

164
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO DE TESIS

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA DEGRADACIÓN
ANAEROBIA EN DOS ETAPAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A :

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ROBERTO RAFAEL RÍOS VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DE 1996



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Caracterización Microbiológica de la Degradación Anaerobia
en dos Etapas".

realizado por Roberto Rafael Ríos Vázquez

con número de cuenta 8418202-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis M. en C. Oscar Armando Monroy Hermosillo
Propietario

Propietario Dra. Ma. del Carmen Durán Domínguez de Bazua

Propietario M. en C. Florina Ramírez Vives

Suplente Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Suplente M. en C. Juan

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Interfacultamental de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

A mi madre Ma. Elena Vazquez que con sus cariño y comprensión supo mostrarme el camino para ser mejor cada día, quien me hizo sentir el deseo vivo de ser feliz. Porque sin más, sus sencillos hechos no han dejado de sorprenderme, y me hacen sentir orgulloso. Gracias por todo.

A mi padre Rafael Ríos por su gran amor añadido a su ejemplo, por su apoyo incesante y sobre todo por la fe que ha depositado en mí. Gracias por todo.

A mis hermanas Martha Patricia y Rosa Elena con quien comparto los mejores momentos agradables y tristes de la vida y por la tarea no fácil de soportarme.

A mi País a quien tanto amo.

Agradezco principalmente al **M. en C. Oscar Monroy Hermosillo** por la asesoría y dirección de este trabajo, así como la facilidades otorgadas durante mi estancia en el laboratorio de Microbiología Ambiental.

Quiero expresar mi agradecimiento especialmente a la **Dra. Carmen Durán de Bazán** por sus asesorías y revisión de este trabajo. Así como por la motivación que ha despertado en mí en el campo de la investigación.

A la **M. en C. Florina Ramírez** por su amistad, enseñanzas y formación en microbiología anaerobia.

Al **Dr. Victor Manuel Luna** y al **M. en C. Juan Salnz** por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Con gratitud a la **Sra. Irene** porque en cada una de mis bromas, ella siempre tuvo una sonrisa.

A los profesores y compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAM, por su apoyo y comentarios.

A mis compañeros del PIQAYQA por los momentos agradables.

A todos mis amigos **Claudia A., Graciela W., Enrique C., Ahídee V., Hector O., Miriam A., Rosa M., Enrique H., Carmen M., Naú H., Fidel A., Elias G., Hilda S., Nancy M., Nora S., Elenita., Anabel C., Raquel G.**, y a todos aquellos que he olvidado con quien he compartido parte de mi vida, por su amistad desinteresada que siempre ha estado presente y sabemos que perdurará.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental
del Departamento de Biotecnología de la UAM-I
bajo la dirección del M. en C. Oscar Monroy Hermosillo

ÍNDICE

	Pág.
Glosario	i
Resumen	ii
Justificación	iii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 La degradación anaerobia en el tratamiento de aguas residuales	1
1.2 Microbiología y bioquímica de la degradación anaerobia	4
1.2.1 Primera etapa; hidrólisis y fermentación	4
1.2.2 Segunda etapa; acetogénesis	8
1.2.2.1 Bacterias homoacetogénicas	8
1.2.2.2 Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA)	8
1.2.3 Tercera etapa; metanogénesis	11
1.2.3.1 Bacterias hidrogenofílicas	12
1.2.3.2 Bacterias acetoclásticas	13
1.3 Factores que limitan la degradación anaerobia	14
1.4 Reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB)	17
1.5 Degradación anaerobia en dos etapas	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Reactores	25
3.1.1 Inóculo	25
3.1.2 Alimentación	25
3.2 Técnicas analíticas	26
3.2.1 Número más probable (NMP)	26
3.2.1.2 Fundamento del número más probable	26
3.2.1.3 Método para la determinación del número más probable	27
3.2.1.3.1 Medio de cultivo	27
3.2.1.3.2 Preparación de los medios de cultivo	28
3.2.1.3.3 Inoculación	28
3.2.1.3.4 Incubación	29
3.2.1.3.5 Cálculo del número más probable	29
3.2.2 Parámetros fisicoquímicos	30

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Microbiología en el reactor acidogénico	31
4.2 Microbiología en el reactor metanogénico	34
4.3 Influencia de la etapa acidogénica sobre la metanogénica	37
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42
Anexo A. Composición de las soluciones para la alimentación de los reactores	50
Anexo B. Composición de las soluciones y sustratos para el análisis del NMP	52
Anexo C. Poblaciones microbiológicas en la degradación anaerobia	56

GLOSARIO

AcAc	Ácido acético
AcBu	Ácido butírico
AcPr	Ácido propiónico
AGV	Ácidos grasos volátiles
BAp	Bacterias acetogénicas degradadoras de propionato
BAb	Bacterias acetogénicas degradadoras de butirato
BHA	Bacterias homoacetogénicas
BL	Bacterias lactotróficas
BM	Bacterias metanogénicas
BMA	Bacteria metanogénicas acetoclástica
BMH	Bacterias metanogénicas hidrogenofilicas
COm	Carga orgánica másica
COv	Carga orgánica volumétrica
DQO	Demanda química de oxígeno
DQOr	Demanda química de oxígeno removida
FA	Filtro anaerobio
LF	Reactor de lecho fluidificado
NMP	Número más probable
OHPA	Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno, por sus siglas en inglés (Obligate hydrogen producing acetogen)
RFM	Reactor de flujo mezclado
RFA	Reactor de flujo ascendente
RTPF	Reactor tubular de película fija
RTC	Reactor de tipo continuo
SSV	Sólidos suspendido volátiles
Td	Tiempo de duplicación
TRC	Tiempo de retención celular
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
UASB	Reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente, por sus siglas en inglés (Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor)
Y	Coefficiente de rendimiento másico
μ_{max}	Tasa máxima específica de reproducción o crecimiento de biomasa

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar las poblaciones microbiológicas que intervienen en las distintas etapas de la degradación anaerobia de la lactosa. Se trabajó con dos reactores anaerobios (tipo UASB, por sus siglas en inglés) conectados en serie, uno alimentado en condiciones ácida (pH 3.9) para favorecer la acidogénesis y otro en condiciones de neutralidad para favorecer la metanogénesis. El primer reactor (el acidogénico) se alimentó con lactosa (grado farmacéutico, de la fábrica Lactofrancia S. A.) como fuente de carbono; operó a un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 6 h y dos concentraciones de lactosa que resultaron en la carga orgánica volumétrica (4.71 y 7.81 gDQO/L.d). El reactor metanogénico trabajó a un TRH de 1 d y a tres cargas orgánicas volumétricas (0.80, 1.75 y 3.55 gDQO/L.d). La caracterización de las poblaciones microbianas fue realizada por el método del número más probable, para seis grupos tróficos; glucosa, propionato, butirato, lactato, acetato y H_2 - CO_2 . Los resultados demuestran que en el primer reactor se encontraron bacterias fermentativas e hidrogenofílicas como organismos dominantes. En el segundo reactor se encontraron bacterias acetogénicas, acetoclásticas e hidrogenofílicas como organismos dominantes. En la carga orgánica de 3.55 gDQO/L.d, en el reactor metanogénico se encontró un aumento de poblaciones fermentativas, propionotróficas, lactotróficas y una disminución de la actividad metanogénica. En ambos reactores se encontraron bacterias fermentativas y metanogénicas responsables de la degradación de lactosa y producción de metano. Se demostró que las poblaciones metanogénicas presentan una amplia distribución en cada uno de los sistemas, a pesar de las condiciones poco favorables en el primer reactor. La presencia de bacterias metanogénicas hidrogenofílicas está muy ligada a las fermentativas mediante H_2 que es sustrato de las primeras y producto de las segundas. Las fermentativas se encuentran siempre que hubo carbohidratos disponible. Por lo tanto, se afirma que no existe una separación completa de los grupos tróficos en los reactores, debido a que las poblaciones presentan una fuerte relación ecológica, determinada por el tipo de sustrato disponible.

JUSTIFICACIÓN

La degradación anaerobia en dos etapas, ha sido propuesta (Pohland y Ghosh, 1971 y Ghosh, 1975) para separar las reacciones metanogénicas de las acidogénicas, basados en las características fisiológicas y nutrimentales de las bacterias, cuya finalidad es obtener mejor control y eficiencias en la eliminación de materia orgánica disuelta.

Con objeto de reducir los tiempos de retención hidráulicos se propuso también un reactor de acidificación de tipo UASB (Olguín y Monroy, 1995 y Olguín, 1995) que permite largos tiempos de retención celular. En el transcurso de los experimentos se observó producción de metano en el reactor acidogénico (a pH 3.9) y acidogénesis en el reactor metanogénico (a pH 7). Con objeto de entender la dinámica poblacional y determinar las poblaciones relativas en cada una de las etapas, se inició este estudio.

En la actualidad, los estudios microbiológicos y bioquímicos en reactores de dos etapas no ha sido suficiente, pues surge la necesidad de conocer más sobre la distribución y dinámica de sus poblaciones, así como las rutas intermedias de la degradación de sustratos. No debe olvidarse que la base de la fisiología de los digestores es llevada a cabo por los grupos biológicos. Por ello es necesario identificar y estudiar las variables que gobiernan la actividad microbiana para, posteriormente, optimizar las condiciones de operación de los biorreactores. De esta manera, los microorganismos pueden desarrollar su máxima capacidad y alcanzar así las más altas eficiencias de remoción de materia orgánica.

1 INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

El principal objetivo del tratamiento de aguas residuales es producir un efluente que pueda ser descargado sin dañar el ambiente.

Un sistema de tratamiento de aguas residuales se divide en operaciones de tratamiento preliminar, primario, secundario y terciario:

El **tratamiento preliminar** tiene como objetivo principal el retiro de material sólido que es arrastrado por el caudal, y ciertas fases líquidas que pueden interferir en las operaciones subsiguientes. Tal es el caso de materiales como bolsas de hule y hojas de papel, arena, piedras y gravas. Se agrupan en operaciones de filtración, sedimentación, flotación, separación de grasas y aceites.

En el **tratamiento primario** se eliminan por sedimentación sólidos coloidales de hasta 0.1 mm, con velocidad de sedimentación de 0.1 m/h, solo o con la ayuda de agentes químicos como algunas sales de hierro, alumbre y floculantes sintéticos.

El **tratamiento secundario** tiene como objeto fundamental la remoción de material orgánico carbonoso disuelto en el agua residual y de material orgánico suspendido de tamaño coloidal que puede ser metabolizado por acción de microorganismos de tipo anaerobio o aerobio. Dentro de estos procesos se encuentran los reactores anaerobios de lecho empacado, las lagunas facultativas, las lagunas aerobias, los lodos activados, los filtros percoladores (lechos empacados de oxidación biológica) y los reactores biológicos rotatorios.

Como siguiente etapa se encuentra el **tratamiento terciario**, en el cual se busca refinar la depuración del agua residual, mediante sistemas biológicos o fisicoquímicos. En el primero el objetivo puede ser la remoción de material nitrogenado disuelto en el agua residual (nitratos, nitritos, amoníaco), fósforo o algunos metales bioacumulables a relativamente bajas concentraciones. Dentro de las operaciones o tratamientos fisicoquímicos pueden ubicarse aquellas necesarias para retirar sustancias específicas como las que dan color, metales pesados, sales minerales disueltas, sólidos suspendidos y desinfección del agua tratada. Dichos procesos son, entre otros, filtración, adsorción, cloración, carbón activado, coagulación, ósmosis inversa e intercambio iónico (Duncan, 1976; Eckenfelder y Ford, 1970; Fernández, 1986).

El tratamiento de aguas residuales, como se mencionó anteriormente, es una combinación de los procesos preliminar, primario, secundario y terciarios, los cuales pueden ser aplicados independientemente aunque siempre de manera secuencial y acorde con la calidad del agua deseada (Duncan, 1976) [Figura 1.1].

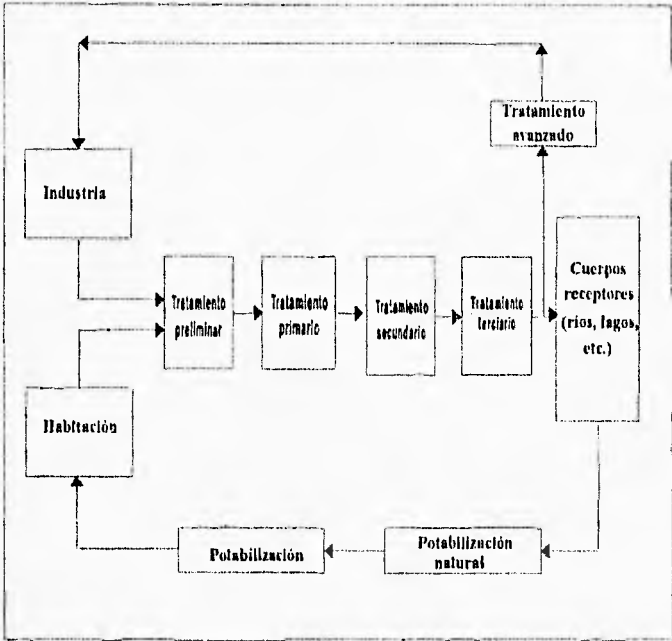


Fig. 1.1 Tren convencional del tratamiento de aguas residuales

Después del tratamiento terciario, el efluente puede ser vertido sin problemas de contaminación a los cuerpos receptores (ríos, lagos, suelo, etc.). En algunas industrias, el efluente obtenido a través del sistema de tratamiento puede ser reutilizado por la misma (Durán de Bazúa, 1987). De la misma forma también puede ser utilizado como mejorador de suelo y sus residuos sólidos como alimento para animales poligástricos (Durán de Bazúa, 1987; López, 1993).

La principal diferencia entre los procesos biológicos se basa en la forma en que los microorganismos metabolizan la materia orgánica, clasificándose en sistemas anaerobios y aerobios.

En el tratamiento de aguas residuales se han obtenido buenos resultados mediante el empleo de sistemas secuenciales; anaerobio-aerobio pues, además de resultar altamente eficiente en la remoción de contaminantes, sus costos de inversión, operación y mantenimiento son relativamente bajos (Eckenfelder et al, 1988). Este punto de vista se esquematiza en la figura 1.2.

La materia orgánica contaminante medida como DQO o DBO, es transformada en diversos productos. Las bacterias anaerobias utilizan el 20% del carbono contenido en su alimento o sustrato para funciones de reproducción, dando origen a nuevas células; el 76% es dirigida a biogás, CH_4 y CO_2 . Por su parte, los microorganismos aerobios en presencia de oxígeno, utilizan el 47.5% del carbono del sustrato en la síntesis de nuevas células, mientras la fracción restante se transforma en CO_2 .

