF),(figura 2.8). Comparado este último con otros reactores de película, presenta una gran superficie específica disponible para la colonización biológica dando como resultado mayores concentraciones de biomasa, así como mayores tasas de consumo de sustrato debido a que el flujo turbulento al eliminar la película laminar alrededor de las partículas, reduce los impedimentos a la transferencia de masa. Una desventaja de estos digestores es el costo del material de empaque (Kennedy y Droste, 1985; Omstread et al. 1980; William, 1981).

En todos los casos, el espesor de la biopelícula se controla por la velocidad relativa entre el agua y la película (Monroy, 1986).

II.3 REVISION BIBLIOGRAFICA

II.3.1 FISIOLOGIA DE LA FORMACION DE BIOPELICULAS

Una hipótesis razonable que trata de explicar la interacción entre los microorganismos y las superficies (Wiegant, 1988; Trulear y Characklis, 1982), sugieren que cualquier superficie en contacto con un medio nutritivo que contiene microorganismos suspendidos se volverá activa biológicamente debido a la adhesión de los microorganismos. Los ingenieros sanitarios han hecho uso de este principio en los filtros percoladores, en los biodiscos y aun recientemente en los reactores anaerobios para tratar aguas residuales.

El desarrollo de las biopelículas ha sido revisado por varios autores (Trulear, 1982; Switzenbaum et al., 1988) quienes han concluido que el proceso de inmovilización incluye una variedad de eventos que ocurren secuencialmente de la siguiente manera (cuadro 2.2.):

CUADRO 2.2 PROCESO DE INMOVILIZACION DE MICROORGANISMOS A SUPERFICIES
1.-Transporte y adsorción de moléculas orgánicas en la superficie.
2.-Transporte de células microbianas a la superficie.
3.-Adhesión de los microorganismos a la superficie.
4.-Transformaciones microbianas (crecimiento y producción de exopolímeros) en la superficie dando como consecuencia la producción de la biopelícula.
5.-desprendimiento parcial de la biopelícula a una tasa aproximadamente igual a la de crecimiento y de adhesión adicional (estado estacionario).

1. Transporte y adsorción orgánica.- Los microorganismos seleccionan su habitat con base en varios factores, incluyendo la naturaleza de la superficie. Una superficie expuesta a un flujo de líquido que contiene microorganismos, nutrimentos y macromoléculas orgánicas forma una monocapa orgánica; ésto propicia las condiciones para que se de la siguiente etapa.

2. Transporte de células microbianas a la superficie.- Aquí se da un transporte físico de las partículas microbianas a la superficie previamente cubierta con una película de materia orgánica. Dentro de un régimen de flujo turbulento, las partículas suspendidas dentro del fluido son transportadas a la superficie sólida por dos mecanismos: difusión molecular y transporte turbulento. El flujo de las partículas por la superficie aumenta conforme aumenta la velocidad de flujo y la concentración de dichas partículas. Sin embargo, el flujo de éstas también depende estrechamente de ciertas propiedades físicas, como tamaño, forma y densidad de los microorganismos.

3. Adhesión de los microorganismos a la superficie.- Las investigaciones sugieren una adhesión en dos procesos: adhesión reversible, seguida de una irreversible. La primera se refiere a la adhesión débil e inicial de las bacterias a la superficie. Aquí, los microorganismos aún exhiben movimiento browniano y pueden desprenderse mediante un rociado. Contrariamente, la adhesión irreversible se da

cuando hay producción de polímeros extracelulares; las células adheridas así, no son fácilmente removidas.

Muchos estudios de adhesión celular se han efectuado a bajas velocidades de flujo o bajo condiciones estáticas (Verrier et al., 1988).

4. Transformaciones microbianas (crecimiento y metabolismo de los microorganismos adheridos).- Los organismos dispersos y adheridos asimilan nutrimentos, sintetizan nueva biomasa y producen polímeros extracelulares. La producción de biomasa sobre la superficie es el resultado de la división celular. Por otro lado, el crecimiento de la biopelícula ha sido descrito por una amplia variedad de expresiones cuyas constantes están en función del pH, la temperatura, concentración limitante de nutrimentos, el tipo de nutrimentos, el aceptor final de electrones y la concentración de organismos (Shieh et al., 1981). La disminución de la concentración de nutrimentos origina películas delgadas y las tasas de difusión en la biopelícula pueden, a menudo, controlar las tasas de remoción de nutrimentos.

5. Desprendimiento de la biopelícula.- En cualquier punto del desarrollo de la película microbiana se desprenden porciones de ésta. Se puede, sin embargo, alcanzar un estado estacionario, en el cual la cantidad de microorganismos desprendidos o muertos sea igual a la cantidad de bacterias producidas.

Los tres primeros pasos ocurren relativamente rápido. Desafortunadamente, en sistemas anaerobios, el cuarto proceso ocurre muy lentamente (Guiot et al., 1988).

Aún así, los estudios sobre adhesión a soportes inertes sigue siendo de gran importancia. Van den Berg en 1982 trabajó con un reactor de película fija probando diferentes tipos de materiales como soporte, de éstos, los que dieron mejores resultados fueron el tezontle y un tipo de poliéster. En el caso del vidrio, las bacterias tuvieron dificultades para adherirse, el mismo autor sugiere que esto es debido a lo liso del material.

Guiot et al. (1988), por su parte, trabajaron con algunos aspectos nutricionales que favorecen la agregación microbiana en un reactor con filtro de flujo ascendente (Upflow Sludge Bed-Filter UBF) obteniendo un incremento de actividad específica de 1.2 a 2.6 g DQO/g SSV/día.

Otros investigadores que detectaron la influencia de los metales traza fueron Kelly y Switzenbaum (1984), quienes no pudieron establecer una biopelícula madura, en un reactor anaerobio de lecho fluidizado tratando remolacha, hasta que se le adicionaron sales de Ni, Co y Fe a la alimentación.

Se han utilizado una amplia variedad de materiales de soporte en reactores a nivel laboratorio, así como a escala industrial. Para reactores de lecho fluidizado el material preferido es la arena (Gulli, 1987; Toldrá, 1986). Sin

embargo, el usar arena, grava u otro material pesado involucra un gasto energético para fluidizar el lecho.

Iza et al. (1988) considera el desarrollo de la biopelícula desde un punto de vista ecológico. Con condiciones medio-ambientales constantes, la sucesión ecológica de la superficie colonizada lleva a la formación de una comunidad madura. Estos autores trabajaron con un reactor de lecho fluidizado (LF) utilizando como soporte partículas de ladrillo rojo, obteniendo a los 130 días de operación 31g SV/l.

Por su parte, Gorris (1988) estudió el desarrollo de la biopelícula en arena (diámetro 0.1-0.3 mm y densidad de 2.6g/cm³). Empleo diferentes inóculos y un agua residual sintética con ácidos grasos volátiles (AGV) como sustrato. El autor detectó que el arranque de su reactor siguió una curva sigmoidea dividida en tres fases: 1) Fase log en la que hay un lento crecimiento de la flora y degradación de AGV (60-80 días), 2) Fase de producción de la biopelícula (persistió hasta que ya no hubo incremento en la tasa de remoción de la carga orgánica) y 3) Fase estacionaria, en la que no hubo incremento de la biopelícula y la tasa de remoción de materia orgánica se mantuvo constante.

Toldrá et al. (1988) estudiaron el efecto de la temperatura en el consumo de sustrato en un reactor de LF. Utilizaron arena con un diámetro promedio de 595-707 μ m. Midieron la eficiencia del reactor mediante el consumo máximo de sustrato determinado, a su vez como % de remoción de DQO

alcanzando un 25% de remoción a los 13°C y del 93% a 35°C. Observaron que el crecimiento excesivo de la biopelícula era constantemente removido por las fuerzas cortantes. Menciona que la concentración de la biomasa adherida estuvo determinada básicamente, por la velocidad superficial del lecho.

Verrier et al. en 1988 midieron la adhesión microbiana a diferentes materiales: polipropileno (PP), polietileno (PE), polivinilclorida (PVC), politetrafluoroetileno (PTFE), poliactal (PAC), poliamida (PAM). Los resultados mostraron la influencia de la hidrofobicidad del material de soporte en la adhesión de bacterias metanogénicas y el desarrollo inicial de películas anaerobias. Los ensayos in vitro sugirieron que las superficies hidrofóbicas como el PTFE, PP y PE favorecen la adhesión microbiana.

Las partículas de arena, vidrio, grava, barro y arcilla tienen velocidades de sedimentación en agua entre 150 y 300 m/h; para fluidizarlas se requiere de una alta velocidad de flujo y, para mantener los TRH necesarios para la degradación de materia orgánica, es necesario recircular varias veces el agua. Esto implica un alto gasto energético y un mayor volumen de reacción.

Como una alternativa a estos materiales están los plásticos que tienen una menor velocidad de sedimentación, como los soportes de poliuretano de Bayer, o una densidad menor o igual a la del agua como el polietileno, polipropileno, poliamida, etc.

II.3.2 MICROBIOLOGIA DE PELICULAS ANAEROBIAS.

Los dos grupos bacterianos más importantes que se encuentran en reactores anaerobios son (Cord-Ruluisch,1986; Kobayashi et al.,1988; Touzel et al.,1983):

1.- Las bacterias acetogénicas.-Se puede considerar que este grupo de bacterias es el paso clave para la eficiencia de la metanogénesis. Tres tipos bacterianos realizan la acetogénesis:

- a) Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno (BAPH). Estas son las más representativas en los digestores anaerobios, un ejemplo es Sintrophomonas wolfei que es un bacilo cuyo aislamiento es muy problemático, pues tiene tasas de crecimiento muy largas (90-160 hr).
- b) Bacterias sulfato reductoras (BSR) que utilizan principalmente el sulfato como receptor final de electrones. Entre las más representativas de este grupo están Desulfobulbus propionicus que oxida el propionato en acetato más dióxido de carbono. Esta bacteria es altamente especializada y no puede utilizar otros ácidos. Desulfococcus multivorans y Desulfosarcina variabilis son capaces de oxidar un amplio rango de compuestos, tal como los ácidos grasos carboxílicos de C₁ a C₁₄ y el benzoato.
- c) Bacterias homoacetogénicas (BHA), se encuentran en este grupo a Clostridium aceticum y Acetobacterium woodi, que son

capaces de producir acetato a partir de H_2 y CO_2 . Sporomusa acidovorans que produce acetato a partir del metanol.