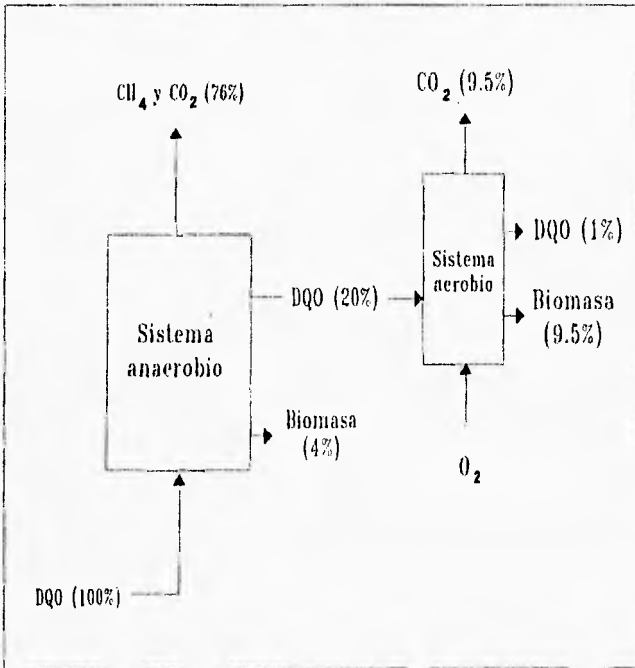


Fig. 1.2 Representación esquemática del flujo de energía en los procesos biológicos; anaerobio-aerobio

1.2 MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA ANAEROBIA

La degradación anaerobia es el proceso biológico de reacciones metabólicas en serie, mediante el cual se degrada la materia orgánica (proteínas, carbohidratos, lípidos) en ausencia de oxígeno para dar como producto biogás, principalmente metano y bióxido de carbono. Este proceso se lleva a cabo por un conjunto de especies bacterianas que se ven influidas por las condiciones del medio en que se desarrollan; sustrato, temperatura, humedad, pH, alcalinidad, presencia de compuestos nutricios ó tóxicos, etc (Calzada, 1990).

Este fenómeno se produce en diversos ambientes tales como; pantanos, suelos de arrozales, sedimentos marinos y lacustres, microambientes anóxicos del suelo, corazón de los árboles muertos, fuentes calientes sulfurosas, tracto digestivo del hombre y de los animales, particularmente de los rumiantes (Guyot, 1992). Otro grupo importante contribuyente en la producción de metano es el de las termitas que según algunas estimaciones pueden producir hasta el 15% (García, 1991).

La metanogénesis es un fenómeno que puede ocurrir a intervalos de temperatura psicrófilos (de 10 a 15°C), mesófilos (30 a 40°C) y termófilos (más de 45°C). Las bacterias metanogénicas termófilas son más activas que las mesófilas y psicrófilas.

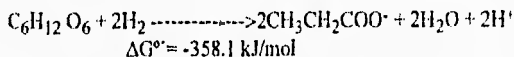
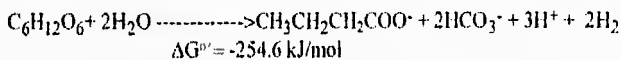
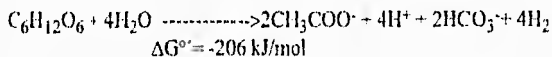
La degradación anaerobia es un fenómeno que ha utilizado el hombre para la obtención de fuentes de energía (biogás), así como para el tratamiento de desechos sólidos y líquidos (Speece, 1983).

El principio básico de la degradación anaerobia es la transformación bioquímica de la materia orgánica a través de diferentes grupos de microorganismos los cuales forman asociaciones estables y la eficiencia de cada grupo bacteriano depende directamente de los otros (Schobert, 1983).

El modelo de la degradación anaerobia más aceptado es el propuesto por Mc Inerney y Bryant (1981). Se lleva a cabo en tres etapas (figura 1.3).

1.2.1 PRIMERA ETAPA, HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN

Con esta etapa se inicia el proceso de degradación anaerobia. Consiste en la hidrólisis y acidogénesis de compuestos de alto peso molecular (proteínas, carbohidratos y lípidos) a unidades químicas más simples (azúcares, aminoácidos) y su fermentación en ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato, valerato, otros tipos de ácidos grasos de cadena larga, alcoholes, hidrógeno y bióxido de carbono), de acuerdo con las siguientes reacciones (Thauer et al, 1977; IMTA, 1993):



Esta etapa se realiza por microorganismos anaerobios facultativos, bacterias y hongos de crecimiento rápido (tiempo mínimo de duplicación de media hora a algunas horas) (García, 1989).

La composición de las poblaciones bacterianas varía mucho con el biotopo considerado o el origen del sustrato. En las tablas 1.1 y 1.2 se presentan diferentes grupos de estas bacterias así como de sus productos.

Tabla 1.1 Bacterias hidrolíticas de la degradación anaerobia
(García, 1989)

Celulosa	<i>Ruminococcus albus</i> <i>Ruminococcus flavifaciens</i> <i>Clostridium cellobioparum</i> <i>Clostridium cellulolyticum</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides succinogenes</i>
Hemicelulosa	<i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
Almidón	<i>Bacillus spp</i> <i>Bacteroides spp</i> <i>Lactobacillus spp</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>
Pectinas	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Lachnospira multiparus</i>
Lípidos	<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Syntrophomonas spp</i> <i>Bacillus spp</i>
Proteínas	<i>Peptococcus anaerobius</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Bifidobacterium spp</i>
Compuestos nitrogenados	<i>Micrococcus aerogenes</i> <i>Clostridium acidurici</i>

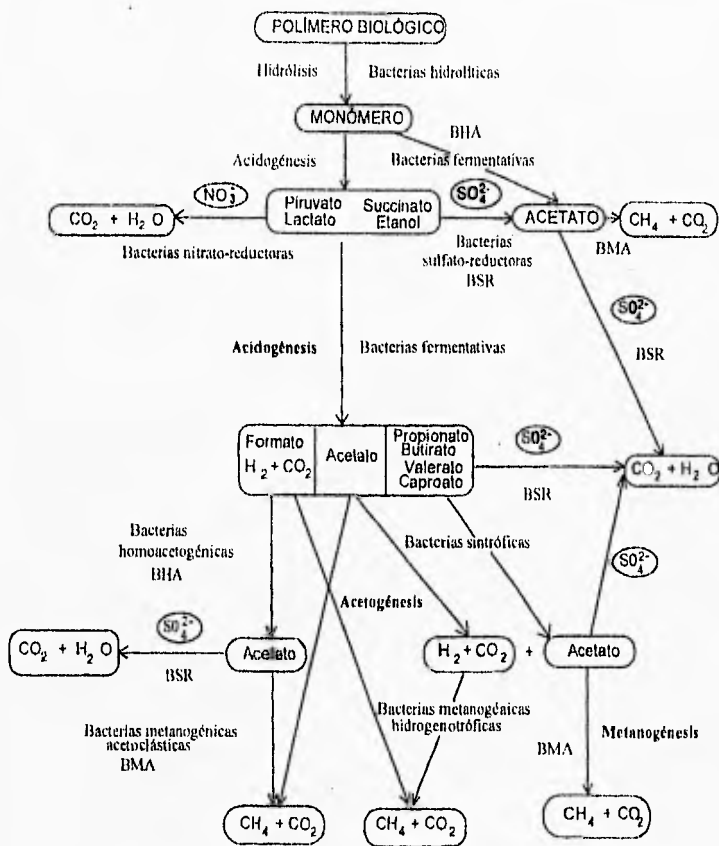


Fig. 1.3 Esquema de la degradación anaerobia (García, 1991)

Actualmente se tiene un gran interés por las bacterias capaces de fermentar los compuestos aromáticos, como los procedentes de la lignina, que se encuentran en los efluentes de la industria química (fenoles, ácido benzocarboxílico, ácido fenilacético, etc) y los derivados de ácidos aminados (Guyot, 1992).

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

Cuando la concentración del H₂ en el gas es muy baja (5 a 50 ppm), existe una preferencia para la formación de ácido acético (Mosey, 1983). En cambio, cuando aumenta la concentración de H₂, disminuye la proporción de ácido acético formado y aumentan las proporciones de ácidos de cadena mayor a dos carbonos. Además de ácidos grasos volátiles (AGV) se forman alcoholes y ácidos dicarboxílicos.

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

Si no se controla bien el reactor en esta etapa, puede ocurrir una desestabilización del proceso; en el caso de una sobrecarga, la hidrólisis de la materia orgánica provoca una sobreproducción de AGV reduciendo el pH hasta valores donde la actividad metanogénica es seriamente inhibida.

**Tabla 1.2 Bacterias fermentativas y sus metabolitos
(García, 1989)**

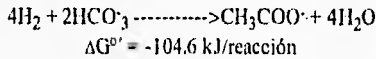
Acetato	<i>Acetofilamentum rigidum</i> <i>Acetivirio spp</i> <i>Clostridium formicoaceticum</i>
Acetato y butirato	<i>Eubacterium limosum</i> <i>Acidaminococcus fermentans</i> <i>Butyrbacterium methylopticum</i>
Lactato	<i>Lactobacillus spp</i> <i>Streptococcus spp</i>
Succinato	<i>Succinomonas amyolytica</i> <i>Succinivibrio sp</i>
Butirato	<i>Butyrvibrio sp</i> <i>Fusobacterium sp</i>
Butirato, isobutirato, valerato, isovalerato, caproato	<i>Megasphaera eldenii</i>

1.2.2 SEGUNDA ETAPA, ACETOGÉNESIS

Los productos de la primera etapa son convertidos en acetato, hidrógeno y CO₂. Los principales sustratos de esta etapa son el propionato, butirato y etanol. Esta etapa es llevada a cabo por bacterias homoacetogénicas y bacterias sintróficas que son productoras obligadas de hidrógeno (OHPA, por sus siglas en inglés) (Thiele et al, 1988; Boone y Bryant, 1980).

1.2.2.1 Bacterias homoacetogénicas

Son bacterias fermentativas que se caracterizan por la producción exclusiva de acetato a partir de compuestos gaseosos (H₂ y CO₂) a partir de un sustrato carbonoso como glucosa y fructosa: Reducen el CO₂ con los electrones provenientes de la fermentación del sustrato o el H₂ gaseoso. Generalmente son del género *Clostridium* (Andreesen et al, 1970):

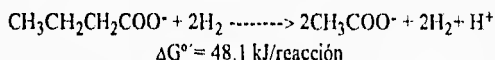
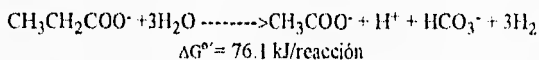


1.2.2.2 Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno

Estas bacterias son las más representativas de la segunda etapa en los digestores o reactores anaerobios que producen hidrógeno y acetato, tienen tiempos de duplicación largos de 90 a 160 horas (Boone y Bryant, 1980).

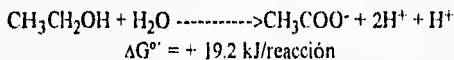
La particularidad de estas bacterias reside en que son inhibidas por el hidrógeno que producen. Por eso las OHPA tienen una estrecha relación sintrófica con las bacterias que remueven el hidrógeno (bacterias hidrogenofílicas). Esta relación de sintrofia, basada sobre el hidrógeno, se conoce como "transferencia de hidrógeno entre especies". Por lo general estas bacterias son metanogénicas, pero si el medio contiene sulfatos, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) sustituyen a las metanogénicas. Sin embargo, cabe mencionar que cuando el medio no tiene sulfatos, ciertos grupos de BSR son capaces de establecer también una relación sintrófica con las metanogénicas, de la misma manera que las bacterias OHPA, efectuando una reacción de acetogénesis a partir de los compuestos de la primera etapa, los ácidos grasos volátiles.

Entre las bacterias OHPA, algunas utilizan el butirato otras el propionato como sustrato. Así se tiene que la hidrólisis del propionato a acetato se paraliza cuando existen concentraciones de H₂ en el biogás del orden de 500 a 50,000 ppm (Boone y Bryant, 1980).

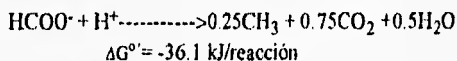


Bryant et al (1967) descubrieron el proceso de transferencia de hidrógeno interespecie, y demostraron que la bacteria *Methanobacillus omelianski* (Barker, 1941), era un bicultivo en la cual una bacteria OHPA realizaba la primera reacción y la metanogénica la segunda reacción. Es muy importante, debido a que gracias a la transferencia de electrones es posible que se lleve a cabo la reacción de acetogénesis. Esta transferencia también ocurre con algunas bacterias fermentativas que transfieren electrones vía hidrógeno a las hidrogenofílicas, lo que promueve la formación de acetato, principal precursor de metano.

Reacción efectuada por las bacterias OHPA:



Reacción realizada por las bacteria metanogénicas (BM):



Algunas bacterias implicadas en esta etapa se presentan en la tabla 1.3

Tabla 1.3 Bacterias acetogénicas (García, 1989, 1991)

BACTERIAS HOMOACETOGENICAS	
Grupo 1: H₂ + (reducción de compuestos carbonosos) + CO₂ -----> Acetato	
<i>Butyribacterium</i>	<i>retigeri</i>
<i>Clostridium</i>	<i>aciduric</i> <i>cylindrospermum</i> <i>formicoaceticum</i> <i>magnum</i> <i>thermoaceticum</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>glycinophilus</i>
Grupo 2: H₂ + CO₂ ----->Acetato	
<i>Acetoanaerobium</i>	<i>notariae</i>
<i>Acetobacterium</i>	<i>carbinolum</i> <i>malhum</i> <i>termitida</i> <i>wieringae</i> <i>woodi</i>
<i>Acetogenium</i>	<i>kivui</i>
<i>Acetofilamentum</i>	<i>rigidum</i>
<i>Acetohalobium</i>	<i>arabaticum</i>
<i>Acetomicrobium</i>	<i>flavidum</i>
<i>Acetothermus</i>	<i>paucivorans</i>
<i>Acetomaculum</i>	<i>ruminis</i>
<i>Clostridium</i>	<i>aceticum</i> <i>ijungdahlii</i> <i>mayumbii</i> <i>thermoautotrophicum</i>
<i>Acetofilamentum</i>	<i>aceticum</i> <i>ijungdahlii</i> <i>mayumbii</i> <i>thermoautotrophicum</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>
<i>Sporomusa</i>	<i>acidovorans</i> <i>malonica</i> <i>ovata</i> <i>paucivorans</i> <i>sphaeroides</i> <i>termitida</i>
BACTERIAS OHPA	
<i>Syntrophomonas</i>	<i>bryantii</i>
<i>Syntrophobacter</i>	<i>wolmi</i>
<i>Syntrophus</i>	<i>buswelhi</i>

1.2.3 TERCERA ETAPA, METANOGENESIS

Es la última etapa de la degradación anaerobia llevada a cabo por bacterias anaerobias estrictas capaces de producir metano, a partir de acetato, de H_2 y de CO_2 , y de cualquier compuesto reducido de un solo carbón como el metanol y las metilaminas y de ciertos alcoholes en presencia de CO_2 (Balch et al, 1979).

Este grupo de bacterias tiene particularidades fisiológicas y metabólicas muy especiales, tales como la composición de su pared, secuencias nucleótidas, sus coenzimas y metabolismo. Estas bacterias han sido clasificadas dentro de un subreino diferente al de las Eubacterias; el de las Arqueobacterias (Woese, 1981; Balch et al, 1979). Presentan toda una serie de características fisiológicas, bioquímicas y genéticas que las diferencian de las Eubacterias:

- Son bacterias inhibidas por pequeñas cantidades de oxígeno (cerca de 3 mg/L) y que exigen un potencial de óxido-reducción inferior a -200 mV (Mah et al, 1977).
- La mayor parte de las bacterias metanogénicas se desarrollan entre valores pH de 6 y 8, unidades, con un óptimo de 7 (Madigan, 1988).
- Su pared celular no tiene mureína o peptidoglicano; por el contrario, la pared de las bacterias metanogénicas tiene una gran variedad de estructuras, las *Methanobacteriaceae* contienen en su pared celular un polímero llamado pseudomureína y las *Methanosarcinas* tiene un polisacárido. Estas estructuras hacen a las bacterias insensibles a la acción de las lisozimas y antibióticos tales como la penicilina, cicloserina y la valeromicina.
- La composición en lípidos es diferente a la eubacterias (Woese, 1981).
- La secuencia de ARNr no está relacionada con las eubacterias y la unidad uracilo en los ARNr es transformada en pseudopurina (Woese, 1981).
- Presenta coenzimas que no se encuentran en otros microorganismos excepto el cofactor F420, tales como la coenzima M ó HS-COM, la metanopterinina ó factor F432, el metanofurano, el factor F430, el componente B ó 7-mercaptoetanolitreonina fosfato (HIS-HITP) (Balch et al, 1979).
- Las bacterias metanogénicas tienen necesidades específicas en oligoelementos ó elementos traza como el hierro, el níquel, el cobalto, el molibdeno, el tungsteno, los sulfuros y el selenio (Speece, 1983).

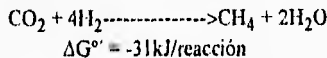
- El níquel es el átomo central de la coenzima F430, que actúa como grupo protético de la enzima metil-coM-reductasa que cataliza el paso final de la formación de metano (Schloberth, 1983).
- El Factor F420 hace que las bacterias presenten fluorescencia a 420nm y permitan su identificación por medio de microscopio de epifluorescencia y la determinación de actividades bioquímicas en los digestores o reactores anaerobios (Gorris et al, 1988).

Entre las bacterias metanogénicas conocidas, 20% son termofílicas y se desarrollan en un intervalo de temperatura entre 50 y 60°C, las otras son mesofílicas y crecen a temperaturas entre 30 y 40°C, no se han encontrado bacterias metanogénicas psicrófilicas en las muestras (Madigan, 1988).

Se han descrito 65 especies metanogénicas, de las cuales el 67% son hidrogenotrofas (utilizan el hidrógeno para reducir el CO₂), 13.5 son acetoclásticas (producen el metano a partir del acetato), 27.8% son metilótroficas y pueden utilizar compuestos metilados como el metanol, las metilaminas y el metildisulfuro y de estas últimas, el 14% son metilótroficas obligadas (García, 1990).

1.2.3.1 Bacterias metanogénicas hidrogenofílicas

La mayoría de ellas pueden utilizar el formato. Obtenen su energía de oxidación del hidrógeno en presencia de bióxido de carbono como aceptor de electrones, (Balch et al 1977), de acuerdo a la siguiente ecuación.



Estas bacterias no pueden utilizar el acetato como fuente de energía, pero algunas lo utilizan como fuente de carbono. Presentan tiempos de duplicación largos de 0.06 hr⁻¹ (IMTA, 1993).

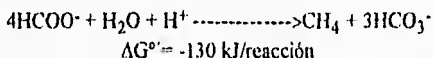
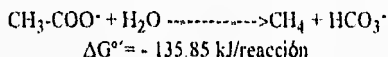
Las bacterias más utilizadas en estudios bioquímicos y fisiológicos se presentan en la tabla 1.4.

Tabla 1.4 Bacterias metanogénicas (García, 1991)

1. Hidrogenotróficas (67%)	
Usan $H_2 + CO_2$ y, según las especies, el formato	
<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanobrevibacter</i>
<i>Methanococcus</i>	<i>Methanomicribium</i>
<i>Methano thermus</i>	<i>Methanopyrus</i>
<i>Methanolacinia</i>	<i>Methanoculleus</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>Methanocorpusculum</i>
<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanoplanus</i>
<i>Methanoplasma</i>	
2. Acetoclásticas (13%)	
Usan el acetato y según las especies $H_2 + CO_2$ formato metanol y metilaminas	
<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanotherix</i>
<i>Methanosaeta</i>	
3. Metilotróficas (27%)	
Usan el metanol y las metilaminas	
<i>Methanolobus</i>	<i>Methanococcoides</i>
<i>Methanohalophilus</i>	<i>Methanohalococcus</i>
<i>Methanohalobium</i>	
4. Hidrógeno- Metilotróficas (3%)	
Usan exclusivamente $H_2 +$ metano	
<i>Methanosphaera</i>	
5. Alcoholotróficas (2%)	
Usan $CO_2 +$ alcohol (2-propanol 2-butanol)	
<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanospirillum</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>Methanocorpusculum</i>

1.2.3.2 Bacterias metanogénicas acetoclásticas

Estas bacterias producen metano a partir del grupo metil del acetato y también algunas especies utilizan el metanol, la metilamina y el hidrógeno. Su crecimiento es demasiado lento con tiempos de replicación de 2 a 3 días. Normalmente, se eleva el pH debido, por un lado, a la eliminación del acetato y, por el otro, la producción de CO_2 que forma una solución amortiguadora de bicarbonato (Fiestas, 1988), de acuerdo a:



Esta reacción es de gran importancia en la degradación anaerobia dado que el 73% del metano producido en los digestores proviene del acetato (Smith y Mah, 1966; Guyot, 1992).

1.3 FACTORES QUE LIMITAN LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA

Los principales factores que inciden en un proceso anaerobio están relacionados con aquellos parámetros que permite una mayor actividad de la biomasa, así como en altos porcentaje de remoción de materia orgánica. Entre los parámetros más importantes que inciden en las reacciones anaerobias se encuentran:

pH y alcalinidad

El valor de pH ideal para la actividad de los diferentes grupos involucrados en la degradación, depende del grupo al que pertenecen; sin embargo, el intervalo en que todas las bacterias pueden interactuar es alrededor de la neutralidad (6.8 a 7.2), con un óptimo de 7.0 a 7.2 (McCarty, 1964).

En el caso de las bacterias acidogénicas el pH óptimo es entre 5 y 6.5 y para las metanogénicas es por arriba de 6.5. Por lo tanto, el valor de pH en un reactor debe mantenerse entre 6.5 y 7.5. La influencia del pH sobre la producción de metano está relacionada principalmente con la concentración de ácidos grasos volátiles proveniente de la fase acidogénica.

La alcalinidad de bicarbonatos representa la capacidad amortiguadora de un sistema para mantener un determinado valor de pH.

Ácidos grasos volátiles

El incremento sustancial de AGV, puede llevar a una reducción del valor de pH inhibiendo donde la actividad metanógena y la producción de biogás puede cesar por completo, indicando un desequilibrio en las poblaciones microbianas.

La falta de equilibrio puede deberse al incremento súbito de carga orgánica que estimula la actividad de las bacterias acidógenas inhibiendo al mismo tiempo la actividad de las bacterias metanógenas. Otra causa puede ser la reducción de nutrientes o la adición de sustancias tóxicas en el influente.

La disminución en la tasa de remoción de AGV a valores de pH ácidos puede atribuirse a la existencia de elevadas concentraciones de AGV sin ionizar en el sistema. La naturaleza no ionizada de éstos les permite penetrar la membrana celular de manera más eficiente que los AGV ionizados y, una vez asimilados, disminuyen el pH intracelular afectando la actividad bacteriana.

Los ácidos acético, propiónico y n-butírico son estimulantes de la metanogénesis; sin embargo, a concentraciones de 10g/L de ácido n-butírico y a 3 g/L de ácido propiónico son inhibidores de la metanogénesis (Stronach et al, 1986).

El ácido acético es el menos tóxico de los AGV pero se ha observado una inhibición notable del crecimiento microbiano cuando su concentración es de 35 g/L.

El ácido propiónico es un indicador del mal funcionamiento del digestor y ejerce un efecto inhibitorio mayor incluso que el del ácido butírico en algunas bacterias metanogénicas.

El efecto inhibitorio de los ácidos propiónico, butírico y acético puede reducirse mediante la aclimatación de las bacterias a los ácidos. Se ha observado que la bacteria *Methanobacterium formicium* soporta concentraciones de ácido butírico superiores a los 10 g/L mientras que para el ácido propiónico se presentan diferentes niveles de toxicidad a concentraciones de 1 y 5 g/L (IMTA, 1993).

Nutrientos

La degradación anaerobia por ser un proceso biológico, requiere además de la fuente de carbono, de nutrientes inorgánicos esenciales para llevar a cabo sus funciones. Los macronutrientes esenciales son el nitrógeno, fósforo y azufre.

El requerimiento de nitrógeno para el proceso anaerobio es sólo una pequeña fracción (0.2 a 0.5) de lo que requieren los procesos aerobios. Esto se debe a la baja tasa de crecimiento de las bacterias anaerobias. Asimismo, el requerimiento de fósforo es aproximadamente del 15% del requerimiento del nitrógeno (Speece y McCarty, 1964; Speece, 1983).

Elementos traza o vestigiales

La composición elemental inorgánica de las bacterias metanogénicas se presentan en la tabla 1.5.

Éstas contienen los nutrimentos esenciales normales como N, P, S, pero algunos micronutrimentos como Ni, Fe, Co, están presentes en concentraciones más altas que en otros microorganismos. Esto indica un requerimiento particular de estos micronutrimentos por las bacterias metanogénicas (IMTA, 1993).

Tabla 1.5 Composición elemental de las bacterias metanogénicas (IMTA, 1993)

Nutrimentos	mg/kg células secas
N	65000
P	15000
K	10000
S	10000
Ca	4000
Mg	3000
Fe	1800
Ni	100
Co	75
Mo	60
Zn	60
Mn	20
Cu	10

Los elementos traza requeridos por las bacterias acidogénicas y metanogénicas son los siguientes: Co, Mo, Na, Ni, Fe, Mg, los cuales bajo algunas condiciones estimulan el proceso metanogénico (Speece, 1983; Perski y Thauer, 1981; Hoban y Van der Berg, 1979; Switzenbaum, 1983).

Se ha reportado que la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Ba^{2+} , favorece la granulación al crear en la superficie celular puentes entre los grupos de carga negativa (Moreno, 1994).

El suplemento riboflavina y vitamina B12, activan en alto grado la producción de metano. El extracto de levadura es frecuentemente usado como proveedor de nutrimentos (Speece, 1983).

1.4 REACTOR ANAEROBIO DE LECHO DE LODOS CON FLUJO ASCENDENTE (UASB)

La evolución de la tecnología anaerobia ha dado lugar a tres generaciones de reactores:

Los de **primera generación** comprenden aquellos procesos en donde la biomasa se encuentra en suspensión, con tiempos de residencia hidráulica de 4 días, lo que hace que los reactores sean de tamaño muy grande. Entre ellos se encuentra los digestores completamente mezclados y el de contacto anaerobio.

En los de la **segunda generación**, los microorganismos son retenidos en el reactor, ya sea al suministrarles un soporte para que se adhieran en forma de biopelícula o bien porque se logre que sedimenten en el fondo del reactor. Esto permite mantener altos tiempos de retención celular (TRC) independiente del tiempo de residencia hidráulica (TRH), los cuales disminuyen a intervalos de 0.5 a 3 días. Los reactores pertenecientes a esta generación son los reactores empacados, como el llamado filtro anaerobio (FA), reactor tubular de película fija (RTPF) y el reactor de lecho de lodos anaerobio, muy conocido por sus siglas en inglés (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor).

Los reactores de **tercera generación** tienen también los microorganismos en forma de biopelícula pero el soporte se expande o fluidifica con altas velocidades de flujo y tiempos de residencia hidráulica menores a 12 horas. La desventaja que presentan es la energía requerida para fluidificar el medio y su operación delicada. Los reactores de este tipo son los de lechos fluidificado y expandido.

Dentro de los reactores anaerobios de segunda generación más utilizados se encuentran el **reactor anaerobio de lecho lodos con flujo ascendente (UASB)** por sus siglas en inglés, desarrollado por Lettinga et al, (1980).

Su ventaja consiste en que no requiere ningún tipo de soporte para retener la biomasa, lo que implica un ahorro importante. Su principio de funcionamiento se basa en la buena sedimentabilidad de la biomasa producida dentro del reactor, la cual se aglomera en forma de granos o "pellets" hasta de 5 mm de diámetro. Estos granos cuentan además con una actividad metanogénica muy elevada lo que explica los buenos resultados del proceso. El reactor es de flujo ascendente y en la parte superior cuenta con un sistema de separación gas-sólido-líquido, el cual evita la salida de sólidos suspendidos en el efluente y favorece la evacuación del gas y la decantación de los flocúlos que eventualmente llegan a la parte superior del reactor (Noyola y Briones, 1988).

Un punto importante en su diseño es la distribución del agua residual, ya que una mala repartición puede provocar que ciertas zonas de la cama de lodos no sea alimentada, desperdiciando así su actividad. Esto es particularmente cierto en el tratamiento de aguas residuales municipales, pues la limitada materia orgánica presente forma solo pequeñas cantidades de biogás y por lo tanto la agitación del lecho, provocado por las burbujas se ve reducida. El punto débil del proceso consiste en la lentitud a la que se forman los granos, elemento indispensable del sistema. Esto puede ser solucionado mediante una inoculación importante con lodos preexistentes (Noyola, 1992).

Las características importantes de estos gránulos son contar con una actividad metanogénica elevada, forma esférica y tener alta capacidad de sedimentación, lo que favorece un alto grado de retención dentro del reactor, con lo que se logran bajos tiempos de residencia hidráulica con altos tiempos de retención celular (Lettinga et al, 1982). Lo anterior permite el tratamiento de aguas residuales con altas cargas orgánicas (hasta de 40 kgDQO/m³ d), en reactores de tamaños más pequeños.

La figura 1.4 muestra las características del reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente.

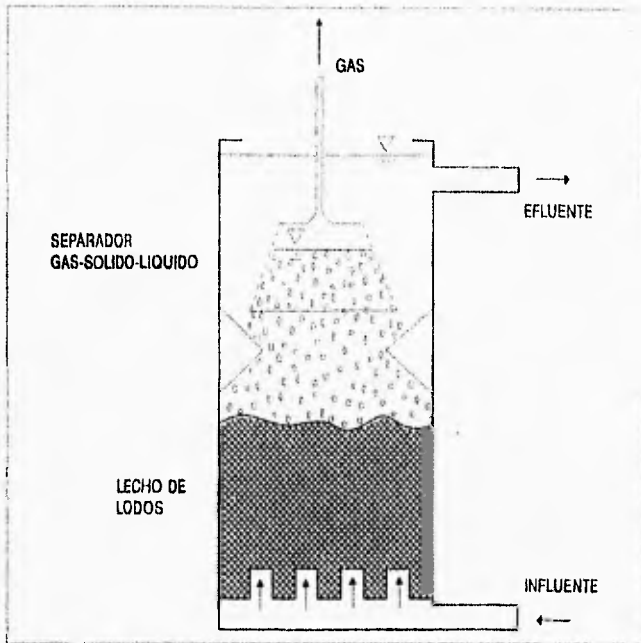


Fig. 1.4 Esquema de un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB)

1.5 DEGRADACIÓN ANAEROBIA EN DOS ETAPAS

El procesos de digestión o degradación anaerobia se lleva a cabo en su mayoría por microorganismos fermentativos y metanogénicos, los cuales presentan requerimientos nutrimentales y fisiológicos muy diferentes, razón por lo cual se ha propuesto que el proceso de la degradación anaerobia se pueda llevar a cabo usando dos reactores en serie, separados físicamente. En el primer reactor los procesos bioquímicos se llevan a cabo a pH bajos y tiempos de residencia hidráulica cortos (6-24 h) (Ghosh, 1984; Van den Berg, 1984). En el segundo reactor, las reacciones de acidogénesis y metanogénesis ocurren a valores de pH de 7, con tiempos de residencia hidráulica largos (tablas 1.6 y 1.7).