2.- Las bacterias metanogénicas.- Estas bacterias implicadas en la última etapa de la degradación anaerobia de la materia orgánica, se pueden considerar como bacterias de zoológico (Guyot, 1988; Henk, 1984). No tanto por su escasez (son ampliamente repartidas), sino por sus particularidades bioquímicas y fisiológicas. Las bacterias metanogénicas tienen como características comunes el producir metano, el tener un intervalo de sustratos muy limitado y tasas de crecimiento amplias. En estas bacterias se descubrieron nuevas coenzimas que no se encuentran en ningún otro microorganismo, como la metanopterina, el metanofuran, etc. Así mismo, se han encontrado otros compuestos de función desconocida como el ciclodifosfoglicerato que, se cree, puede ser una reserva de fosfato y energía. (Guyot, 1988).

Las bacterias metanogénicas utilizan, como se mencionó con anterioridad, un intervalo de sustratos limitado: H_2 más CO_2 , formato, acetato, metanol y metilamina. Recientemente se ha demostrado para unas el uso del isopropanol y del butanol (Guyot, 1988; Hobson, 1982; Schoberth, 1982). Se pueden definir tres grupos nutricionales:

- 1.-Las bacterias hidrogenofílicas.
- 2.-Las bacterias acetoclásticas.
- 3.-Las bacterias metilotróficas.

La clasificación de las bacterias metanogénicas se forma de tres ordenes subdivididos en seis familias y 14 géneros que representan una cincuentena de especies.

Sin embargo, los generos que se pueden encontrar en digestores anaerobios, incluyendo los que emplean material de soporte, son los siguientes: (Guyot ,1988)

A-Methanobacterium . Son bacilos cortos o cocci ovoides, G(+) o variable. Existe una decena de especies.

B-Methanosarcina . Cocci irregulares que pueden formar montones gruesos, G(+). Algunas cepas tienen vacuolas de gas. Estas últimas son las metanogénicas más variadas al nivel del uso de los sustratos. El género tiene 5 especies, tal como M.barkeri que fue aislada de todos los ecosistemas anaerobios. Esta bacteria tiene una tasa de crecimiento larga y una baja afinidad para acetato ($K_m=5mM$).

C-Methanotrix . Son bacilos rectos o un poco doblados, que pueden hacer largos filamentos que se agrupan. El acetato es el único sustrato. Existen dos especies M soehngenii y M conceilli que, además de tener tasas de crecimiento muy amplias tienen gran afinidad para el acetato (Guyot, 1980).

Con respecto a la adhesión de estos microorganismos, Dubourgier et al. (1988) mencionan que los polímeros extracelulares juegan generalmente un papel significativo en la adhesión y estabilización de la biopelícula resultante. Sin embargo, se menciona también que la fracción de polisacáridos extracelulares de granulos es de sólo del 1 al con base en el peso seco.

II.4 JUSTIFICACION

Como ya se explicó con anterioridad, un ejemplo de reactor con células inmóviles y con material de soporte es el de lecho fluidizado (LF), cuyo funcionamiento óptimo depende de la formación de biopartículas microbianas altamente activas y que sean fácilmente separadas del efluente. El desarrollo en México de reactores UASB, así como de lecho fluidizado parece ser una buena opción para la solución del problema de tratamiento de aguas residuales ya que, si se obtiene un elevado cociente TRS/TRH, se ahorrará espacio y dinero en la implantación del sistema. La elevación de dicho cociente está asociada directamente a la formación de partículas biológicamente activas y ésto, a su vez, se ve influenciado por ciertas condiciones nutricionales y de material de soporte que se utiliza.

Así pues, se hace necesaria la investigación de los factores nutricionales y ambientales que favorecen la formación de dichas biopartículas para un reactor anaerobio de lecho fluidizado.

III MATERIAL Y METODOS.

Para cubrir los objetivos planteados se desarrolló el trabajo experimental en varias etapas:

1.- **SELECCION DE MATERIAL:** El polietileno utilizado como soporte, tanto de alta como de baja densidad, se obtuvo del laboratorio de Ingeniería Química de la UAM-I. Este material se trituró en un molino con un tamaño de abertura de malla de 1 mm y se cribó para hacer una curva de distribución de tamaños. Las cribas utilizadas fueron de 0.28, 0.49, 0.105 y 0.074 mm. de abertura de malla. El material presentó a microscopía de epifluorescencia superficie rugosa que permitirá la adherencia a los microorganismos.

La caracterización de las partículas se muestra en la tabla 4.1.

Una vez separadas las partículas, se hicieron pruebas de flotación en cada fracción. En tubos de ensaye se colocó 0.1 g de polietileno (PE), 5 ml de agua. Se agitó el tubo en un vórtex a velocidad 5. Inmediatamente después se midió el tiempo que les tomó llegar a la superficie a las partículas de polietileno para los diferentes tamaños de abertura de malla.

De lo anterior se seleccionó la fracción de partículas más abundante y con menor velocidad ascensional que es aquella con diámetro entre 0.28 y 0.149 mm del polietileno de baja densidad.

Por otro lado se calcularon la densidad real y aparente del PE mediante las siguientes fórmulas.

$$\rho_a = \frac{E - A}{F}$$

$$\rho_r = \frac{D}{[B - A + D - (C - A)]}$$

En donde:

ρ_a	= Densidad aparente.
ρ_r	= Densidad real.
A	= Peso del matraz aforado.
B	= Peso del matraz aforado con agua.
C	= Peso del matraz aforado con muestra y agua.
D	= Peso de la muestra sola.
E	= Peso del matraz con muestra.
F	= Volumen del matraz aforado.

2.- PRUEBAS DE ADHERENCIA. Dado que el polietileno flota en su totalidad y los lodos anaerobios sedimentan, el objetivo de esta etapa fue diseñar un mecanismo de agitación para que existiera un contacto continuo entre los lodos y el material de soporte. Los mecanismos probados fueron los siguientes:

A) MATRACES AGITADOS.- 1 g de soporte (PE alta densidad) + 20 ml de lodos + 80 ml de medio anaerobio + acetato de sodio 5 g/l. Agitación recíproca a 100 rpm.

B) BOTTAS "SERUM".- 1 g de soporte (PE alta densidad) + 20 ml de lodos + 80 ml de medio + acetato de sodio 5 g/l. Agitación recíproca a 100 rpm.

C) TUBOS DE ENSAYE.- 2 g de PE de alta densidad + 40 ml de lodos + 10 ml de medio anaerobio + acetato de sodio 5 g/l. Agitación rotatoria 8 rpm (figura 3.2).

D) SOPORTE EMPACADO.- En un reactor de 5 l de capacidad se empaçaron 4 cribas con 100, 75, 50 y 25% de su capacidad con PE. En este mecanismo primero se determinó la distribución del líquido haciendo pasar a través del reactor empaçado una solución de azul de metileno. Dicha distribución no resultó ser la adecuada, es decir, no todo el soporte tuvo contacto con el colorante, por lo que se desechó el mecanismo y no se probó con lodos (Figura 3.3).

E) SOPORTE FLUIDIZADO.- Después de las anteriores experiencias se llegó a la conclusión de que lo que se necesitaba era, en primer lugar, disminuir al máximo las fuerzas constantes o de fricción y, en segundo lugar, aumentar la concentración de lodos para elevar la posibilidad de contacto y de adherencia como consecuencia. Así pues, la

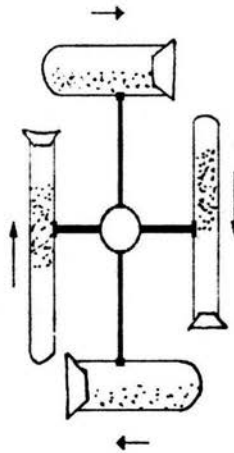


FIGURA 3.2.- Prueba de adherencia con tubos en rotacion a 8 rpm.

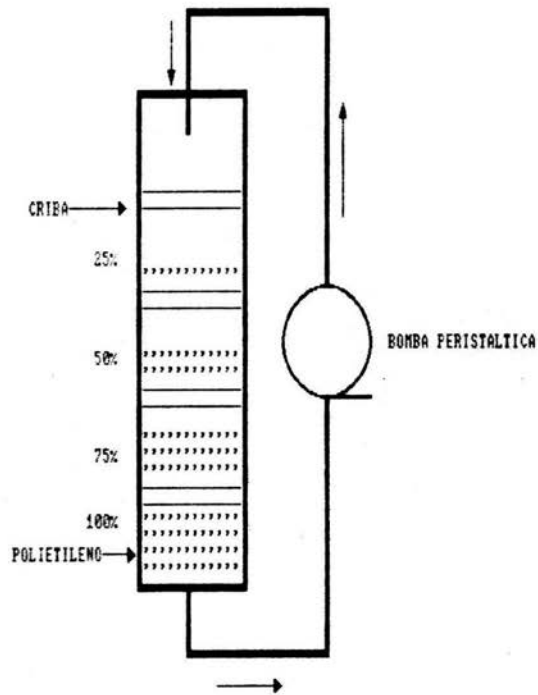


FIGURA 3.3 Modelo de la prueba con el soporte empacado.

experiencia adquirida ayudo a diseñar un nuevo mecanismo para mantener en contacto continuo lodos y material de soporte sin necesidad de agitación; tratando de reducir así los esfuerzos cortantes. De esta manera se intento nuevamente la formación de la biopelícula.

El diseño del mecanismo, así como las condiciones de experimentación se muestran en la figura 3.4 y en la tabla 3.1 respectivamente. Consiste en una columna de vidrio a la que se le alimenta el medio (cuya composición se describe en la tabla 3.3) por la parte superior para dar un flujo descendente y oponerse a la fuerza ascendente de flotación de las partículas de polietileno.

A la salida del reactor se colocó una trampa de sólidos para evitar que los que fueran arrastrados, obstruyeran la bomba peristáltica.

Semanalmente se extraía el medio anaerobio y se reemplazaba por nuevo por la parte inferior del reactor para no crear demasiada turbulencia en la zona de biopartículas. El medio nuevo contenía el sustrato que reponía al consumido.

Se inició el experimento adicionando 25 g de soporte de polietileno y 120 ml de lodos anaerobios de 55,300 mg SSV/l provenientes de un reactor UASB que trataba lirio acuático (Briones et al.1988).