La idea del proceso de la degradación en dos fases, se originó desde Pohland y Ghosh (1971) y sus avances en la degradación fue demostrada experimentalmente por Ghosh et al (1975). Más adelante Bull et al (1984) demuestran que un sistema de dos fases resulta ser más estable y de más fácil recuperación, con una calidad del efluente mejor que el de una sola etapa.

Tabla 1.6 Características cinéticas de las poblaciones en la degradación anaerobia a 35°C

Fermentativas	Glucosa	7.2	0.093	0.15	5.14	1
Acetogénicas	Acetato	0.414	1.67	0.03	7.0	2
	Propionato					
	Butirato 2:1:1					
Acetoclásticas	Acetato	0.357	1.94	0.041	7.0	3
Hidrogenofílicas*	H ₂ -CO ₂	4.02	0.17	0.045	6.9	4

(*) 37 °C; μ_{max} , tasa máxima de crecimiento de biomasa; Y o productividad, mgSSV/mgDQOr; Td, tiempo de duplicación. Ref (1), Ghosh y Klass (1978); (2), Lin et al (1986); (3), Lawrence y McCarty (1969); (4), Pavlostathis y Giraldo (1990)

Tabla 1.7 Características cinéticas en un reactor anaerobio de flujo mezclado, en dos etapas (Ghosh et al, 1975; Ghosh y Klass, 1978)

Temperatura (°C)	37	37
pH	5.7-5.9	7.0-7.4
TRH (d)	0.5-1	6.5
Producción de metano (m ³ /m ³ liq/d)	0.006-0.6	4.4-8.4
Concentración de metano %	19-44	61-78

La tabla 1.8 muestra los trabajos publicados sobre del estudio del proceso de dos etapas, mostrando los tipos de reactores y las condiciones de operación que se han usado en cada etapa. Se observa que en la fase acidogénica predominan los reactores de flujo mezclado aunque se usan UASB y FA. En la fase metanogénica predominan los UASB y FA. El RTH en la fase acidogénica es de 1 - 30 h, en la fase metanogénica es de algunas horas a 6.5. El pH en la fase acidogénica está por debajo de 6.9 mientras en el reactor metanogénico es alrededor de 7.

Tabla 1.8 Trabajos publicados sobre la degradación anaerobia en dos etapas

Ghosh et al, 1975; Ghosh y Klass, 1978	RFM	RFM	a)37 °C pH 5.8 TRH 0.5-1d b)37 °C pH 7.2 TRH 6.5 d
Cohen et al, 1979	RFM	UASB	a)30 °C pH 6 TRH 10h b)30 °C pH 7.8 TRH 100h
Cohen et al, 1980	RFM	UASB	a)30 °C pH 6.2 TRH 10 h b)30 °C pH 7.2 TRH 100h
Bull et al, 1984	LF	LF	a)35 °C pH 3.5 TRH 1.6-10h b)35 °C pH 7 TRH 48h
Ghosh, 1984	RFA	RFA	a)35 °C pH 6.1 TRH 1.1d b)35 °C pH 7.2 TRH 4.4d
Ghosh et al, 1985	RFM	FA	a)35 °C pH 4.7 TRH 2.2d b)35 °C pH 7.5 TRH 5.2d
Schwitzgüchel y Peringer, 1986	RFM	RFM	a)35 °C pH 5.0 TRH 6-24h b)35 °C pH 7.0 TRH 1-4d
Hanaki et al 1987	RFM	RFM	a)37 °C pH 6.0 TRH 30-6 h b)35 °C pH 7.0 TRH 30-6 h
Kissalita et al, 1989	RFM	RFM	a)35 °C pH 4.5-6 TRH 2.6- 6.7h b)35 °C pH 7.0
Hanaki et al, 1990	FA	FA	a)20 °C pH 4.5 TRH 1.3d b)20 °C pH 7.0 TRH 3.3d
Viñas, 1990	FA	UASB	a)30 °C pH 5.0 TRH 5h b)30 °C pH 6.5 TRH 15h
Noike y Cheng, 1990	RFM	RFM	a)35 °C pH 5-6 TRC 0.09-3d b)35 °C pH 7.0 TRC 5-14d
Zhang y Noike, 1991	RFM	RFM	a)35 °C pH 5.7 TRC 10, 5, 2.5, 1.75 b)35 °C pH 7.1 TRC 10, 5, 2.5, 1.75
Komatsu et al, 1991	FA	FA	a)37 °C pH 6.0 TRH 18-4 h b)37 °C pH 7.0 TRH 18-4 h
Olgüin y Monroy, 1995	UASB	UASB	a)35 °C pH 6.5-6.9 TRH 1 y 2 d b)35 °C pH 7.0 TRH 1 y 2 d
Ince et al, 1995	RFM	FA	a) 33-36 °C pH 5-6 TRH 0.5 d b) 33-36 °C pH 7-7.5 TRH 1.5 d
Olgüin, 1995	UASB	UASB	a) 35 °C pH 3.9 TRH 6 h b) 35 °C pH 7.0 TRH 1 d

RFM, Reactor de flujo mezclado; RFA, Reactor de flujo ascendente; LF, Reactor de lecho fluidificado; FA, Filtro anaerobio; UASB, Reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente; RFM, Reactor de flujo mezclado; TRH, Tiempo de residencia hidráulica; TRC, Tiempo de retención celular.

La etapa de acidogénesis se ha estudiado en reactores de flujo mezclado y se ha demostrado que dan un tratamiento eficiente, incrementan la carga máxima alimentada y mejoran la estabilidad del reactor (Schwizguebel y Peringer, 1986). Sin embargo, este tipo de reactores tiene problemas de lavado o elutriación a TRH de 2.4 h (Kissalita et al, 1989). Estos problemas se resuelven cuando el RFM es reemplazado por un reactor de lecho de lodos con flujo ascendente UASB.

Se ha demostrado que en el reactor acidogénico la distribución de ácidos grasos volátiles producidos depende del TRH aplicado. Kissalita et al (1989), demostró que para un reactor agitado continuo, para un TRH de 6.7 h, la concentración de acetato domina y no hay producción de lactato, para TRH de 6.7 y 2.4 h, bajan las concentraciones de acetato y suben las de lactato, para TRH menores de 2.4 h, hay un lavado de células y baja la acidogénesis de la lactosa.

Hanaki et al (1987, 1990) utilizaron varios tipos de sustratos, demostrando que el sistema de dos etapas es recomendable para la degradación de lípidos.

El reactor metanogénico también influye sobre el tipo de bacterias metanogénicas presentes. Se ha observado que a TRH mayores de 9.6 d, predominan las bacterias del género *Methanotrix* y a TRH menores de 6.5 d son las *Methanosarcinas* las que predominan (Noike y Cheng, 1990).

Cohen et al (1979, 1980) mencionan que las poblaciones acetogénicas juegan un papel importante en la fase metanogénica Zhang y Noike (1991) explican que el proceso de digestión no solo puede observarse como una suma de dos etapas, pues las poblaciones de bacterias y sus productos de fermentación en un sistema de dos etapas es diferente al de una etapa.

Las principales ventajas de la separación de etapas son las de tener una mejor estabilidad y un control más eficaz de la degradación anaerobia (Van den Berg, 1984), por lo que la etapa de metanización se puede operar con cargas superiores a la aplicada en un sistema monofásico, es decir, trabajar en los límites de carga máxima aceptada (Ghosh, 1991), además de que la remoción de DQO es 20% más alta que en los sistemas de una etapa (Schwizguebel y Peringer, 1986).

2 OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar microbiológicamente el proceso de la degradación anaerobia en dos etapas; acidificación y metanogénesis

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar los diferentes grupos microbiológicos (fermentativas, propionotróficas, butirotróficas, lactotróficas, acetoclásticas e hidrogenolíticas) en un reactor acidogénico y en uno metanogénico.
- Estudiar el proceso de degradación de materia orgánica mediante la dinámica poblacional de las bacterias, en los reactores.
- Estudiar hasta qué grado es factible la separación microbiológica de una fase acidógena y una metanógena.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTORES

El estudio se realizó en dos reactores anaerobios de flujo ascendente (UASB), alimentados en serie, con un volumen para el reactor acidogénico de 340 mL y para el reactor metanogénico de 1.4 L. En la parte superior de los reactores se colocó una campana de vidrio como separador gas-sólido-liquido. El biogás producido (CO_2 y CH_4) se recolectó en una columna para medir su volumen por desplazamiento de una solución salina saturada con pH menor de 5 (preparada con 300 gNaCl/L en agua destilada), para evitar la disolución de los gases y rojo de metilo como indicador.

La figura 3.1 muestra el sistema de reactores conectados en serie para la separación de la degradación anaerobia en etapas; acidogénica y acetogénica-metanogénica.

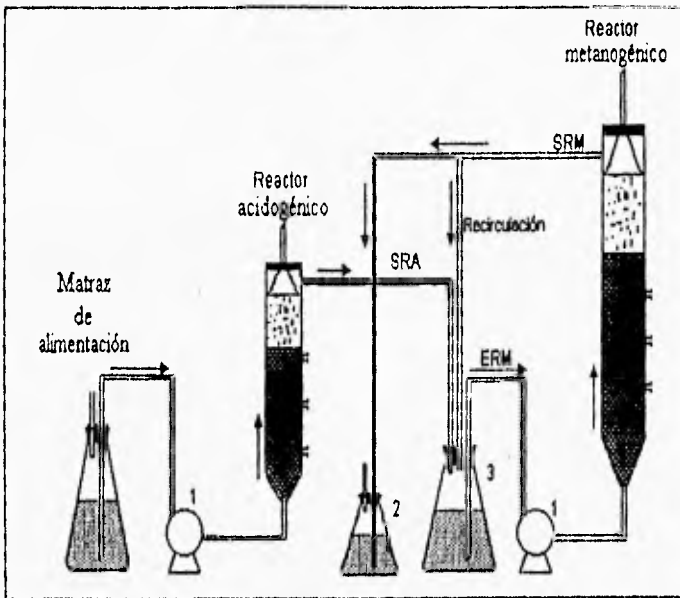


Figura 3.1 Sistema de reactores en serie; 1, Bomba peristáltica; 2, Recipiente para la salida del reactor metanogénico; 3, Matraz de recirculación; SRA, Salida del reactor acidogénico; ERM, Entrada al reactor metanogénico, SRM, Salida del reactor metanogénico.

3.1.1 Inóculo

Los reactores se inocularon con lodos anaerobios provenientes del reactor UASB de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de la UAM-I de 50 m³, con una actividad metanogénica de 0.011 moles CH₄/gSSV. El volumen de inóculo para el reactor acidogénico fue de 150 mL (22.5 gSSV/L). Para el reactor metanogénico el volumen fue de 500 mL, (22,42 gSSV/L).

3.1.2 Alimentación

Como influente se utilizó el medio mineral RAMM (Shelton y Tiedje, 1984), cuya composición se menciona en la tabla 3.2; más lactosa como fuente de carbono y energía (grado farmacéutico de la fábrica Lactofrancesa, S.A.) de acuerdo a la tabla 3.3.

Tabla 3.2 Composición: del medio mineral RAMM (Shelton y Tiedje, 1984)

Reactivos	Por litro de solución
"Buffer" amortiguador de fosfatos a pH = 7	
KH ₂ PO ₄	0.27 g
K ₂ HPO ₄	0.35 g
Sales minerales	
NH ₄ Cl	0.53 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100 mg
FeCl ₂ ·4H ₂ O	20 mg
Elementos trazas	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5 mg
H ₃ BO ₃	0.05 mg
ZnCl ₂	0.05 mg
CuCl ₂	0.05 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.5 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 mg
Na ₂ SeO ₃	0.01 mg

El medio de cultivo se preparó en botellas de 1 L, se ajustó el valor de pH a 7 con NaOH 2N y se esterilizó en autoclave a 1.1 lb/pulg² durante 20 minutos.

3.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.2.1 Número más probable (NMP)

-El análisis microbiológico de ambos reactores se estudió para seis grupos de bacterias de acuerdo a su sustrato; glucosa, propionato, lactato, butirato, acetato y H_2 - CO_2 . Las muestras de lodo se tomaron en dos distintos estados estacionarios para el reactor acidogénico y tres para el reactor metanogénico según se muestra en la tabla 3.3.

3.3 Condiciones de alimentación de los reactores conectados en serie, (reactor acidogénico TRH 6 h; reactor metanogénico TRH 1 d)

Lactosa (g/L)	R. acidogénico COV(gDQO/L.d)	R. metanogénico COV(gDQO/L.d)
1	4.75	0.80
2	7.81	1.75
4	15.26	3.55

COV; Carga orgánica volumétrica

3.2.1.2 Fundamento del NMP

El NMP es un método estadístico basado en la probabilidad teórica. Su estimación se basa en la presunción de que las bacterias se encuentran homogéneamente distribuidas en un medio líquido. Ésto es, en muestras repetidas del mismo tamaño de un mismo producto, debe esperarse que contengan, en promedio, el mismo número de microorganismos. Naturalmente, algunas de las muestras pueden contener algunos microorganismos de más o de menos. La cifra media es el número más probable (NMP). Si el número de microorganismos es grande, la diferencia entre las muestras serán pequeñas; todos los resultados individuales estarán próximos a la media. Si el número de microorganismos es pequeño, las diferencias, relativas, serán mayores.

La prueba de laboratorio del NMP permite estimar, cuantitativamente, las concentraciones de estas bacterias en el lodo por grupos tróficos como son; acetoclásticas, hidrogenoflicas, fermentativas, sulfato-reductoras y las consumidoras de propionato y butirato. Actualmente, no existen límites estrictos en cuanto al NMP de cada uno de estos grupos que debe contener el inóculo, pero se debe preferir aquel que los contenga en mayor cantidad, principalmente las del tipo metanógeno, acetoclástico e hidrogenofílico.

La determinación periódica del NMP aporta información de la adaptación y aclimatación al desecho lo que producirá un incremento de éstas. Una de las restricciones para determinación de NMP es el costo elevado de equipo para su determinación, así como de personas calificadas para su ejecución (IMTA, 1993).

Los medios empleados, así como las técnicas de inoculación y transferencia de sustrato se realizan en condiciones rigurosas de anaerobiosis. La inoculación del lodo se hace en diferentes sustratos en tubos múltiples de 5, de acuerdo al grupo trófico que se quiere cuantificar. El tiempo de incubación es de un mes a 37°C, después del cual se toma una muestra de gas de los tubos y el carácter positivo de crecimiento será la presencia de metano, medido a través de cromatografía de gases. En el caso de las bacterias fermentativas el carácter de crecimiento es la turbidez del medio (cambio de pH) y, para la sulfato-reductoras, la coloración del medio. La incubación de ambos grupos es de una semana bajo las mismas condiciones de temperatura. Posteriormente, se calcula su número mediante el empleo de la tabla de Mc Grady (NMP) (García et al, 1982), para bacterias anaerobias y el resultado se expresa como número de bacterias/gSSV.

3.2.1.3 Método para la determinación del NMP

La numeración de bacterias anaerobias se llevó a cabo por la técnica del número más probable, con 5 tubos por dilución (García et al, 1982). La transferencia de sustratos, preparación de medios de cultivo e inoculación se realizó por la técnica de Hungate (1969) y Balch et al (1979), con la utilización de una cámara anaerobia y un distribuidor de gases (bioazteca).

3.2.1.3.1 Medio de cultivo (Balch et al, 1979)

Medio	(1 Litro)
Solución mineral 1	50.0 mL
Solución mineral 2	50.0 mL
Solución de oligoelementos	10.0 mL
Solución de vitaminas	1.0 mL
Solución de cloruro de níquel	1.0 mL
Solución de sulfuro ferroso	1.0 mL
Solución de resursurina	1.0 mL
Extracto de levadura	0.1 g
Peptona de caseína	0.1 g
Bicarbonato de sodio	2.0 g
Cisteína	0.5 g

3.2.1.3.2 Preparación de los medios de cultivo

-Colocar los reactivos del medio de cultivo, excepto la cisteína en un matraz de 2000 mL. Ajustar a pH 7. Adicionar un excedente de agua destilada de 150 a 250 mL. Tapar con papel de aluminio (para las bacterias fermentativas es necesario adicionar 9.4 mL de solución de azul de bromotimol, como indicador de pH).

-El medio se pone a calentar en un parrilla eléctrica. Una vez que comienza a ebullición, se introduce una manguera, para adicionar una corriente de nitrógeno, hasta que el medio vire de azul a rosa y llegue al volumen de aforo.

-Una vez reducido se enfría en un recipiente con agua, manteniendo la corriente de nitrógeno.

-Se adiciona la cisteína, evitando la entrada de aire y manteniéndola bajo corriente de nitrógeno.

-Preparar para cada sustrato 60 tubos; ordenados en 5 series de 12 cada uno.

-Agregar a cada tubo 5 mL del medio, los cuales previamente deben tener una manguera con corriente de nitrógeno, sacar la manguera, colocar el septo y la tapa de rosca.

-Realizar cambio de atmósfera (en el bioazteca o distribuidor de gases) con una mezcla de N_2 - CO_2 (80-20%) durante dos minutos, para poder obtener un pH de 7; esto se realiza mediante la inyección con una aguja previamente conectada a la fuente de dicho gas, y colocando una segunda aguja para la evacuación de la atmósfera interna.

-Esterilizar 15 minutos en autoclave (a una presión de 15 lb_f/plg^2).

3.2.1.3.3 Inoculación

-Antes de inocular; se procede a desinfectar el distribuidor de gas y la mesa con alcohol.

-Se adicionan 0.025 mL de sulfuro de sodio a cada tubo (con el objeto de reducir el medio al momento de la inoculación). Es necesario utilizar una jeringa hipodérmica estéril, previamente purgada bajo corriente de nitrógeno y flamear las tapas de los tubos con alcohol cuando el volumen de la jeringa se termine, tomar otra, realizando el mismo procedimiento.

-Agregar 0.05 mL de sustrato (glucosa 1.38 M, lactato 0.5 M, propionato 0.5 M, butirato 0.5 M, acetato 0.5 M). Para la adición de H_2 - CO_2 , se inyecta una corriente de esta mezcla de gases (80-20%), con una jeringa de vidrio estéril por un tiempo de 30 segundos, a partir de la dilución más alta a la más baja.

-Introducir las muestras de lodo del reactor, con los tubos del medio en la cámara anaerobia, haciendo tres cambios de vacío con cambios de gases nitrógeno e hidrógeno desinfectando con alcohol.

-La dilución de los medios se realiza de la siguiente manera; tomar 0.5 mL de lodo con jeringa estéril e inyectarlo en el tubo marcado con 10^{-1} y agitar y sacar de la cámara.

-Realizar las siguientes diluciones en el distribuidor de gas, previamente esterilizado con alcohol y enfrente de la flama; con una jeringa estéril y purgada bajo corriente de nitrógeno, tomar 0.5 mL de primera dilución e inyectarlo en el tubo marcado como 10^{-2} , con otra jeringa, realizar para el tubo 10^{-3} y del mismo modo para el tubo 10^{-4} y, a partir de este realizarlo con la misma jeringa hasta dilución 10^{-12} .

3.2.1.3.4 Incubación

-Agitar los tubos e incubarlos a 35°C durante 30 días para las bacterias consumidoras de propionato, butirato, lactato, acetato y $\text{H}_2\text{-CO}_2$ y 15 días para las bacterias fermentativas.

3.2.1.3.5 Cálculos del NMP

-Al finalizar el período de incubación, para cada grupo bacteriano (indicado en el punto anterior), se pasa una muestra de 0.1 mL al cromatógrafo de gases, SRI mod. 8610, con detector de ionización de flama con una columna AT 1000, a una temperatura 83°C , nitrógeno como gas acarreador (como control se realiza lo mismo en un tubo de medio con material reducido y se le resta a los demás tubos). La presencia de metano en el medio se considera como un carácter positivo (el cual se utilizará en la tablas de McGrady para calcular en NMP) (anexo B, tabla B.1). Para el caso de las bacterias fermentativas, el indicador positivo es la turbidez del medio, el cual se indica cambio de pH.

-El metano se determina de la dilución más alta a la más baja. El resultado que se toma en cuenta es la dilución más alta que presente tubos positivos y las dos siguientes diluciones. Con estos tres dígitos se busca en la tabla de McGrady (NMP) (García et al, 1982), sustituyendo en la fórmula:

$$\text{NMP} = \frac{\text{Núm. en tabla (máx dilución de positivo)}}{\text{vol. de inóculo}} \times \frac{1}{\text{gSSV}}$$

$$\text{NMP} = \text{Núm. de bacterias/gSSV}$$

La figura 3.2 muestra el diagrama de flujo en la determinación del NMP.

3.2.2 Parámetros fisicoquímicos

-Las poblaciones encontradas se correlacionaron con las condiciones de operación y las técnicas analíticas, obtenidas por Olguín (1995).

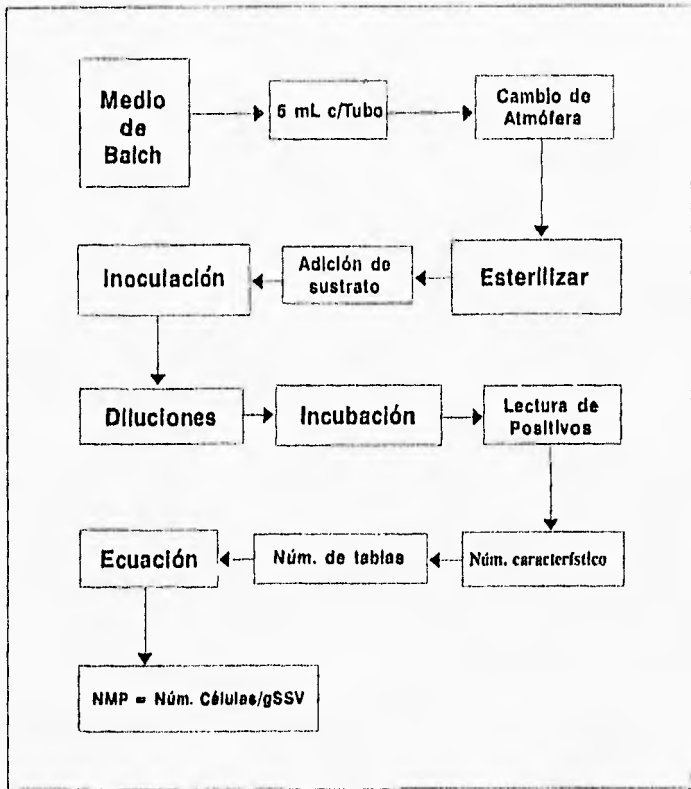


Fig. 3.2 Diagrama de flujo para la determinación del método de número más probable

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MICROBIOLOGÍA DEL REACTOR ACIDOGÉNICO

Las principales características promedio presentes en el reactor acidogénico, durante la degradación de materia orgánica y los niveles de poblaciones de bacterias encontradas, se presentan en la tabla 4.1 y su representación gráfica en la figura 4.1.

Bacterias fermentativas

Las bacterias fermentativas en la carga orgánica de 4.75 y 7.81 gDQO/L.d, se presentaron en el intervalo de 1.34×10^{11} - 9.44×10^9 cels/gSSV, fueron abundantes en relación con los otros grupos. Su crecimiento poblacional fue favorecido por las condiciones fisicoquímicas en el reactor así como por la disponibilidad del sustrato.

Se observó una disminución de células de 1.34×10^{11} a 9.44×10^9 en la carga orgánica 7.81 gDQO/L.d; las bacterias acidogénicas tienen la propiedad de fijarse alrededor del grano y un cambio de carga orgánica o flujo hidráulico, puede provocar desprendimiento celular. Lo anterior no ocurre, con las bacterias acetogénicas y metanogénicas, que se encuentran agregadas en el interior del grano (Guiot et al, 1992).

Tabla 4.1 Poblaciones microbiológicas y parámetros fisicoquímicos en el reactor acidogénico, operado a dos cargas orgánicas

Fermentativas (Núm. cels/gSSV)	1.34×10^{11}	9.44×10^9
Propionotróficas (Núm. cels/gSSV)	*	1.68×10^2
Butirotróficas (Núm. cels/gSSV)	*	1.07×10^9
Lactotróficas (Núm. cels/gSSV)	*	2.36×10^2
Acetoclásticas (Núm. cels/gSSV)	1.07×10^4	1.34×10^7
Hidrogenofílicas (Núm. cels/gSSV)	*	1.07×10^{10}
COM (gDQO/gSSV.d)	0.3371	2.25
SSV (g/L)	29.644	29.644
TRH (h)	6	6
DQO (mg/L)	902.12	1698.2
Remoción (%)	24.3	12.96
Producción de LCH ₄ /L.d	0.25	0.25
LCH ₄ /gDQOr	0.107	0.07
Concentración de CH ₄ (%)	72.75	71.80
Conversión de acidogénesis (%)	52.48	43.70
Conversión de acetogénesis (%)	40	26
pH	3.80	3.99

COv, Carga orgánica volumétrica; COM, Carga orgánica másica; (*), No cuantificado; DQOr, DQOremovido

Bacterias acetoclásticas

La concentración de bacterias metanogénicas acetoclásticas estuvieron en el intervalo de 1.07×10^4 - 1.34×10^7 cels/gSSV. Se observó un constante aumento de la población en la carga 7.81 gDQO/L.d, como consecuencia del incremento en la producción de ácido acético (tabla 4.2). Chartrain y Zeikus (1986a,b) reportaron que en la degradación de lactosa, uno de los principales productos formados después de la degradación de lactato es el ácido acético.

Tabla 4.2 Productos de la fermentación de la lactosa a la salida del reactor acidogénico

4.75	7.76	0.0	2.10
4.75	7.82	0.2756	1.65
7.81	9.92	0.3057	1.96
7.81	8.06	0.3122	2.23

En el reactor acidogénico la lactosa fue uno de los principales productos de oxidación, con la sucesiva producción de AGV, el ácido acético fue el principal AGV formado, no siendo aquí fácilmente consumido por la microflora metanogénica, puesto que las bacterias necesitan de un pH alrededor del neutro para realizar su actividad y a pH por debajo 6.5 su actividad se ve disminuida.

Bacterias acetogénicas

Las bacterias butiróticas fueron más abundantes (1.07×10^9 cels/gSSV) que las bacterias propionóticas (1.68×10^2 cels/gSSV); asimismo la concentración de producción de ácidos presenta el mismo comportamiento (tabla 4.2). De acuerdo con la información bibliográfica, esto ocurre cuando un reactor opera bajo condiciones estables, debido a que durante la degradación anaerobia el ácido propiónico es degradado a una molécula de ácido acético, más CO_2 e H_2 , mientras que el ácido butírico es oxidado a dos moléculas de ácido acético; es por esto que el ácido propiónico necesita mayor energía para ser oxidado en relación con el ácido butírico.

La presencia de elevadas cantidades de bacterias butiróticas, posiblemente se explique en función de que estas bacterias se comportan como grupo multisustrato, pues pueden tomar como sustrato a algún otro AGV (acetato, propionato, butirato, lactato, etc.).

Bacterias lactotróficas

La concentración de bacterias consumidoras de lactato fue baja, de 2.36×10^2 cels/gSSV, muestra indirectamente la formación mayor de ácido acético (tabla 4.2 y figura 4.1); del mismo modo, aumentó la concentración de las bacterias acetoclásticas. La fermentación de la lactosa origina compuestos más estables como el etanol y el acético (García, 1991; Chartrain y Zeikus, 1986a,b). Olguín y Monroy (1995) explican que la formación de acetato está íntimamente ligada a la disminución de lactato. Sin embargo, el ácido acético se puede originar en la digestión a partir de diferentes rutas, como son los grupos de bacterias que lo originan como compuesto secundario (Gómez, 1981) y, como lo explican Kissalita et al (1989), teniendo como principales precursores los ácidos butírico y láctico.

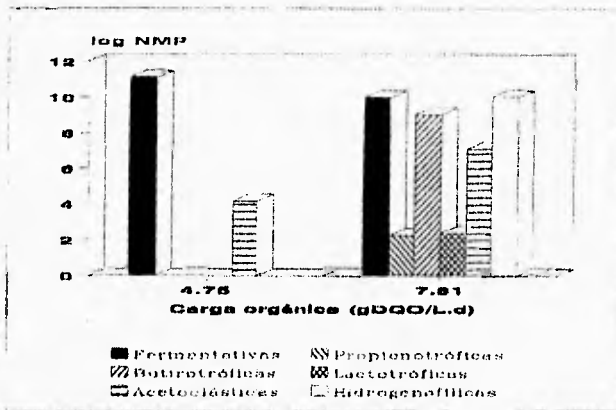


Fig. 4.1 NMP de los grupos de bacterias en el reactor acidogénico

Bacterias hidrogenofílicas

Las bacterias hidrogenofílicas se presentan en el orden de 1.07×10^{10} cels/gSSV, su presencia explica que ha existido en el reactor una degradación constante de carbohidratos, una formación sucesiva de AGV y por lo tanto, formación de hidrógeno. Estas bacterias se encargan de consumir el H_2 producido por las bacterias OHPA y fermentativas manteniendo las presiones de dicho gas a niveles adecuados y así proporcionar las condiciones termodinámicas necesarias para la conversión de ácidos superiores en acetato e hidrógeno.