F) PELICULA FIJA.- El diseño y condiciones de experimentación se muestra en la figura 3.5 y en la tabla 3.1

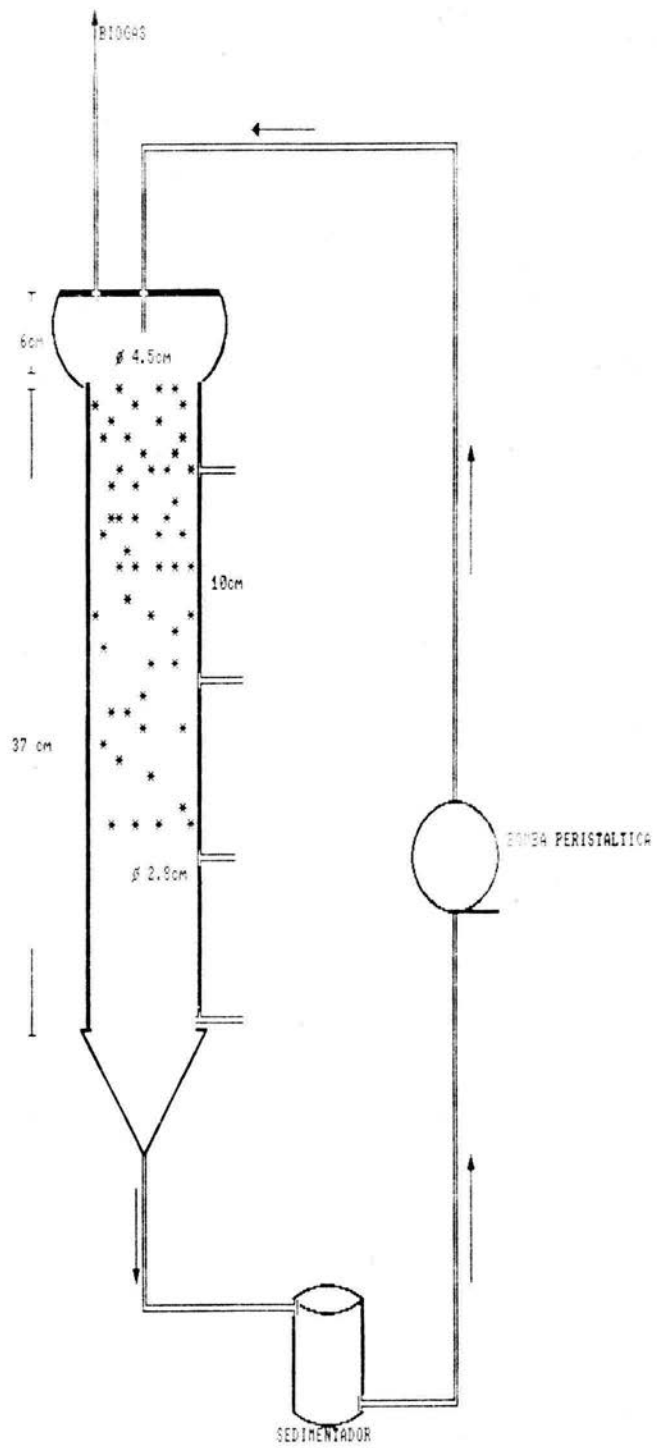


FIGURA 3.4.-Columna de lecho fluidizado invertido.

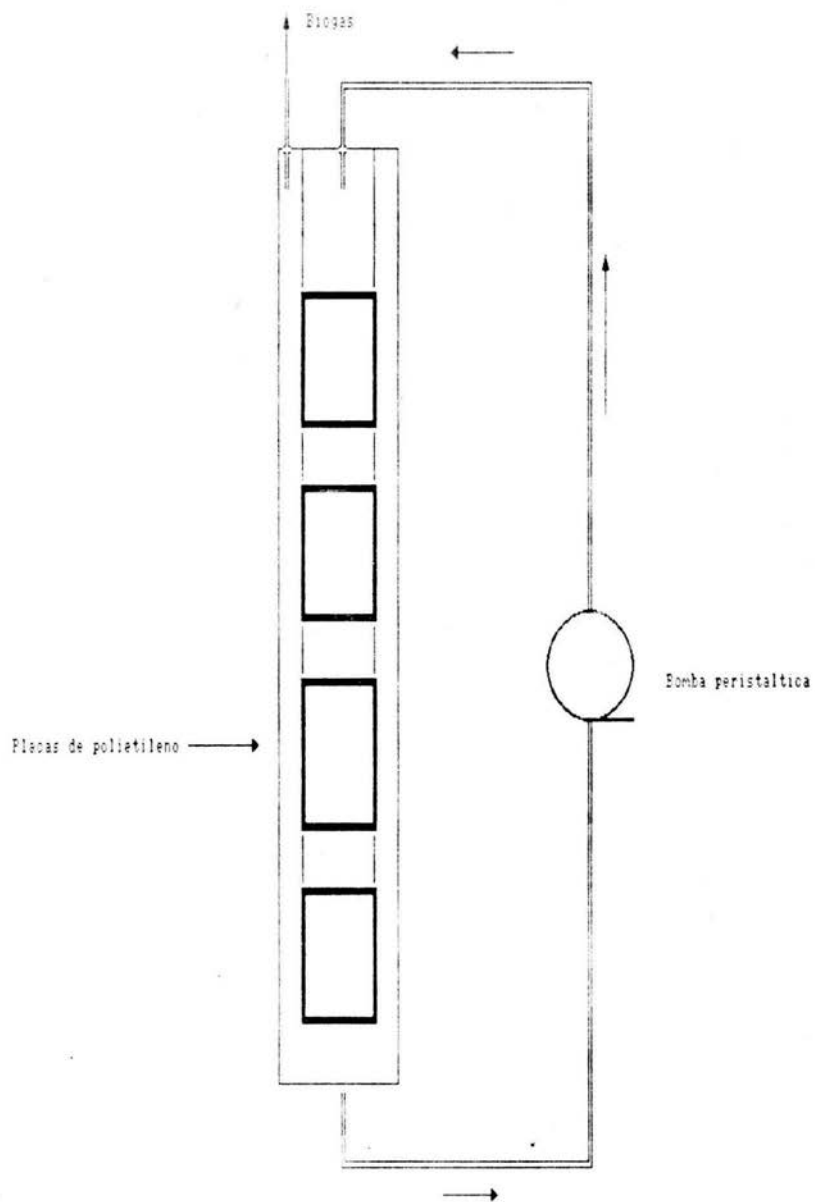


FIGURA 3.5.- Fermentador de película fija de flujo invertido.

respectivamente. Consiste en una columna de vidrio a la que se introdujeron cuatro placas de PE de 51 x 30 x 3 mm .

Al igual que con el reactor de lecho fluidizado, se alimento por arriba para tener flujo descendente y con la misma composición del medio (tabla 3.3).

	MOLIDO(e)	PLACA(f)
VOLUMEN DEL REACTOR	125 ml	500 ml
DIAMETRO	0.107 mm	
SOPORTE	25 g	51x30x3 mm
COMPOSICION DEL MEDIO		acético 2.28g/l propiónico 0.93g/l butírico 0.75g/l
RELACION LODO-MEDIO	40% - 60%	
VELOCIDAD DE FLUJO	2 m/h	

TABLA 3.1.- Condiciones experimentales de los mecanismos e y f.

3.- ACTIVIDAD METANOGENICA DE LAS BIOPARTICULAS.

A) INOCULACION.- Del reactor de lecho fluidizado se tomó una muestra de biopartículas, que ocupó un volumen de 3 ml despues de darle 3 min de reposo. Se dejo esta muestra 12 hr en la precámara de acceso a la cámara anaerobia marca Coy, bajo un vacío de 20 mm de Hg con objeto de agotar los sustratos residuales de la muestra y dejar escapar el gas producido, para así reducir al mínimo la influencia de los

sustratos residuales presentes en las muestras frescas. Dentro de la cámara anaerobia se adicionaron 2 ml de medio de reacción para tener un volumen final de 5 ml.

Para medir la actividad metanogénica de las placas , estas se introdujeron en frascos bien sellados en el mismo medio de reacción.

Los sustratos adicionados al medio de reacción fueron los ácidos acético, propiónico y butírico a concentraciones de 10 mM cada uno. La adición del sustrato se efectuó por medio de jeringas a partir de soluciones preparadas en anaerobiosis. El inicio de la cinética correspondió con el momento de agregar el sustrato. La cinética para el ácido acético se efectuó en viales separados de la cinética para los ácidos propiónico y butírico, ya que de otra manera, el acético proveniente de la degradación del propionato y del butirato no permitiría hacer una buena cuantificación de la degradación del acético (Ramírez et al. 1988).

B) CROMATOGRAFIA.- Del medio reaccionante se tomaron con jeringa muestras de 0.2 ml a diferentes tiempos. Dichas muestras fueron colocadas en viales de microcentrifuga que contenían 100 ul de H_2SO_4 al 50% para evitar la descomposición de la muestra. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se recuperó para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles presentes (Ramírez et al. 1988).

Para analizar la concentración de dichos ácidos se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 con detector de

ionización de flama. Se empleo nitrógeno como gas acarreador y una columna de acero inoxidable empacada con Porapak Q. El flujo de nitrógeno fue de 30 ml/min.

4.- SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES Y VOLÁTILES.

Los sólidos suspendidos totales (SST) se determinaron haciendo pasar un volumen conocido de muestra homogénea a través de un filtro de fibra de vidrio a peso constante (450⁰ C durante 30 min.). Una vez filtrada la muestra se colocó a 100-105⁰C por una hora (APHA,1985).

$$SST = \frac{(B - A) \times 10^6}{\text{volumen de muestra (ml)}}$$

En donde: A = peso del filtro a peso constante (mg)
 B = peso del filtro + residuo seco.

Para determinar los sólidos suspendidos volátiles (SSV), posterior al secado a 100⁰ C, los filtros se calcinan con la muestra en una mufla a 400⁰ C durante 30 min.

$$SSF = \frac{(C - A) \times 10^6}{\text{volumen de muestra (ml)}}$$

Donde: C = peso del filtro y muestra después de haber pasado por la mufla (mg)

$$SSV = SST - SSF$$

5.- PROTEINAS.

La cuantificación de las proteínas en las partículas se efectuó utilizando la técnica de azul de Coomassie (Bradford,1976). Se utilizó seroalbúmina bovina 0.05g/l y un buffer de NaCl 0.15 M. La elaboración de la curva patrón se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 3.2.- Datos para la preparación de la curva patrón de proteínas (SAB=seroalbumina bovina, X= muestra problema).

[prot.]ug/ml	buffer (ml)	SAB (ml)	coomassie (ml)	muestra (ml)
0	2	0	2	-
10	1.8	0.2	2	-
20	1.6	0.4	2	-
30	1.4	0.6	2	-
40	1.2	0.8	2	-
50	1	1	2	-
60	0.8	1.2	2	-
70	0.6	1.4	2	-
80	0.4	1.6	2	-
90	0.2	1.8	2	-
100	0	2	2	-
X	-	-	2	2

6.- MEDIO DE REACCION.