Los resultados microbiológicos estimados mediante el NMP en el reactor acidogénico tienen un parecido con las concentraciones de las poblaciones a partir de reactores de una sola etapa (anexo C, tabla C.1 y C.2). Las bacterias acetogénicas fueron menores alrededor de 4 órdenes de magnitud con respecto de los reportados por Dolfing et al (1985), Dubourguier et al (1987) (citado en Guyot et al, 1990), López (1993), Moreno (1994), Chartrain y Zeikus (1986a,b) y Macarie et al (1995). El aumento en las bacterias fermentativas e hidrogenoflicas fueron 7 y 3 órdenes de magnitud respectivamente que las reportadas por López et al (1993), Noyola y Bustamante (1992) y Moreno (1994).

Chartrain y Zeikus, (1986a,b) y Chartrain et al, (1987) al evaluar la microbiología en la degradación del suero de la leche, usando un reactor de flujo mezclado de una etapa, encontraron que las bacterias degradadoras de lactato fueron mayores comparadas con las presentadas en este trabajo. Estas diferencias se explican en base a la concentración del sustrato (10 g/L) así como TRH (100 h) utilizado.

La cantidades de bacterias acetoclásticas en este reactor acidogénico fueron similares a las encontradas en reactor de una sola etapa, con las de los trabajos de (Guyot 1990, Zhang y Noike 1991, Fajardo y Guyot 1993).

La diferencia con estos resultados explica que los tipos de sustratos y las concentraciones influyen de manera directa sobre la selección del tipo de microorganismos que colonizan, así como de la actividad generada. Otro hecho importante son los reactores empleados y las condiciones de operación. Chartrain y Zeikus, (1986a,b) mencionan que el género *Methanosarcina spp* crece más rápido, con afinidad a dominar en la alta tasa de dilución, mientras el género *Methanotrix spp* crece muy lentamente y predomina a bajas tasas de dilución.

4.2 MICROBIOLOGÍA DEL REACTOR METANOGÉNICO

El reactor metanogénico se alimentó con la salida del reactor acidogénico, en la tabla 4.3 se encuentran las condiciones de AGV, la velocidad de carga orgánica global, así como las principales características fisicoquímicas y microbiológicas promedio. La representación gráfica de sus poblaciones se presenta en la figura 4.2.

Bacterias fermentativas

La cantidad de bacterias fermentativas en la carga orgánica de 0.80 gDQO/L.d presentó valores altos (1.26×10^{10} cels/gSSV) con respecto a las bacterias acetoclásticas (1.56×10^6 cels/gSSV). Sin embargo, en la carga orgánica de 3.55 gDQO/L.d, las bacterias fermentativas alcanzan un nivel máximo de 2.02×10^{13} .

Tabla 4.3 Poblaciones microbiológicas y parámetros fisicoquímicos en el reactor metanogénico, en tres diferentes condiciones de operación

Fermentativas (Núm. cels/gSSV)	1.26×10^{10}	1.30×10^9	2.02×10^{13}
Propionitróficas (Núm. cels/gSSV)	*	1.36×10^7	3.16×10^{12}
Butirotróficas (Núm. cels/gSSV)	*	1.56×10^{10}	1.01×10^{11}
Lactotróficas (Núm. cels/gSSV)	*	1.95×10^9	2.02×10^{13}
Acetolásticas (Núm. cels/gSSV)	1.56×10^5	1.56×10^{11}	2.05×10^{11}
Hidrogenofílicas (Núm. cels/gSSV)	*	1.56×10^{11}	2.02×10^{13}
COm (gDQO/gSSV.d)	0.1031	0.2196	0.46
SSV (g/L)	20.4775	20.4775	15.788
TRH (d)	1	1	1
DQO (mg/L)	96.0	332.5	852.0
Remoción (%)	88	81	76
Producción de $\text{I.CH}_4/\text{L.d}$	0.3	0.4	0.375
$\text{I.CH}_4/\text{gDQOr}$	0.279	0.182	0.07
Concentración de CH_4	85.0	89.0	70.1
pH	7.00	7.43	6.5

* No cuantificado; AcAc, ácido acético; AcPr, ácido propiónico; AcBu, ácido butírico

Bacterias acetolásticas

La concentración de ácido acético a la salida del reactor metanogénico aumentó con la carga orgánica (tabla 4.4). Sin embargo el nivel de las bacterias aumentó de 1.56×10^6 - 1.56×10^{11} cels/gSSV, al duplicar la carga. La actividad de estas bacterias se muestra indirectamente con la producción de metano que no cambia a través de la carga orgánica en el reactor (tabla 4.3). Kissalita et al, (1989), mencionan que durante la fermentación de la lactosa, el 81% de metano proviene del acetato.

Tabla 4.4 Productos de la fermentación de la lactosa a la salida del reactor metanogénico

0.80	0.0	0.0	0.0
1.75	0.9076	0.0	0.0
1.75	1.1584	0.0	0.0
3.55	1.8641	0.0	0.0
3.55	1.3393	0.0	0.0

Bacterias acetogénicas

La proporción de OHPA en la carga orgánica 1.75 gDQO/L.d (butirotróficas 1.56×10^{10} cels/gSSV, propionotróficas 1.36×10^7 cels/gSSV), tiene una relación con concentración de AGV como sustrato. Las bacterias butirotróficas resultaron estar presentes en mayor cantidad que las bacterias propionotróficas. Aunque a la salida del reactor metanogénico no aparecen propionato y butirato la presencia de estas bacterias indica, que estos productos cuando se forman están siendo fácilmente degradados por la microflora bacteriana (tabla 4.4 y figura 4.2).

En la carga orgánica de 3.55 gDQO este aumento trajo como consecuencia la acumulación de AGV y una disminución de pH de 7.43 a 6.5 (tabla 4.3). Las bacterias fermentativas, lactotróficas e hidrogenofílicas fueron abundantes en un 31% cada una, las bacterias propionotróficas 4.7%, mientras que las bacterias acetoclásticas responsables de la producción de metano fueron significativamente menores, 0.32% (tabla 4.5). La producción de metano disminuyó de 0.4 a 0.37 LCH₄/L.d y el rendimiento de metano respecto al DQO eliminado disminuyó de 0.182 a 0.07 L CH₄/gDQO.r.

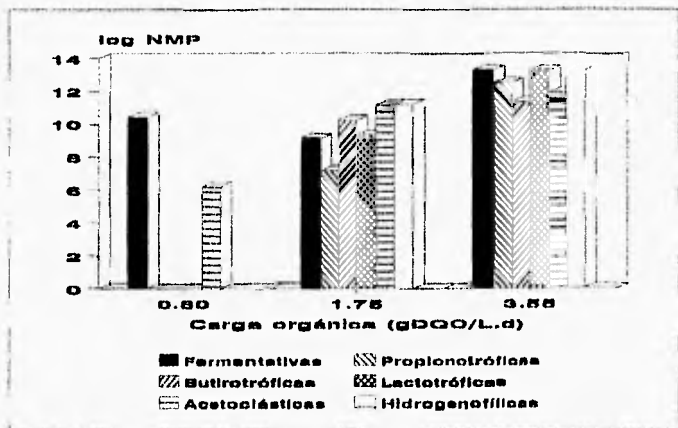


Fig. 4.2 NMP de los grupos de bacterias en el reactor metanogénico

Los resultados microbiológicos en el reactor metanogénico demuestra que todas las poblaciones de bacterias participantes en la degradación anaerobia se encuentran en reactores de una sola etapa, la diferencia se basa en el tipo de efluente y las condiciones de operación.

En la tabla 4.3 se observa que un incremento en la carga orgánica (3.55gDQO/L.d), se acompaña de un aumento en la concentración de las poblaciones sobre todo en las fermentativas y las propionotróficas de 4 a 5 órdenes de magnitud, respectivamente. Esto puede deberse a que la alimentación, proveniente del reactor acidogénico, tiene concentraciones de carbohidratos no convertidos y AGV, por lo que se desarrollan las bacterias acidogénicas y acetogénicas.

Los valores de bacterias propionotróficas fueron mayores alrededor de 3 órdenes de magnitud, en comparación con trabajos reportados en reactores de una sola etapa (anexo C, tabla C.1 y C.2). Las bacterias fermentativas también fueron mayores, (alrededor de 2 órdenes de magnitud). Excepto con los reportados por Noyola y Bustamante (1992) y López et al (1993), los cuales presentaron valores de 2 órdenes de magnitud mayores que las reportadas por este trabajo.

Bacterias lactotróficas

Las bacterias lactotróficas en el reactor metanogénico son 7 y 11 órdenes de magnitud, mayores que en el reactor acidogénico (tabla 4.1 y 4.3). Esto es probablemente debido a su sensibilidad al pH y a la existencia de concentraciones de ácido láctico en el reactor.

Las concentraciones de bacterias lactotróficas fueron similares a las encontradas por Chartrain et al (1987), ellos mencionan que las cantidades de estas bacterias son altas en comparación con las encontradas en digestores de contacto, además de considerar al ácido láctico y al etanol como los mejores metabolitos intermedios.

4.3 INFLUENCIA DE LA ETAPA ACIDOGÉNICA SOBRE LA METANOGÉNICA

La tabla 4.1 y 4.2 muestran que la adición de sustrato y acumulación de compuestos en el reactor acidogénico, fue un factor decisivo para la formación de poblaciones fermentativas e hidrogenofílicas. Además de considerar que la tasa de multiplicación de las acidogénicas es alta; (de 0.05 a 0.3 h⁻¹) y para las hidrogenofílicas es bajas (0.06 h⁻¹). Las bacterias hidrogenofílicas pueden subsistir con las acidogénicas a pesar de un pH de 3.9. Sin embargo, su presencia y actividad generada puede explicarse con base a la existencia de microambientes, en el interior del grano, que permitirá tener pH neutro.

Es importante mencionar, que las bacterias fermentativas en el reactor metanogénico estuvieron presentes y finalmente abundantes en la carga orgánica 3.55 gDQO/L.d y que las bacterias lactotróficas fueron también abundantes, en comparación con el reactor acidogénico (tabla 4.1 y 4.2). Con esto se muestra que la conversión de carbohidratos en el reactor acidogénico no fue

completa, y hubo de terminarse en el reactor metanogénico, y por lo tanto, el desarrollo activo de estas bacterias. El mismo comportamiento presentaron las bacterias lactotróficas donde probablemente la concentración de ácido láctico en el primer reactor no fue abundante, aumentando hasta el segundo reactor.

En la tabla 4.5 se observa que el reactor acidogénico en la carga orgánica 7.81 gDQO/L.d, las bacterias fermentativas representaban un 44% de la población y las hidrogenofilicas el 50%, el resto fue convertido por las bacterias OHPA y acetoclásticas. Esto explica el alto porcentaje de conversión de acidogénesis 43%, mientras que el 26% de conversión de acetogénesis correspondieron a las OHPA (tabla 4.1). Las bacterias hidrogenofilicas fueron altas en el reactor, además se presentó un 72% de producción de metano 0.25 de LCH₄/L.d y 0.07 LCH₄/gDQOr, siendo alto considerando que corresponde a un reactor en condiciones de pH 3.9. Debido a los bajos porcentaje de bacterias acetoclásticas 0.06% se piensa que la mayor producción de dicho gas se originó por la actividad de las bacterias hidrogenofilicas.

Tabla 4.5 Porcentaje de las poblaciones bacterianas en los reactores anaerobios conectados en serie

	Reactor acidogénico	Reactor Metanogénico	
Fermentativas	44.47	0.39	31.53
Propionotróficas	<0	0.004	4.93
Butirotróficas	5.04	4.71	0.16
Lactotróficas	<0	0.59	31.53
Acetoclásticas	0.06	47.15	0.32
Hidrogenofilicas	50.41	47.15	31.52
Producción de LCH ₄ /L.d	0.25	0.4	0.375
LCH ₄ /gDQOr	0.07	0.182	0.07

En el reactor metanogénico en la carga orgánica de 1.75 gDQO/L.d, los organismos dominantes fueron los acetoclásticos, y las hidrogenofilicas con 47.15% cada uno, Asimismo, aquí se presentó la mayor producción de metano (0.4 LCH₄/L.d) y rendimiento de metano respecto al DQO eliminado (0.182 LCH₄/gDQOr). Las poblaciones bacterianas presentan una buena relación biológica entre sus grupos (tabla 4.5); la proporción de bacterias metanógenas (47.1 %) fue mayor en comparación con las acetógenas (0.004-0.59%) y fermentativas (0.39%). Esto permite que las bacterias metanogénicas eliminen las presiones de hidrógeno producido por las bacterias fermentativas y OHPA, proporcionando las condiciones termodinámicas para la conversión de AGV en acetato e hidrógeno y al mismo tiempo, aumente la producción de metano.

Las tablas 4.1 y 4.3 muestran que los lodos en ambos reactores son similares, pues presentan las mismas poblaciones de bacterias pero en diferente concentración, lo que diferencia son las condiciones operativas. En el primer reactor el TRH fue de 6 h, su carga orgánica es mayor (4.75-7.81 gDQO/L.d). En el reactor metanogénico, presenta un TRH mayor (1 d) y carga orgánica fue menor (0.80-3.55 gDQO/L.d). De esta forma, el primer reactor fue controlado para promover el crecimiento y proliferación de poblaciones acidogénicas, mientras el segundo reactor recibió los productos del primer reactor y éste fue controlado para proveer un ambiente óptimo de las poblaciones metanogénicas.

Zhang y Noike (1991) al evaluar la microbiología de los reactores anaerobios en dos etapas mostraron que el número de bacterias metanogénicas y no metanogénicas permanecieron similares sin mostrar diferencias significativas. En la tabla 4.6 se observa que el reactor acidogénico, las bacterias OHPA fueron dominantes e incluso mayores que las fermentativas. Mientras que en el reactor metanogénico las bacterias hidrogeniflicas fueron dominantes y OHPA fueron menores. Sin embargo las bacterias acetoclásticas no llegaron a ser mayores en ninguno de los dos reactores.

Tabla 4.6 Porcentaje de poblaciones de bacterias en reactores anaerobios de flujo mezclado (Zhang y Noike, 1991)

Fermentativas	NC	87.5	47.9	0.02	20.6	39.5	10.0	22.0
Propionatróficas	NC	2.5	17.8	0.14	14.9	4.2	8.5	10.8
Butirotróficas	NC	2.0	27.5	0.1%	57.49	12.8	72.9	15.7
Acetoclásticas	NC	6.8	0.008	0.01	0.0005	5.8	7.2	15.7
Hidrogenoflicas	NC	1.06	0.6	99.6	6.87	37.4	8.5	35.0

a, Reactor acidogénico; b, Reactor metanogénico; NC, no cualificados

La mayoría de los resultados del NMP obtenidos por otros autores se expresan en número de células/mL. En este trabajo las unidades que se utilizaron fueron la propuestas por Guyot (1990) en número de células/gSSV. Esto es debido a que es difícil obtener una cantidad de lodo con un mismo volumen de agua, mientras las unidades número de células/gSSV se refiere directamente a la cantidad de bacterias asociadas a una fracción sólida que es lodo. Sin embargo, para realizar comparaciones con otros autores fue necesario expresar de igual forma estos resultados como unidades de células/mL. Se observó que los valores de células/mL fueron siempre mayores con respecto a los resultados de células/gSSV (anexo C, tabla C.1). Guyot et al (1990) encontraron que dos muestras tomadas del mismo reactor en un tiempo relativamente corto, dieron resultados diferentes en términos de número de células/mL pero la misma estimación por número de células/gSSV.

El estudio sobre el proceso de dos etapas ha sido discutido cerca de 26 años. Con estos estudios se ha podido establecer la distribución de las bacterias y las rutas intermedias de la degradación de sustratos.

Algunas investigaciones afirman que la metanogénesis no existe en la primera etapa y que las bacterias OHPA juegan un papel importante en la segunda etapa (Cohen et al, 1980; Harper y Pohland, 1974; Klass, 1984). Todos ellos han utilizado reactores de flujo mezclado en donde la biomasa no se encuentra retenida, provocando lavado de células. Sin embargo se obtiene mejores resultados cuando se usan reactores con biomasa retenida, en donde el TRC es mayor.

Los resultados de este trabajo demuestran que la separación de etapas, no es completa, pues los microorganismos participantes en cada una de ellas forman fuertes relaciones ecológicas entre los grupos de cada etapa, y la sobrevivencia de cada grupo depende directamente de la actividad de los otros grupos. Krebs (1985) menciona que las poblaciones de una especie no se presentan solas en la naturaleza, sino que forman parte de un ensamble de poblaciones que viven juntas en una misma área.

La variedad de bacterias y actividad generada en cada reactor puede explicarse con base en la existencia de microambientes en los cuales pueden existir cambios de condiciones abióticas (tales como pH, temperatura régimen hidráulico y difusión de nutrientes, etc.) en el interior del grano. De esa manera las poblaciones en el grano pueden observarse como microcolonias heterogéneas distribuidas al azar, cuya asociación favorece su crecimiento y sobrevivencia.

Las poblaciones microbiológicas de ambos reactores fueron similares a la de los trabajos en reactores convencionales, como los de, Dolfling et al (1985), Dubourguier et al (1988), López (1993), Moreno (1994), Chartrain et al (1987) y Fajardo y Guyot (1993). Esto demuestra que los reactores anaerobios en dos etapas, se comportan como dos reactores convencionales conectados en serie, y la actividad generada por cada grupo biológico depende directamente del tipo de alimentación y las condiciones de operación de los digestores.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones derivadas de este trabajo son:

1. El primer reactor solo fermenta parte de la lactosa. Con el hidrógeno producido en la reacción acidogénica se produce metano.
2. El tiempo de residencia celular en el reactor acidogénico, favorece el desarrollo de las bacterias hidrogenofílicas. La conglomeración bacteriana forma microambientes favorables a las bacterias que lo integran. Eso puede explicar la presencia de bacterias hidrogenofílicas que requieren de pH entre 6.5 y 7.5.
3. La presencia de bacterias fermentativas en el reactor metanogénico, se explica por la lactosa alimentada que no se degrada en el primer reactor.
4. El reactor metanogénico mostró la menor eficiencia en la eliminación de DQO en la carga orgánica más alta (3.55 gDQO/L.d), y también se observó la mayor concentración de bacterias lactotróficas y propionotróficas.
5. No existe una separación completa de las etapas acidogénica y metanogénica; pues sus poblaciones presentan una fuerte relación ecológica. Las poblaciones se encuentran ampliamente distribuidas en ambos reactores independientes de sus condiciones de operación. Son relativas, sí varían en función de las condiciones de operación.

Las recomendaciones que se hacen con base en lo encontrado en este trabajo son:

- I. Cuantificar la concentración de ácido láctico en los reactores y correlacionarlo con los parámetros poblacionales de bacterias lactotróficas.
- II. Con el fin de comparar la producción de metano por las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas y acetoclásticas, en un reactor acidogénico, se propone evaluar la formación de este gas mediante la degradación de los sustratos correspondientes.
- III. Con objeto de complementar la información cuantitativa obtenida en esta trabajo se recomienda estudiar las poblaciones bacterianas y sus composición microbiana a nivel de lodo granular mediante observaciones al microscopio electrónico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Andresen, J. R., Gottschalk, G. y Schlegel, H. G. (1970). *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* y *C. termoaceticum*. **Arch. Microbiol.**, 72:154-174.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Schloberths, Tanner, R. S. y Wolfe, R. S. (1977). *Acetobacterium* a new genus hydrogen-oxidizing, carbon dioxide, reducing anaerobic bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 27:355-361.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum L. J., Woese C. R. y Wolfe, R. S. (1979). Methanogens reevaluation of a unique biological group. **Microbiol Rev.**, 43:260-269.
- Barker, H. A. (1941). Studies on the methane fermentation. V. Biochemical activities of *Methanobacterium omelianskii*. **J. Biol. Chem.**, 137:153-167.
- Boone, D. R. y Bryant, M. P. (1980). Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolini* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. **Appl. and Environm. Microbiol.**, 40:626-632.
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J. y Wolfe, R. S. (1967). *Methanobacillus omelianskii* a symbiotic association of two species of bacteria. **Arch. Microbiol.**, 59:20-31.
- Bull, M. A., Stritt, R. M. y Lester, J. N. (1984). An evaluation of single y separated phase anaerobic industrial wastewater treatment in fluidized bed reactors. **Biotechnol. Bioeng.**, 26:1054-1065.
- Calzada, J. F. (1990). Digestión anaerobia en America Latina, aspectos generales. En **Memorias de conferencias sobre el tratamiento anaerobio de aguas residuales en America Latina**. UNAM, Noviembre 8 y 9. Pp. 67-71. México D.F. México.
- Chartrain, M. y Zeikus, J. G. (1986a). Microbial ecophysiology of whey biomethanation; Metabolism of lactose degradation in continuous culture. **Appl. Environm. Microbiol.**, 51: 180-187.
- Chartrain, M. y Zeikus, J.G. (1986b). Microbial ecophysiology of whey biomethanation Characterization of bacterial trophic population and prevalent species in continuous culture. **Appl. Environm. Microbiol.**, 51:188-199.

- Chartrain, M., Bhatnagar, L. y Zeikus J. G. (1987). Microbial ecophysiology of whey biomethanation; comparison of carbon transformation parameter, species composition and starter culture permacence in continuous culture. *Environm. Microbiol.*, 53: 1147-1156.
- Cohen, R. S., Zoetener, A., Van de Deursen, G. y Van Yel, J. G. (1979). Anaerobic digestion of glucose with separated y methane formation. *Wat. Res.*, 13:571-580.
- Cohen, A., Breure, A. M., Van Andel G. J. y Van Deursen, G (1980). Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose-i maximum COD-turnover rate diring continuous operation. *Wat. Res.*, 14:1439-1448.
- Dolfing, J., Griffioen, A. R. W., Van Neerven y Zevenhuizen, L. P (1985). Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.*, 31:744-750.
- Dubourguier H. C., Prensier, G. y Albagnac G. (1987). En *Proceedings of the GASMAT-workshop Lunteren, Netherlands*. Pp. 18-13.
- Dubourguier H. C., Prensier, G. y Albagnac, G. (1988). En *Proceedings of 5th International Symposium on Anaerobic Digestion*. Hall E.R. y Hobson P. N. (eds). Pp. 13-23. Permon Press. Italia.
- Duncan, M. D. (1976). *Sewage Treatment in hot climates*. John Wiley & Sons Pub. Co. Londres, Inglaterra.
- Durán de Bazúa, C. (1987). *Reaprovechamiento de efluentes de la industrin del maíz. Reporte final*, Universitát Karlsruhe, RFA - UNAM, México D.F. Impresora Azteca. México D. F. México. Pp. 93.
- Eckenfelder, W. W. y Ford, D. L. (1970). *Water pollution control. Experimental procedures for process design*. Jenkis Book Pub. Co. Nueva York, EEUUA. Pp. 45-90.
- Eckenfelder, W. W., Patoczka, J. B. y Pullian G. W. (1988). *Anuerobic versus aerobic treatment in the USA*. En *Anuerobic digestion*. Hall E.R. y Hobson P. N. editores. Pp 105-114. Nueva York, EEUUA.
- Fajardo, C. y Guyot, J. P. (1993). Arranque de un reactor UASB alimentado con vinazas: aspectos microbiológico. *Rev. Soc. Mex. Ilotecnol. Bioeng.*, 3(3-4):AM-153-AM-154.
- Fernández, G. (1986). *Apuntes de Química Ambiental*. Div. Est. Posg. Fac. Ing. UNAM. México D.F. México. Pp. 172-174.

- Fiestas, R. U. J. (1988). **Bases de los procesos anaerobios: aspectos microbiológicos.** En: **Tercer Seminario de Depuración Anaerobia de Aguas Residuales.** Universidad de Valladolid (ed). Valladolid, España. Pp. 2.1- 2.19.
- García J. L., Guyot J. P., Oliver B., Trad, M. y Paycheng, C. (1982). **Ecologie de la Digestion Anaerobie.** ORSTOM. Ser. Biol., 45:3-15.
- García, J. L. (1989). **Ecologie microbienne de la digestion anaerobie.** Cours de DEA de Biologie Cellulaire et Microbiologie. Universites d'Aix-Marseille, 1 et 11.50 pags.
- García, J. L. (1990). **Taxonomy and ecology of methanogenesis.** *FEMS Microbiol. Rev.*, 87:297-308.
- García, J. L. (1991). **Ecología de inóculos anaerobios específicos en el tratamiento de aguas residuales.** En **Memorias del II Seminario Internacional Sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetera.** Manizales, Colombia.
- Ghosh, S., Conrad, J. R. y Klass, D. L. (1975). **Anaerobic acidogenesis of wastewater sludge.** *J. Wat. Poll. Cont. Fed.*, 47,30-45.
- Ghosh, S. y Klass, D. L. (1978). **Two-phase anaerobic digestion.** *Process Biochem.*, 13:15-24.
- Ghosh, S. (1984). **Advanced two-phase digestion of sewage sludge.** Trabajo presentado en **Symposium on energy from biomass and wastes**, 8. Enero 30-Feb. 3. Pp. 1-20 Lake Buena Vista, FLA, EEUUA.
- Ghosh, S., Omgregt, J. P. y Pipyen (1985). **Methane production from industrial wastes by two-phase anaerobic digestion.** *Wat. Res.*, 19(9):1083-1088.
- Ghosh, S. (1991). **Pilot-scale demonstration of two-phase anaerobic digestion of activated sludge.** *Wat. Tech.*, 23:1179-1188.
- Gómez, J. (1981). **Bioquímicas de la fermentaciones.** Proveniente de Monroy H. (1981). **Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios organicos.** 1ra impresión. AGT editorial S. A. México D. F. México Pp. 33-45.
- Gorris, L. G. M., de Kok, T. M., Kroon, B. M., Van der Drift, C. y Vogels, G. D. (1988). **Relationship between methanogenic cofactor content y maximum specific methanogenic activity of anaerobic sludges.** *Appl. Environm. Microbiol.*, 54:1126-1130.

Costerton, J. W. (1992) A structural model of the anaerobic granule. *Biotechnol. Bioeng.*, 25(7):1-10.

Monroy, O. (1990). Evolution of microbial activities and population in a UASB reactor. *Biotechnol. Letters*, 12(2):155-160.

Introducción a la microbiología de la digestión anaerobia en para el tratamiento de efluentes industriales. UAM, ORSTOM, IMP y UNAM. 1987. 4-21. México D. F. México.

Nagase, M. y Tabata, Y. (1987). Evaluation on effectiveness of two-stage process degrading complex substrates. *Wat. Sci. Tech.*, 19:311-322.

Yoshida, K. y Kumazaki, K. (1990). Treatment of oily cafeteria wastewater by use anaerobic filter. *Wat. Sci. Tech.*, 22(3/4):299-306.

Levy, F. G. (1974). Recent developments in hydrogen management during wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:585-602.

Berg, L. (1979). Effect of iron on conversion of acetic acid to methane fermentations. *J. Bacteriol.*, 47:153-159.

A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. En: Norris, J. (ed). *Methods in Microbiology*. Academic Press Inc. Nueva York, 7-132.

20 tópicos del tema: Tratamiento anaerobio de aguas residuales. en el Instituto de Ingeniería, UNAM. México D.F. México.

Kasapgil, B. (1995). Performance of two-phase anaerobic digestion of dairy wastewater. En *Proceedings of the Third International Management Problems in Agro-Industries*. IAWQ, SMISA, UNAM. México. Pp. 102-111.

Microbiología. Estudio de la distribución y la abundancia. Segunda edición. UNAM. México.

Levy, F. G. y Pinderk, L. (1989). Influence of dilution rate on the acidogenicity during two-phase lactose anaerobiosis. *Biotechnol. Bioeng.*, 34:1235-

- Klass, D. L. (1984). Methane from anaerobic fermentation. *Science*, 223(4640):1021-1028.
- Komatsu, T., Hanaki, K. y Matsuo, T. (1991). Prevention of lipid inhibition in anaerobic processes by introducing a two-phase system. *Wat. Sci. Tech.*, 23:1189-1200.
- Lawrence, A. W. y McCarty, P. L. (1969). Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.*, 41:R1-R17.
- Lettinga, G., Van Vesel, A. F. M., Hobma, de Zeeuw, S. W. y Klapwik, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 12:699-734.
- Lettinga, G., de Zeeuw, W. J., Hulshoff, P. L. H., Hobma, S. W., Grin, P. C., Weigant, W. M., van Velsen, A. F. M. y Koster, I. W. (1982). *Anaerobic wastewater treatment using the UASB treatment process*. En Memoria del 2o. Simposio sobre Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación. UAM-1/ICAITI, Guatemala, Guatemala.
- Lin, C.-Y., Sato, Noike, T. y Matsumoto, J. (1986). Methanogenic digestion using mixed substrates of acetic, propionic, and butyric acids. *Wat. Res.*, 20:385-394.
- López, A., Espnosa, A., Noyola, A. e Ilangovan, K. (1993). Limite de biodegradación de ácidos grasos volátiles por un lodo anaerobio. *Rev. Soc. Mex. Biotechnol. Bioing.*, 3(3-4):AM-90-AM98
- López, A. S. (1993). Importancia de los macronutrientes durante el proceso de la digestión anaerobia de desechos orgánicos líquidos que contienen altas concentraciones de potasio. *Tests de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana*. 102 pp. Cordoba Ver. México.
- Macarie, H., Noyola, A., Guyot, J. P. y Monroy, O. (1995) *Anaerobic digestion of petrochemical waste; the case of terephthalic acid wastewater*. *Proceedings of Second Internacional Minisymposium on Removal of Contaminants from Water and Soil*, 2:35-51. Pub. Instituto de Ingeniería, UNAM. México D.F. México.
- Madigan, M.T. (1988). *Microbiology, physiology, and ecology of phototrophic bacterin*. En *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Zehnder, A.J.B. (Editor). Wiley-Liss. Nueva York, EEUUA. Pp. 39-111.
- Mah, R. A., Ward, D. M., Baresi, L. y Glass, T. L. (1977). Biogenesis of methane. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31:309-341.

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

-McInerney, M. J. y Bryant M. P. (1981). **Basic principles of bioconversions in anaerobic y methanogenesis**. En *Biomass conversion process for energy y fuel*. S. R. Sofer y O. R. Zabrosky (eds). Pp. 277 - 296. Plenum-Press. Nueva York, EEUA.