Se utilizó un medio basal anaerobio completo (Touzel,1983), los componentes del mismo se muestran en la tabla 3.3 . El medio se hirvió bajo nitrógeno y se enfrió a 40⁰ C. Posteriormente se reemplazó el nitrógeno por una mezcla N₂-CO₂ al 85%-15% respectivamente. Finalmente el medio fue esterilizado.

CONSTITUCION DEL MEDIO BASAL (1L)			
	Solución mineral 1		50 ml
	Solución mineral 2		50 ml
	Oligoelementos		10 ml
	Solución de vitaminas		10 ml
	Rezarsurina		1 ml
	Extracto de levadura		1 g
	Peptona de caseína		1 g
	Bicarbonato de sodio		4 g
	Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		1 ml
	Solución de NiCl		10 ml
	Cisteína		0.1 g
SOLUCION MINERAL 1 (mg/l)		SOLUCION MINERAL 2 (mg/l)	
KH_2PO_4	180	K_2HPO_4	296
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	150		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	90		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60		
NaCl_2	10		

Tabla 3.3.- Composición del medio anaerobio empleado en el estudio.

7.- OBSERVACIONES MICROSCOPICAS.

Una fracción de las muestras tomadas para determinar la actividad metanogénica o fisiológica de las biopartículas se destinó para hacer observaciones a microscopia de epifluorescencia y de este modo poder observar físicamente la adhesión de los microorganismos al soporte. Se empleó anaranjado de acridina al 0.02%.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de los resultados obtenidos de las pruebas de flotabilidad y de las de distribución de tamaños hechas para las partículas de polietileno; se eligió trabajar con PE de baja densidad y con las partículas retenidas en la malla de 0.149 mm . Ver tabla 4.1. Se observó que los mecanismos para iniciar la colonización utilizando soporte empacado, tubos y matraces agitados no dieron resultados positivos pues la velocidad de agitación no permitió la adherencia de los microorganismos; por lo tanto, para polietileno molido se empleó el mecanismo del fermentador de flujo descendente.

ABERTURA DE MALLA	VELOCIDAD PE ALTA D	DE PARTICULAS PE BAJA D
0.28 mm	0.285cm/seg	0.333
0.149mm	0.083	0.114
0.105mm	0.022	0.025
0.074mm	0.013	0.016
APARENTE		0.30g/cm ³
REAL		0.64g/cm ³
VOLUMEN		6.41x10 ⁻⁴ mm ³
SUPERFICIE		875.6mm ² /g

TABLA 4.1.- Resultados de la velocidad de ascención de partículas obtenidas a diferentes aberturas de malla. Para los experimentos de colonización se empleo la porción de polietileno más abundante de acuerdo a la abertura de malla y la de menor velocidad de ascención.

DISTRIBUCION DE TAMAÑOS

POLIETILENO ALTA Y BAJA DENSIDAD

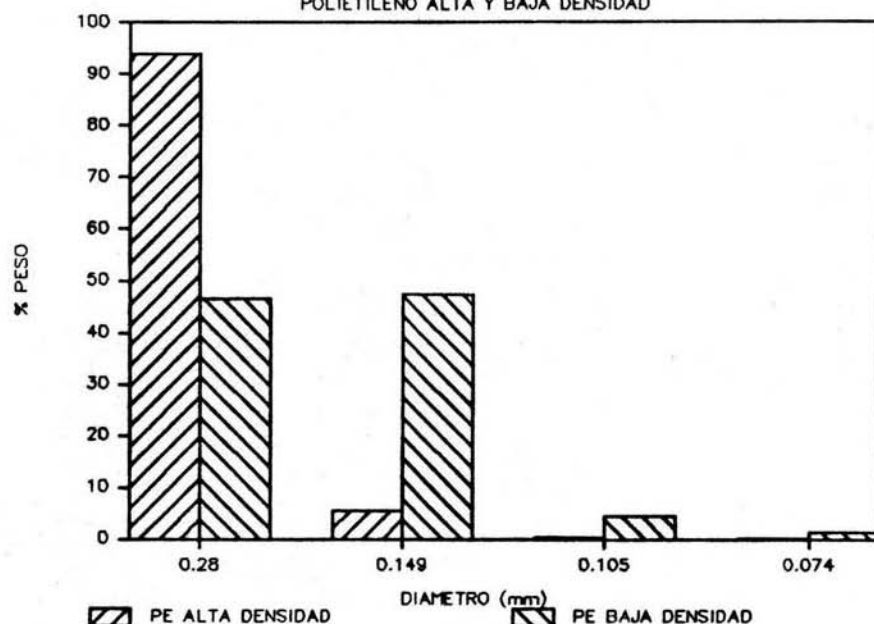


Fig.4.1.-Gráfica de distribución por tamaños de las partículas utilizadas para el estudio.

COLONIZACION EN POLIETILENO MOLIDO

Se corrió un primer experimento (corrida 1) para medir la velocidad de formación de biopelícula en los soportes de polietileno. Se tomaron muestras a los 16 ,21 y 28 días de la manera que se señala en la sección III.3a de material y métodos y se les midió la actividad acidoclástica (degradadora de ácidos) que consiste en medir la velocidad de degradación de los ácidos grasos volátiles, acético, propiónico y butírico y relacionar su desaparición con la formación de metano. Los resultados se muestran en las figuras 4.2 a 4.4.

FIG.4.2—Degradacion de AGV

corrida 1 dia 16.

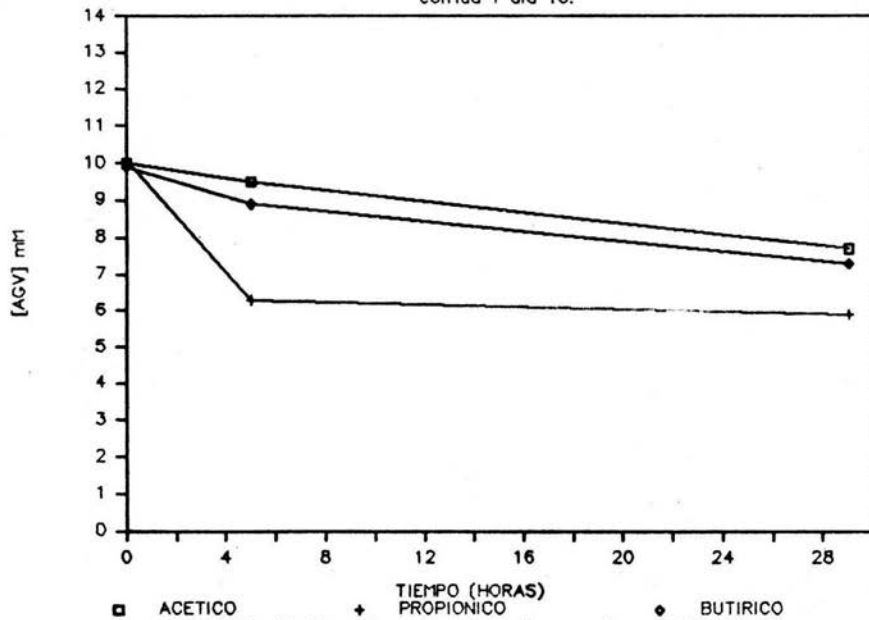


FIG.4.3—Degradacion de AGV

corrida 1 dia 21.

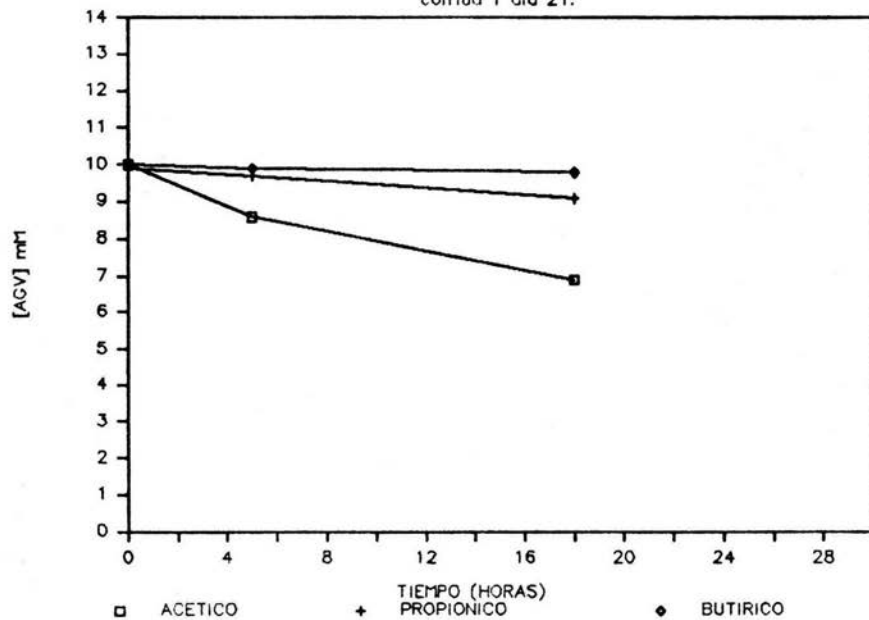
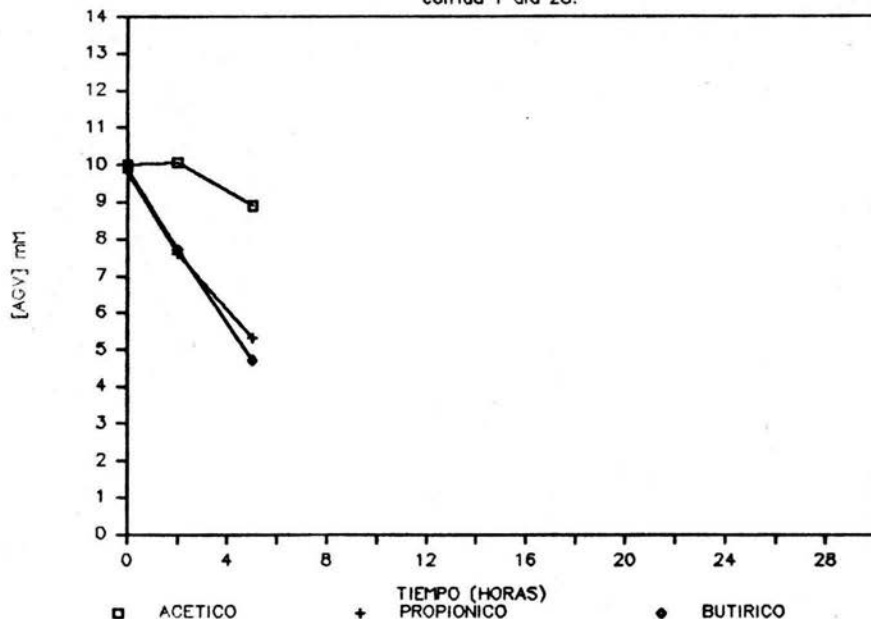


FIG.4.4—Degradacion de AGV

corrida 1 día 28.



Cada curva se ajustó a una recta por medio de una regresion lineal de primer orden con objeto de establecer la pendiente que equivale a la velocidad de degradación del ácido. Para obtener la actividad específica se dividió entre la cantidad de sólidos totales que se introdujeron en los viales (ver anexo 7.1).

En la tabla 4.2 se muestra la evolución de la actividad acidoclástica de las biopartículas durante el proceso de contacto lodos-polietileno.

ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ moles ácido/hr.mg SST)			
DIA	ACETICO	PROPIONICO	BUTIRICO
16	0.00176	0.00237	0.0018
21	0.0058	0.0016	0.00372
28	0.0085	0.023	0.027

Tabla 4.2.- Medición de la actividad específica de partículas anaerobias fluidizadas en función del tiempo para la corrida 1.

Se pudo apreciar en el día 16 que hubo una mejor actividad de las bacterias acetogénicas (que generan ácido acético a partir de los ácidos propiónico y butírico) que de las acetoclásticas.

En el día 21 (figura 4.3) se observó un aumento de la actividad acetoclástica y una disminución de la acidoclástica. Para el día 28 (figura 4.4) la actividad acidoclástica resultó ser mejor que la acetoclástica.

En una segunda corrida se extendió el tiempo de contacto hasta 101 días y también se comparó contra el proceso de formación de película en una placa fija.

Se repitieron las condiciones de la corrida 1 y sólo se tomaron muestras en los días 71 y 101 para reducir los riesgos de desestabilización del sistema debido a la toma de las muestras.

Se puede apreciar, tanto en las figuras 4.5 y 4.6 como en la tabla 4.3, que la actividad bacteriana ya es constante; la cinética de degradación del ácido acético es mayor que las de los otros ácidos.

FIG.4.5—Degradacion de AGV

corrida 2 dia 71.

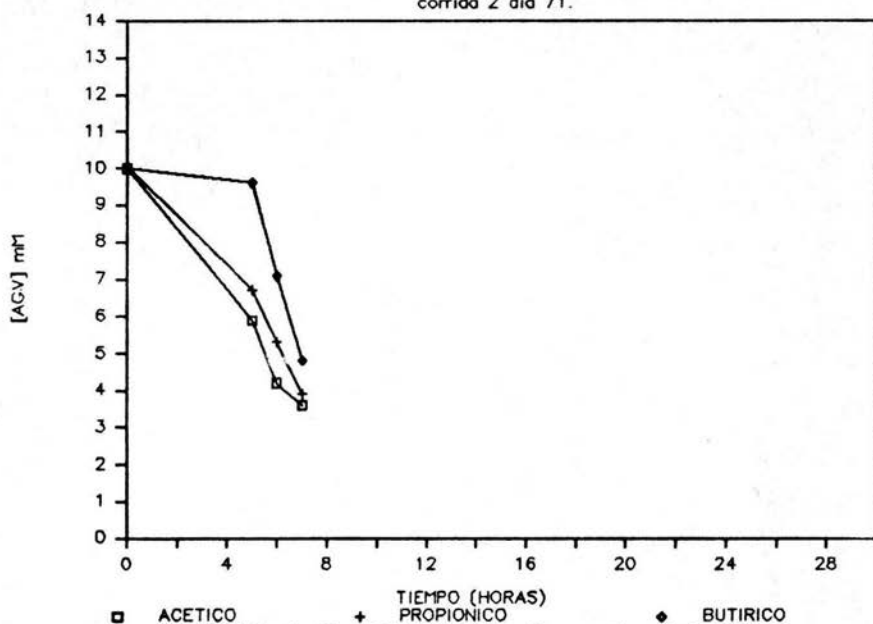
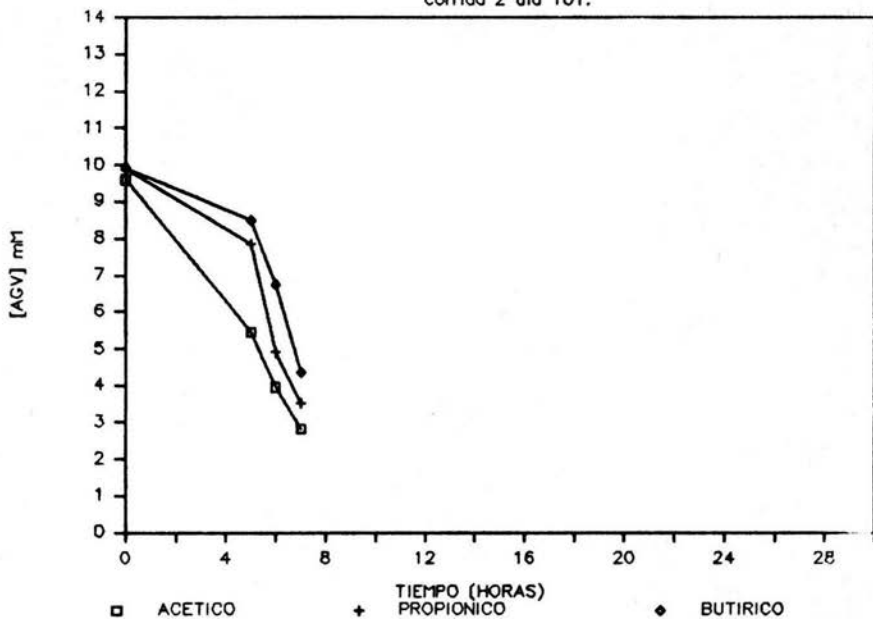


FIG.4.6—Degradacion de AGV

corrida 2 dia 101.

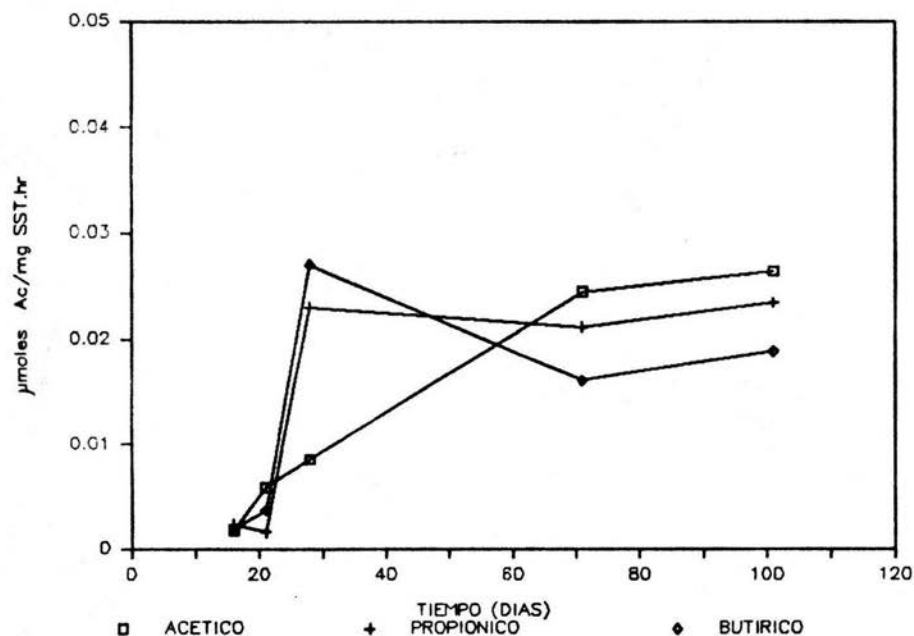


ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ moles ácido/hr. mgSST)			
DIA	ACETICO	PROPIONICO	BUTIRICO
71	0.02446	0.02214	0.01605
101	0.02637	0.02346	0.01885

Tabla 4.3.- Medición de la actividad específica de partículas anaerobias fluidizadas en función del tiempo para la corrida 2.

La figura 4.7 muestra el desarrollo de la actividad específica de ambas corridas expresada en μ moles de ácido/mg SST.h.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE BIOPARTICULAS



Se apreció claramente que la actividad metanogénica, a diferencia de la acidoclástica va en aumento durante todo el tiempo que duró el experimento. Los microorganismos degradadores de propiónico y butírico se mantienen muy activos hasta el día 28, a partir del día 60 aproximadamente, la actividad acidoclástica disminuye ligeramente, aunque después de los 70 vuelve a aumentar.

En el largo plazo se pudo apreciar una estabilización de la actividad acidoclástica. La butiroclástica por abajo de las del ácido propiónico y acético.

Para arena, Gorris (1988) reporta actividades de 2.28 $\mu\text{mol CH}_4/\text{hr.mg SSV}$ (ver tabla 4.5) que aparentemente resultan ser mejores que la de nuestro estudio; sin embargo, hay que considerar que con polietileno es difícil separar los SSV (que representan la biomasa) de los SST (biomasa + soporte) pues el polietileno se incineraba en la mufla y por tanto no se tenía una estimación exacta del porcentaje de biomasa en las biopartículas.

La ventaja de nuestro sistema de biopartículas de polietileno es que el gasto energético extra es prácticamente nulo, pues gracias a la baja densidad del soporte (0.64 g/cm^3) y al mecanismo de flujo invertido a una velocidad de 2 m/h se puede distribuir a las biopartículas en el reactor con una muy pequeña tasa de recirculación (menor a 5 suponiendo 12h de tiempo de retención y 5 m de altura del reactor). Sin embargo, es posible bajar la tasa de recirculación si se usan

partículas de polietileno diseñadas para lograr velocidades de ascención menores a la que usamos en este estudio.

COLONIZACION EN PLACAS DE POLIETILENO

La actividad de la flora metanogénica acetoclástica fue similar a la actividad acidoclástica (figuras 4.8 y 4.9). En la tabla 4.4 se observa la actividad específica en base a la superficie colonizada de acuerdo a los cálculos indicados en el anexo 7.2.

ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ moles ácido/hr.cm ²)			
DIA	ACETICO	PROPIONICO	BUTIRICO
71	2.29	2.09	1.77
101	2.89	2.67	2.26

Tabla 4.4.- Medición de la actividad específica en placa.

FIG.4.8-Degradación de AGV

placa día 71.

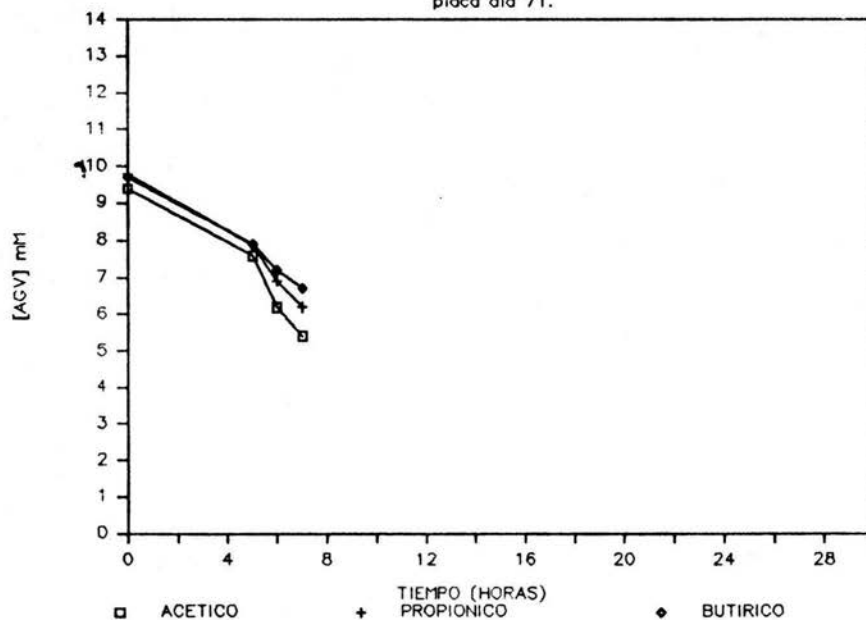
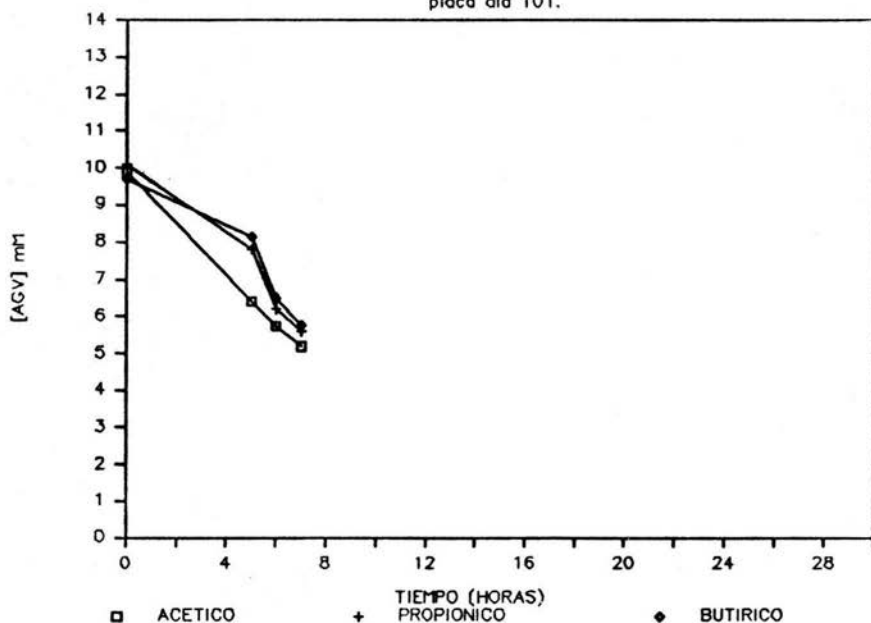


FIG.4.9—Degradación de AGV

placa día 101.



En la tabla 4.5 se compara la actividad metanogénica de los experimentos en placa y fluidizado.

Se puede apreciar que la actividad específica de las biopartículas aumenta de $0.00176 \mu\text{mol CH}_4/\text{mgSST.h}$ en el día 16 hasta 0.026 en el día 101. Un 16% de aumento cada día. Esta actividad específica toma en cuenta los sólidos inertes y la biomasa, pues no fue posible separarlos.

Por su parte, la actividad de la película fija alcanzó $14.9 \mu\text{mol CH}_4/\text{mg SSV.h}$ al final del experimento. En este caso se tomaron únicamente los sólidos suspendidos volátiles adheridos a la placa y no la placa. La razón es que las placas se pueden hacer tan delgadas como se quiera y aquí se escogió una de dimensiones arbitrarias.

La actividad alcanzada por la película bacteriana en la placa al final del experimento resultó ser buena si la comparamos con los resultados de Verrier et al. (1988) que obtuvo con placas de polietileno una actividad de 7.65×10^{-3} $\mu\text{mol CH}_4/\text{h } \mu\text{g}$ proteína en dos horas después del contacto soporte-microorganismos y en condiciones estáticas. ver tabla 4.5.

Tabla4.5.- Actividad metanogénica en soportes inertes.

SOPORTE	MEDIDA CARACT. (mm)	$\frac{\mu\text{molCH}_4}{\mu\text{gprot.h}}$	$\frac{\mu\text{molCH}_4}{\text{mgSSV.h}}$	$\frac{\mu\text{gprot}}{\text{gsopite}}$	$\frac{\mu\text{gprot}}{\text{cm}^2\text{sop}}$	Ref.
PE		7.65				Verrier
PP		2.26				"
PVC		0.66				"
ARENA	0.1-0.3	15.2	2.28	26000		Gorris
SEPIOLITA				6800	0.00243	"
PEmolido	0.107	72.45		56.4	6.44	*
PEplaca	51x30	58.80	14.9		4.96	*

* Este estudio.

Los datos de nuestro estudio comparados en la tabla 4.5 con los de otros autores que utilizan otro tipo de soportes para la colonización bacteriana nos indican que los polímeros plásticos son una opción importante para ser empleados en reactores que retienen la biomasa.

Para poder comparar mejor la velocidad de colonización y la actividad obtenida en ambos soportes se comparan con base en proteína microbiana como se muestra en la tabla 4.6.

ACTIVIDAD ESPECIFICA				
MOLIDO	DIA	$\frac{\mu\text{mol CH}_4}{\text{mg SST.h}}$	$\frac{\mu\text{mol CH}_4}{\mu\text{g prot.h}}$	$\frac{\mu\text{molCH}_4}{\text{cm}^2\cdot\text{h}}$
	16	0.00176	38	02
	21	0.0059	42.05	0.663
	28	0.0085	48.16	0.9714
	71	0.024	58.02	2.628
	101	0.026	72.46	2.97
PLACA	DIA	/mgSSV		
	71	12.7	27.86	2.29
	101	14.9	58.80	2.97

TABLA 4.6.- Comparación de la actividad específica de biopartículas y película fija.

La segunda columna de la tabla 4.6 nos muestra que la velocidad de colonización de las partículas es mayor que la de la placa. Si se asume que la forma promedio de la partícula es esférica y se toman 0.149 mm como diámetro promedio, se puede estimar que hay $875\text{mm}^2/\text{gST}$ (Tabla 4.1). La cuarta columna de la tabla 4.6 nos indica la velocidad de colonización por cm^2 de partícula y de placa. Se apreció que la actividad metanogénica por superficie colonizada fue mayor en la placa que en las partículas, pero por μg de proteína resultó mayor en la partícula. Esto pudiera indicar que la

flora que coloniza las partículas es más activa que la que coloniza la placa.

ANALISIS MICROSCOPICO POR EPIFLUORESCENCIA

La figura 5.1 muestra los lodos anaerobios que fueron empleados para la inoculación del reactor. La fig.5.2 muestra el soporte al inicio del experimento, es decir, al tiempo cero. Las fig. 5.3 y 5.4 muestran las partículas de polietileno con zonas de colonización en muestras tomadas a los 101 días de experimentación. En las fotografías las regiones colonizadas aparecen en tonos muy brillantes.

La tinción con anaranjado de acridina nos permitió distinguir el soporte colonizado del que sí lo estuvo, ya que el colorante sólo es fluorescente al contacto con los ácidos nucleicos.

Esta técnica de fluorescencia fue empleada con anterioridad por Touzel y Verrier quienes la utilizaron con el mismo fin que nosotros, y resultando de gran utilidad. En nuestro caso, la microscopía óptica simple no nos permitió distinguir claramente los inicios de colonización en nuestro soporte y por ello la adopción de la técnica de fluorescencia.

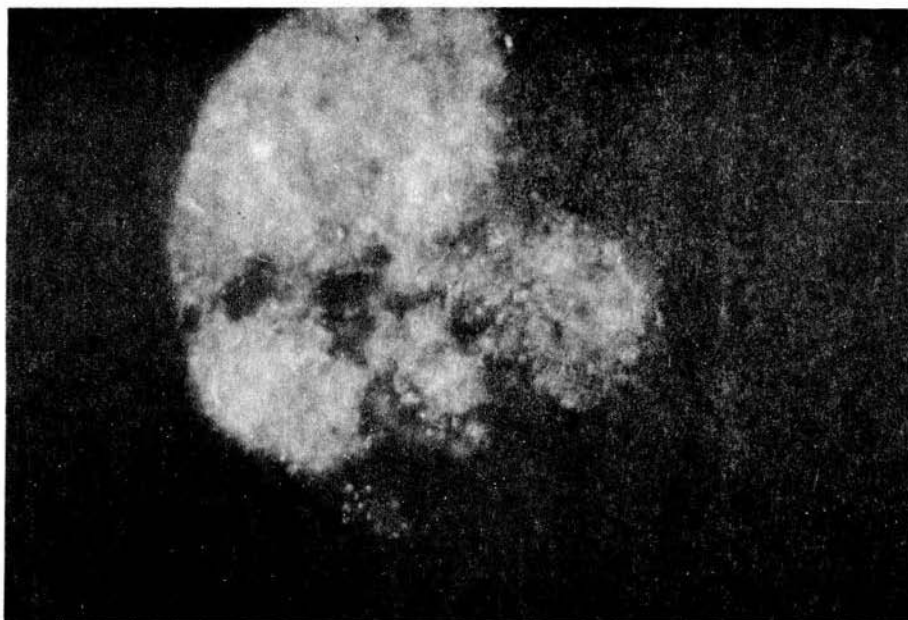


Fig.5.1. Granulo anaerobio aumentado 400 veces.



Fig.5.2. Partícula de polietileno aumentado 100 veces.

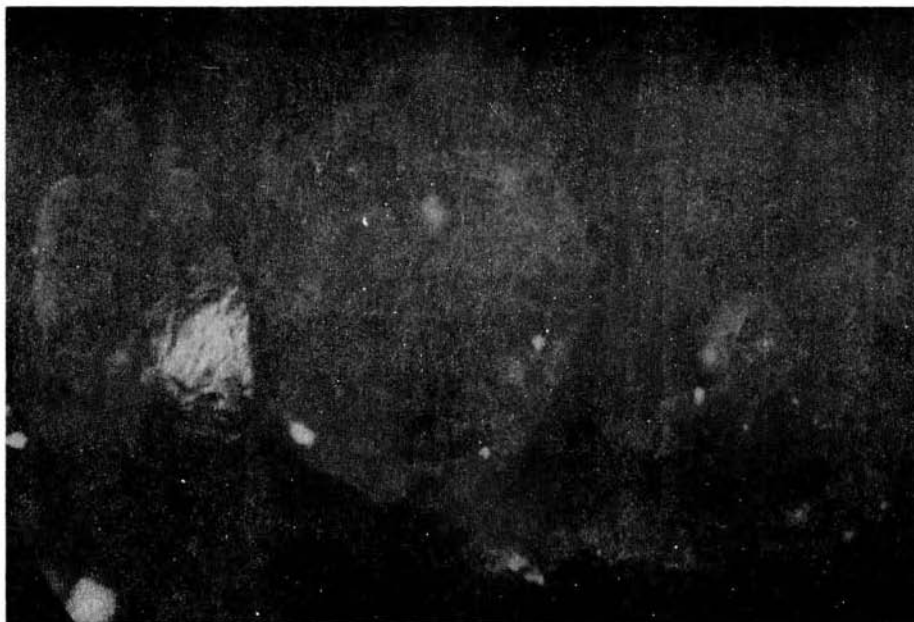


Fig. 5.3 Tres partículas de polietileno colonizadas.
Tomadas a los 101 días y aumentadas 100 veces.



Fig. 5.4 Acercamiento de la Fig. 5.
Colonización en una cavidad de polietileno. Aumentada 400 veces.

V. CONCLUSION

El polietileno de baja densidad molido resultó ser adecuado para la colonización de flora anaerobia tanto acidogénica como metanogénica. Se logró obtener una actividad de las biopartículas de $72.45 \mu\text{mol CH}_4/\text{hr.}\mu\text{g}$ proteína para el día 101 y de 58.80 en el mismo día para el caso del polietileno en placa.

Las partículas mostraron una mayor actividad que las placas, así pues, los polímeros plásticos, en este caso el polietileno es una opción importante para ser usados como soportes en reactores que retienen la biomasa.

El gasto energético para distribuir biopartículas con soportes de muy baja densidad como el polietileno y utilizando flujos invertidos es prácticamente nulo, pudiéndose hacer dicha distribución con muy pequeñas tasas de recirculación.

En el proceso de colonización del soporte se alcanzó la fase de transformaciones microbianas , es decir, el crecimiento y metabolismo de los microorganismos adheridos; a pesar de que en sistemas anaerobios, como ya se mencionó, este proceso ocurre muy lentamente.

Como en todos los sistemas biológicos, aquí se pudo notar una sucesión de microorganismos presente en las primeras etapas de adhesión al soporte, reflejado por las actividades acetoclástica y metanogénica en la que la primera predominaba al inicio y posteriormente se llegó a una estabilización de ambas floras.

La colonización de las partículas no se dió empleando mecanismos para el contacto lodos-polietileno que involucraban agitación en tubos o matraces.

Por su parte la técnica de tinción con anaranjado de acridina resultó en este estudio de gran ayuda para observar las zonas de colonización en el soporte.

Finalmente se puede decir que los objetivos planteados fueron cumplidos, pues se logró la colonización en el material propuesto obteniendo biopartículas y biopelículas activas y de bajo costo debido básicamente al tipo de soporte utilizado, ya que fue material de desecho. Sin embargo, estos han sido los primeros pasos, ya que la implantación del sistema aún requiere de otro tipo de estudios tales como la adaptación de las biopartículas a aguas residuales, así como otros estudios de ingeniería ambiental.

VI. BIBLIOGRAFIA

APHA (1985) Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th. ed. American Public Health Association. New York.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micr quantities of protein Anal.Biochem. 72. p248.

Briones M., Rodríguez D., Noyola A. (1988) Tratamiento de un agua de tipo residual doméstico con reactores anaerobios avanzados y lirio acuático. Memorias del V Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 215-222.

Cord-Ruluisch (1986) Facultative and partial interspecies hydrogen transfer-competition for reducing equivalents. Biology of anaerobic bacteria. Pergamon Press. The Netherlands. 16-22.

Dubourgier H.C. et al. (1988) Structure and metabolism of methanogenic microbial conglomerates. Proceedings of the V International Symposium on Anaerobic Digestion. Pergamon Press. The Netherlands. 13-21.

García J.L. (1982) Relations between acidogenesis and the utilization of lactate, sulfate and nitrate during anaerobic digestion. Memorias del simposio internacional Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación. UAM-I/ICAITIC. México.

Gorris (1988) Biofilm development in lab-scale methanogenic fluidized bed reactor. Granular anaerobic sludge; microbiology and biotechnology. Pergamon Press. The Netherlands. 87-95.

Guiot S.R., Goror S.S., Kennedy K.J. (1988) Nutritional and environmental factors contributing to microbial aggregation during Upflow Anaerobic Sludge Bed-Filter (UBF) reactor start-up. Proceedings of the V International Symposium on Anaerobic Digestion. Pergamon Press. The Netherlands. 55-60.

Guyot J.P. (1988) Microbiología de la digestión anaerobia. Memorias del curso-Universidad de Antioquia. Medellín. 1-87.

Guyot J.P., Noyola A., Ramírez F. (1988) Actividades metanogénicas de lodos granulares de un digester de lecho de lodos. Memorias del I Simposio sobre Ingeniería Ambiental. UNAM. 179-197.

Henk (1984) Environmental biotechnology. Innovations in biotechnology. Pergamon press. The Netherlands. 103-155.

Hobson P.N. (1982) The microbiology of the rumen and anaerobic digesters: a comparison. Memorias del Simposio Internacional Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación UAM-ICAITIC. México.

Iza J. García P.A., Sanz I. (1988) Granulation results in anaerobic fluidized bed reactors. Granular anaerobic sludge: microbiology and biotechnology. Pergamon Press. The Netherlands. 195-202.

Kennedy M., Droste (1985) Start-up of anaerobic downflow stationary fixed film (DSFF) reactor. Biotechnology and Bioengineering. 27:1152-1165.

Kobayashi et al. (1988) Direct characterization of methanogens in two high-rate anaerobic biological reactors. Applied and Environmental Microbiology. 54 (3) 693-698.

Lettinga G. et al. (1982) Anaerobic waste water treatment using the UASB-treatment process. Memorias del Simposio Internacional Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación UAM-ICAITIC. México.

Monroy O. (1982) Tratamiento anaerobio de aguas residuales tipos de reactores y procesos. Memorias del V Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. México 530-536.

- Monroy O., Noyola A. (1986) Digestión anaerobia y lirio acuático en el tratamiento de aguas residuales. Memorias del V Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. México. 507-525.

Noyola A.(1988) Los procesos anaerobios en el tratamiento de aguas residuales .Memorias del I Simposio sobre Ingeniería Ambiental.UNAM. 1-10.

Noyola A.,Guyot J.P.,Monroy O.(1988) Comparación experimental de dos tipos de reactores anaerobios avanzados. Memorias del I Simposio sobre Ingeniería Ambiental.UNAM.278-296.

Omstread D. et al.(1980) Membrane-controlled digestion:Anaerobic production of methane and organic acids. Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 10 247-258.

Ramírez F.,Vargas G.,Monroy O.(1988) Digestión anaerobia del lirio acuáticoÑ Fase acetogénica. Memorias del I Simposio sobre Ingeniería Ambiental.UNAM.198-214.

Sam-Soon P.A.L. et al.(1988) Pelletization in upflow anaerobic sludge bed reactors. Proceedings of the V international Simposium on Anaerobic Digestion.Pergamon Press. The Netherlands. 55-60 checar

Schoberth S.M.(1982) Methanogenic flora and their metabolic routes. Memorias del Simposio Internacional Avances en Digestión Anaerobia:Combustibles por Fermentación.UAM-ICAITIC.México.

Schink B.(1986) Environmental aspects of the degradation potential of anaerobic bacteria. Biology of anaerobic bacteria.Pergamon Press. The Netherlands. 2-15.

Speece Richard (1983) Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. Environ. Sci. Technol. 17(9) 16-27.

Shieh W.,Sutton P.,Kos P. (1981) Predicting reactor biomass concentration in a fluidized-bed system. Journal WPCF.53:11 1574-1583.

Switzenbaum M.S.,Robins J.P.,Hickey R.F. (1988) Immobilization of anaerobic biomass. Environmental Eng. Program. USA. 115-131.

Toldrá et al.(1986) Fluidized bed biomethanation of acetic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:336-341.

Touzel J.P., Albagnac G.(1983) Isolation and Characterization of Methanococcus mazei strain MC3. FEMS Microbiol. Lett. 16,241-245.

Trulear M., Characklis W.(1982) Dynamics of biofilm processes. Journal WPCF. 54:1288-1301.

Van den Berg L.(1982) Use of anaerobic downflow stationary fixed film reactors for waste treatment and methane production. Memorias del Simposio Internacional Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación. UAM-ICAITIC. México.

Verrier D. et al.(1988) Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. Proceedings of the V International Symposium on Anaerobic Digestion. Pergamon Press. The Netherlands. 61-68.

Verstrate et al.(1987) Aerobic versus anaerobic wastewater treatment. Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology. Amsterdam. 49-63.

Wiegant (1988) The "spaghetti theory" on anaerobic granular sludge formation, or the inevitability of granulation. Granular anaerobic sludge: microbiology and biotechnology. Pergamon Press. The Netherlands.

William J.(1981) Municipal wastewater treatment with the anaerobic attached microbial film expanded bed process. Journal WPCF. 53 (4) 482-490.

Woese C.(1980) Archibacterias. Ciencia. 44 : 48-61.

ANEXO 7.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CALCULOS DE LA PRUEBA
DE ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS PARTICULAS EN LECHO
FLUIDIZADO

a) CINETICA 1a. corrida.

DIA	HORAS	[A]mM	[P]mM	[B]mM	SST mg/l	SSV mg/l
	0	10	10.1	9.9		
16	5	9.5	6.3	8.9	73680	73300
	29	7.7	5.9	7.3		
	0	10	9.9	10		
21	5	8.6	9.7	9.9	46540	46320
	18	6.9	9.1	9.8		
	0	10	9.8	10		
28	2	10.07	7.6	7.7	62700	62400
	5	8.9	5.3	4.7		

b) CINETICA 2a. corrida

DIA	HORAS	[A]mM	[P]mM	[B]mM	SST mg/l	SSV mg/l
	0	10	10.06	10		
71	5	5.89	6.7	9.6	65066	62860
	6	4.2	5.3	7.09		
	7	3.6	3.9	4.8		
	0	9.6	9.9	9.93		
101	5	5.44	7.85	8.5	60660	59900
	6	3.96	4.91	6.75		
	7	2.82	3.52	4.36		

c) DATOS DE LAS REGRESIONES OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CINÉTICAS DE DEGRADACION PARA LOS ACIDOS ACETICO, PROPIONICO Y BUTIRICO.

$$ac = b + mt$$

EXPERIMENTO FLUIDIZADO

	m [mM/hr]	DIA 16 b [mM]	r
acético	-0.0779	9.95	0.99
propiónico	-0.1043	8.61	0.69
butírico	-0.0824	9.63	0.97
DIA 21			
acético	-0.164	9.75	0.98
propiónico	-0.0448	9.91	0.99
butírico	-0.0104	9.97	0.96
DIA 28			
acético	-0.241	10.1	0.97
propiónico	-0.8895	9.64	0.99
butírico	-1.0368	9.85	0.99
DIA 71			
acético	-0.9226	10.07	0.99
propiónico	-0.8352	10.24	0.98
butírico	-0.6057	10.59	0.77
DIA 101			
acético	-0.9479	9.77	0.98
propiónico	-0.8434	10.34	0.83
butírico	-0.6693	10.39	0.75

d) CALCULOS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA PARA EL EXPERIMENTO FLUIDIZADO.

EXPRESADA EN BASE A LOS SST

DIA	AGV	mM AGV/hr/mg SST/l.dil	µmoles	AGV/hr.mgSST
16	acético	0.0779/73680x(3/5)	=	1.76 E-3
	propiónico	0.1043/73680x(3/5)	=	2.37 E-3
	butírico	0.0824/73680x(3/5)	=	1.8 E-3
21	acético	0.164/46540x(3/5)	=	5.8 E-3
	propiónico	0.0448/46540x(3/5)	=	1.6 E-3
	butírico	0.0104/46540x(3/5)	=	3.72 E-3

28	acético	$0.3211/62700 \times (3/5)$	=	8.5 E-3
	propiónico	$0.8895/62700 \times (3/5)$	=	0.023
	butírico	$1.0368/62700 \times (3/5)$	=	0.027
71	acético	$0.9226/65066 \times (3/5)$	=	0.02446
	propiónico	$0.8352/65066 \times (3/5)$	=	0.02214
	butírico	$0.6057/65066 \times (3/5)$	=	0.01605
101	acético	$0.9479/60660 \times (3/5)$	=	0.02637
	propiónico	$0.8434/60660 \times (3/5)$	=	0.02346
	butírico	$0.6693/60660 \times (3/5)$	=	0.01885

e). CALCULOS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA EN EL EXPERIMENTO FLUIDIZADO PARA EL ACIDO ACETICO EXPRESADA EN BASE A PROTEINA

DIA	$\frac{\text{mMacAc/hrxdil.}}{\mu\text{g prot/mlxdil.}}$		$\frac{\mu\text{mol CH}_4}{\mu\text{g prot.hr}}$
16	$0.0779 \times 0.005 / 3.42 \times 0.003$	=	38
21	$0.164 \times 0.005 / 6.5 \times 0.003$	=	42.05
28	$0.321 \times 0.005 / 11.1 \times 0.003$	=	48.15
71	$0.9226 \times 0.005 / 26.5 \times 0.003$	=	58.02
101	$0.9479 \times 0.005 / 21.8 \times 0.003$	=	72.45

f) CALCULO DE ACTIVIDAD ESPECIFICA EN EL EXPERIMENTO FLUIDIZADO EN BASE A SUPERFICIE.

superficie PE molido $875.6 \text{ mm}^2/\text{g} = 8.75 \text{ E-3 cm}^2/\text{mg}$
 densidad area = $1/8.75 \text{ E-3} = 114.28 \text{ mg ST/cm}^2$

DIA	$\mu\text{molCH}_4/\text{mg ST.hr}$	mgST/cm^2	$\mu\text{molCH}_4/\text{cm}^2\text{h}$
16	0.00177	114.28	= 0.2023
21	0.0059		= 0.663
28	0.0085		= 0.9714
71	0.0244		= 2.628
101	0.0263		= 2.97

g) CALCULO DE PROTEINA POR GRAMO DE SOPORTE.

$3.42 \mu\text{g prot/ml} \times 3\text{ml} = 10.26 \mu\text{g prot.}$

$60660 \text{ mg SST/l} \times 0.0031 = 181.98 \text{ mg SST}$

$10.26 \mu\text{g prot}/181.98 \text{ mg SST} = 0.05638 \mu\text{g prot/mg soporte.}$

$56.4 \mu\text{g prot/g spte.}/8.75\text{cm}^2/\text{g spte.} = 6.44 \mu\text{g prot./cm}^2$

ANEXO 7.2 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CALCULOS DE LA PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPECIFICA EN PLACAS.

a) CINETICA.

DIA	HORAS	[A]mM	[P]mM	[B]mM	SST mg/l	SSV mg/l
	0	9.4	9.79	9.7		
71	5	7.59	7.89	7.9	3380	2780
	6	6.19	6.9	7.2		
	7	5.4	6.1	6.7		
	0	9.89	10.1	9.7		
101	5	6.4	7.8	8.13	3720	2980
	6	5.73	6.19	6.5		
	7	5.18	5.6	5.75		

b) DATOS DE LAS REGRESIONES OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CINETICAS DE DEGRADACION PARA LOS ACIDOS ACETICO, PROPIONICO Y BUTIRICO EN EL EXPERIMENTO EN PLACA.

	DIA 71		
	m [mM/hr]	b [mM]	r
acético	-0.5420	9.58	0.92
propiónico	-0.4925	9.9	0.96
butírico	-0.4189	9.76	0.98

	DIA 101		
	m [mM/hr]	b [mM]	r
acético	-0.6813	9.86	0.99
propiónico	-0.6298	10.25	0.94
butírico	-0.5331	9.91	0.88

c) CALCULOS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA EN EL EXPERIMENTO EN PLACA EXPRESADA EN BASE A LOS SSV.

DIA	AGV	mMAGVx0.13L/h/mgSSV/L.0.002(dil)= μ molAGV/hmgSSV		
	acético	0.54206/2780	=	0.0127
71	propionico	0.49251/2780	=	0.0115
	butirico	0.41896/2780	=	0.0098
	acético	0.68137/2980	=	0.014862
101	prop.	0.62982/2980	=	0.013737
	butirico	0.5331/2980	=	0.011628

d) CALCULOS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL EXPERIMENTO EN PLACA PARA LOS ACIDOS ACETICO, PROPIONICO Y BUTIRICO EN BASE A SUPERFICIE.

DIA 71

$$\text{acético} = \frac{0.54206 \text{ mM AcAc} \times 0.130 \text{ l} \times}{\text{hr}} \times \frac{\text{-----}}{30 \text{ cm}^2} = 2.34 \text{ } \mu\text{mol AcAc o CH}_4/\text{hr cm}^2$$

* área de la placa y volúmen en el que se efectuó la cinética.

$$\begin{aligned} \text{propiónico} &= 0.49258 \times 0.130 / 30 = 2.13 \\ \text{butírico} &= 0.41896 \times 0.130 / 30 = 1.81 \end{aligned}$$

DIA 101

$$\begin{aligned} \text{acético} &= 0.68137 \times 0.130 / 30 = 2.95 \\ \text{propiónico} &= 0.62982 \times 0.130 / 30 = 2.72 \\ \text{butírico} &= 0.5331 \times 0.130 / 30 = 2.31 \end{aligned}$$

e) ACTIVIDAD ESPECIFICA EN EL EXPERIMENTO EN PLACA PARA EL ACIDO ACETICO EXPRESADA EN BASE A PROTEINA.

DIA 71

$$\frac{0.54206 \text{ mM}}{\text{hr}} \times \frac{7.65 \text{ cm}^2 \times}{4.96 \mu\text{g prot}} \times \frac{\text{-----}}{30 \text{ cm}^2} = 27.86 \text{ } \mu\text{mol AcAc/hr } \mu\text{g prot.}$$

* área de la placa empleada para determinar proteínas.

DIA 101

$$\frac{0.68137}{\text{-----}} \times \frac{7.65}{3.42} \times \frac{\text{-----}}{30} = 50.80$$

f) CALCULOS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA PARA EL EXPERIMENTO EN PLACA EXPRESADA EN BASE A SST.

DIA 71

$$\frac{0.54206 \text{ mM AcAc/hr}}{3380 \text{ mgSST/l} \times 2 \text{ ml} \times} = 0.08 \text{ } \mu\text{mol AcAc /hr mg SST}$$

* volumen de sólidos en la película.

DIA 101

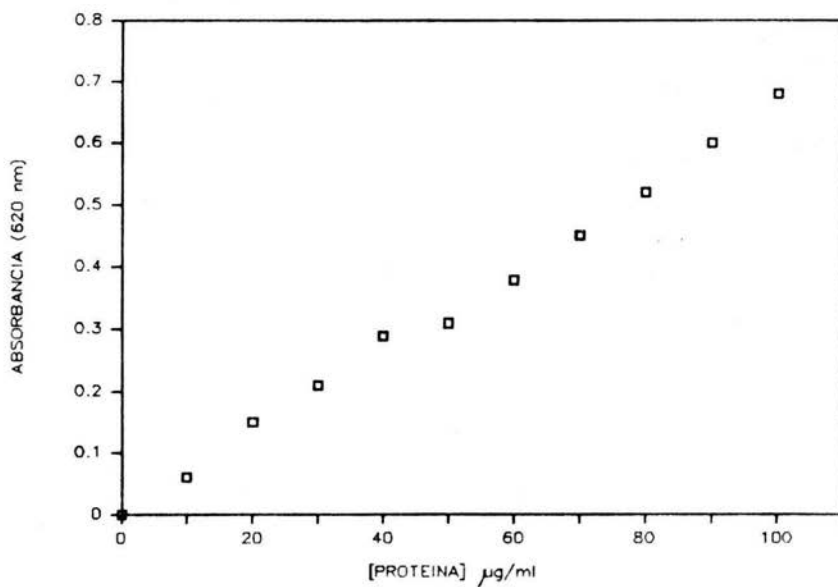
$$\frac{0.68137}{3720 \times 2} = 0.091$$

ANEXO 7.3 DATOS DE PROTEINAS. EN LOS SOPORTES.

DIA		ABSORBANCIA (x)
	PE MOLIDO	
16		0.025
21		0.045
28		0.075
71		0.175
101		0.145
	PE PLACA	
71		0.035
101		0.025

DATOS DE LA CURVA PATRON DE PROTEINAS

CURVA PATRON DE PROTEINA



$m = 0.0065$
 $b = 0.002727$
 $r = 0.99$