-Moreno, G. (1994). Obtención de lodos granulares en un reactor UASB a partir de lodos de purga. **Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM**. 247 pp. México D.F. México.

-Mosey, F. (1983). Mathematical modelling of anaerobic digestion process: regulatory mechanism for the formation of short chain volatile acids from glucose. *Wat. Sci. Tech.*, 15(8/9):2009-2032.

-Noike, T. y Cheng, Z. T. (1990). Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnol Bioeng.*, 27:1482-1487.

Noyola, A. y Briones, R. (1988). **Tratamiento anaerobio de vinazas a escala piloto: inoculación y arranque de reactores tipo lecho de lodos y filtro anaerobio**. En *Memorias del VI Congreso Nacional. SMISAAC*. Querétaro, Qro, México.

-Noyola, A. (1992). **Reactores anaerobios de segunda y tercera generación**. En *Procesos anaerobios para el tratamiento de efluentes industriales*. UAM, ORSTOM, IMP (eds). Mayo. UAM, México. D. F. México. Pp. 22-54.

-Noyola, A. y Bustamante, N. (1992). **Evolución del inóculo en un reactor anaerobio de lecho de lodos a escala industrial**. En *Memorias del VIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Cocoyoc, Mor., México.

-Olguín, L. P. y Monroy H. O. (1995). **Modelling a Two-Stage Anaerobic Process**. En *Environmental Biotechnology: Principles and Applications* (1995). Klumer Academic Publishers. Young, M. M. (ed). Printed in The Netherlands, Holanda. Pp. 569-578.

-Olguín, L. P. (1995). **Digestión anaerobia en dos etapas**. **Tesis Maestría en Biotecnología**. UAM-Iztapalapa. 63 pp. México. D. F. México.

-Pavlostathis, S. G. y Giraldo, G. E. (1990). Kinetics of anaerobic treatment. *Wat. Sci. Tech.*, 24(8):35-59.

- Perski, H. G. y Thauer R. K. (1981). Sodium dependence on growth and methane formation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.*, 130:319-321.
- Pohland, F. G. y Ghosh, S. (1971). Developments in anaerobic treatment processes. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, No. 2:85-108.
- Schoberth, S. M. (1983). **Methanogenic flora and their metabolic route.** En **Avances de la digestión anaerobia.** Mircen-Biotecnología. Instituto Centroamericano de Investigación Industrial. Guatemala, Guatemala. Pp. 2-19.
- Schwitzguebel, J. P. y Peringer P. (1986). **Methane production by two phases anaerobic digestion.** En **Biology of anaerobic bacteria.** by Dubourgier, H. C. editor. Elsevier Sci. Pub. Pp. 28-33. Amsterdam, Holanda.
- Shelton, D. R. y Tiedje, J. M. (1984). General Methods for Determining Anaerobic Biodegradation Potential. *Appl. Environm. Microbiol.*, 47(4):850-857.
- Smith, P. H. y Mah, R. A. (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.*, 14:368-371.
- Speece, R.E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environm. Sci. Technol.*, 17:416A-427A.
- Speece, R. E. y McCarty, P. L. (1964). **Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion.** *Advances in water pollution research.* En **Proceedings of the International Conference on Water Pollution Research**, 2:305-322.
- Stronach, M. S., Rudd, T. y Lester, N. J. (1986). **Anaerobic digestion process in industrial wastewater treatment.** Springer Verlag. Berlin, RFA.
- Switzenbaum, M. S. (1983). Anaerobic treatment of wastewater. *Microbiol. Tecnol.*, 5:242-250.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. y Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 41(1):100-180.
- Thiele, J. H., Chartrain, M. y Zeikus, G. (1988). Control of interpecies electron flow during anaerobic digestion, role of floc formation in syntropic methanogenesis. *Appl. Environm. Microbiol.*, 54(1):100-180.

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

-Viñas, M. (1990). Separación de etapas acidogénica y metanogénica: un ejemplo con agua residual de fabricación de pulpa termomecánica. *Memorias de la conferencia de tratamiento anaerobio de aguas residuales en América Latina*. UNAM, ORSTOM, UAM-I, SEDUE y CONACYT (eds). Noviembre, UNAM., México. D. F. México. Pp. 201-207.

-Woese, C. (1981). *Archibacteria*. *Investigación y Ciencias*, (59):48-61.

-Zeikus, J. G. (1980) *Microbial populations in digestors*. En *Anaerobic digestion*. Stafford, D. H., Whwatley, B I. y Hughes D E (eds). Applied Science Publishers Ltd. Pp. 61-90. Londres, Inglaterra.

-Zhang, T. C. y Noike, T. (1991). Comparison of one phase and two-phase anaerobic digestion processes in characteristics of substrate degradation y bacterial population levels. *Wat. Sci. Tech.*, 23:1157-1166.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXOS

ANEXO A

Composición de las soluciones para la alimentación de los reactores

Para obtener el medio mineral se prepararon soluciones concentradas con los diferentes reactivos y se mezclaron en la proporción que se indica a continuación:

Preparación del medio RAMM (Shelton y Tiedje, 1984)

Soluciones	mL/L
Solución mineral 1	50
Solución mineral 2	50
Solución de oligoelementos	1
Solución de FeCl_2	10

Composición de las soluciones y sustratos

Soluciones:

Solución mineral 1	g/L
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	7.0

Solución mineral 2	g/L
Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	5.4
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	10.0
Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2.0
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.5

Solución de oligoelementos	g/L
Cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.50
Cloruro de zinc (ZnCl_2)	0.05
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05
Ácido bórico (H_3BO_3)	0.05
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
Cloruro de cobre (CuCl_2)	0.03
Cloruro de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05
sulfuro de sodio (Na_2S)	0.05

Para preparar la solución, se disuelve perfectamente en un vaso las dos primeras sales. En otro se disuelven los reactivos restantes excepto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y en un recipiente por separado el $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ agregando 1 mL de HCl concentrado. Finalmente se mezclan y se ajusta el volumen en un litro con agua destilada.

Solución de sulfato ferroso

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, disolver directamente en 1 mL de HCl concentrado, cuando queden algunas cristales sin disolver, agregar agua hasta aforar un litro.

ANEXO B

Composición de las soluciones y sustratos para el análisis del NMP

Soluciones:

Solución mineral 1 g/L

Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) 6.0

Solución mineral 2 g/L

Fosfato monobásico de potasio ($KHPO_4$) 6.00

Cloruro de amonio (NH_4Cl) 2.40

Cloruro de sodio ($NaCl$) 12.00

Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 2.10

Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot H_2O$) 0.16

Solución de oligoelementos

Preparar una solución con 1.5 g de ácido nítrico triacético en 900 mL de agua destilada ajustar el pH a 6.5 con un solución de KOH y aforar a un litro.

Agregar g/L

Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 3.00

Sulfato manganoso ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$) 0.50

Cloruro de sodio ($NaCl$) 1.00

Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.10

Cloruro de cobalto ($CoCl_2$) 0.10

Sulfato de zinc ($ZnSO_4$) 0.10

Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 0.01

Sulfato de aluminio y potasio ($AlK(SO_4)_2$) 0.01

Ácido bórico (H_3BO_3) 0.01

Molibdato óxido de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) 0.01

Solución de vitaminas mg/L

Biotina 2

Ácido fólico 2

Piridoxina 10

Tiamina 5

Riboflavina 5

D. L. ácido pantoténico 5

Vitamina B12 0.1

Ácido p-amino benzoico 5

Ácido lipoico 5

Solución de resarsurina (agente reductor)

Pesar 0.1 g de resarsurina y disolverla en 100 mL de agua destilada.

Solución de cloruro de níquel

Cloruro de níquel (NiCl_2) 0.05 g/100 mL de agua destilada.

Solución de sulfato ferroso

Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 g/100 mL de agua destilada.

La preparación de las siguientes soluciones se realiza bajo corriente de nitrógeno y se esteriliza a 15 min en autoclave 15 lb/plg².

Agua reducida

Es agua destilada en ausencia de oxígeno. Para su preparación se requiere ebullición por algunos minutos, bajo corriente de nitrógeno.

Solución de sulfuro de sodio

Pesar 2.5 g de sulfuro de sodio y llevar a 100 mL con agua reducida (lavar los cristales de sulfuro antes de pesar con agua reducida). Finalmente pesar 0.75 g de cristal y disolver en 30 mL.

Solución de azul de bromotímol

Azul de bromotímol	0.2 g
Hidróxido de sodio (0.1 M)	5.0 mL
Agua destilada	100.0 mL

Solución de glucosa 1.38 M

Pesar 6.21 g de glucosa anhidra y disolverla en 25 mL de agua reducida.

Solución acetato de sodio 0.5 M

Pesar 1.7012 g de acetato de sodio y disolverlos en 25 mL de agua reducida.

Solución ácido propiónico 0.5 M

Pesar 1.200 g de ácido propiónico y disolverlos en 25 mL de agua reducida.

Solución de ácido butírico 0,5 M

Pesar 1.376 g de ácido butírico y disolverlos en 25 mL de agua reducida.

Solución de lactato 0,5 M

Medir 1.822 mL de lactato y disolverlos en 25 mL de agua reducida.

Tabla B.1 Tabla de McGrady para el cálculo de NMP (García et al, 1982)

Para 4 tubo de muestra con cada dilución

	D	A	B	A	B	A	B
000	0.0	113	1.3	231	2.0	402	5.0
001	0.2	120	0.8	240	2.0	403	7.0
002	0.5	121	1.1	241	3.0	410	3.5
003	0.7	122	1.3	300	1.1	411	5.5
010	0.2	123	1.6	301	1.6	412	8.0
011	0.5	130	1.1	302	2.0	413	11.0
012	0.7	131	1.4	303	2.5	414	14.0
013	0.9	132	1.6	310	1.6	420	6.0
020	0.5	140	1.4	311	2.0	421	9.5
021	0.7	141	1.7	312	3.0	422	13.0
022	0.9	200	0.6	313	3.5	423	17.0
030	0.7	201	0.9	320	2.0	424	20.0
031	0.9	202	1.2	321	3.0	430	11.5
040	0.9	203	1.6	322	3.5	431	16.5
041	1.2	210	0.9	330	3.0	432	20.0
100	0.3	211	1.3	331	3.5	433	30.0
101	0.5	212	1.6	332	4.0	434	35.0
102	0.8	213	2.0	333	5.0	440	25.0
103	1.0	220	1.3	340	3.5	441	40.0
110	0.5	221	1.6	341	4.5	442	70.0
111	0.8	222	2.0	400	2.5	443	140.0
112	1.1	230	1.7	401	3.5	444	160.0

A, Número característico; B, Número de microorganismos

Continuación de la tabla de McGrady para el cálculo de NMP (García et al, 1982)

Para 5 tubo de muestra con cada dilución

A	B	A	B	A	B	A	B
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160

A, Número característico; B, Número de microorganismos

ANEXO C

Poblaciones microbiológicas de la degradación anaerobia

Tabla C.1 NMP de poblaciones en los reactores anerobios conectados en serie

Reactor acidogénico			
COv gDQO/L.d	Grupos	Núm. cels/mL	Núm. cels/gSSV
4.75	F	4.0 E12	1.34 E11
4.75	BMA	3.2 E5	1.07 E4
7.81	F	2.8 E11	9.44 E9
7.81	BAp	5.0 E3	1.68 E2
7.81	BAb	3.2 E10	1.07 E9
7.81	BL	7.0 E3	2.36 E2
7.81	BMA	4.0 E8	1.34 E7
7.81	BMH	3.2 E11	1.07 E10
Reactor metanogénico			
0.80	F	2.6 E11	1.26 E10
0.80	BMA	3.2 E7	1.56 E6
1.75	F	2.8 E10	1.30 E9
1.75	BAp	2.8 E8	1.36 E7
1.75	BAb	3.2 E11	1.56 E10
1.75	BL	4.0 E10	1.95 E9
1.75	BMA	3.2 E12	1.56 E11
1.75	BMH	3.2 E12	1.56 E11
3.55	F	3.2 E14	2.02 E13
3.55	BAp	5.0 E13	3.16 E12
3.55	BAb	1.6 E12	1.01 E11
3.55	BL	3.2 E14	2.02 E13
3.55	BMA	3.2 E12	2.05 E11
3.55	BMH	3.2 E14	2.02 E13

F, fermentativas; BAp, propionotróficas; BAb, butirotróficas; BL, lactotróficas; BMA, acetoclasticas; BMH, hidrogenoflicas.

Tabla C.2 Trabajos microbiológicos del NMP obtenidos por diferentes autores

Dolfing et al., 1985	F BAp BAb BMA BMH	1.0 E10 1.0 E7 1.0 E7 1.0 E8 1.0 E9		Cels /mL	UASB	Refinería de azúcar	
Chartrain y Zeikus, 1986a,b	F BL BMA BMH	R 1 2.5 E10 2.4 E8 7.5 E6 1.5 E8	R 2 4.6 E10 4.6 E8 4.3 E6 1.1 E9	Cels/mL	RFM	lactosa 10 g/L	
Chartrain et al., 1987	F BL BMA	R1 2.4 E11 9.3 E 8 9.3 E 8	R2 2.6 E11 4.3 E10 9.3 E8	Cels/mL	RFM	Lactosa 10 g/L	
Dubourgier et al., 1987	F BAp BMA BMH	1.0 E9 2.5 E8 2.5 E9 2.5 E9		Cels/mL			
Guyot et al., 1990	F BAp BMA BMH	R1 3 E6 2 E5 3 E5 1 E6	R1 2 E7 6 E6 3 E6 1 E7	Cels/mL Cels/gSSV	UASB	Acetato 3.5 g/L Propionato 1g/L	
Zhang y Noike, 1991	F BAp BAb BMA BMH	TRC 10 d a b a b NC 1.4E8 9.4E8 2.3E7 5.8E8 4.0E6 3.5E8 1.3E8 3.3E9 3.3E6 5.4E8 1.7E8 2.7E4 1.1E7 1.7E5 1.1E7 2.2E5 1.7E6 1.3E8 9.1E10		Cels/mL	RFM	Almidón 10 g/L	
	F BAp BAb BMA BMH	TRC 2.5 d a b a b 3.3E9 7.4E8 3.3E9 4.9E8 2.4E9 7.9 E7 2.8E9 2.4E8 9.2E 9 2.4E8 2.4E10 3.5E8 8.0E4 1.1E8 2.4E3 3.5E8 1.1E9 7.0E8 2.8E9 7.9E8					
Noyola y Bustamante, 1992	F BAp BAb BMA BMH	R1 4.2E15 2.9E8 2.9E8 4.2E10 5.9E14	R 2 6.9E14 3.0E7 4.9E8 1.2E6 8.3E12	R3 5.9E11 1.8E9 7.9E8 1.8E6 2.9E14	Cels/gSSV	UASB	Industria de malterfús

Continuación de la tabla C.2

Fajardo y Guyot, 1993	R1 30 d BMA E10 BMH E11	R1 60 d E6 E10		Cels/gSSV	UASB	Vinazas		
López, 1993	F BAp BAb BMA BMH	1.2E14 2.3E9 2.3E9 1.6E10 2.3E10		Cels/gSSV	UASB	Vinazas		
Moreno, 1994	F BAP BAb BMA BMH	R1 30 d E10 E8 E8 E7 E9	R1 60 d E10 E8 E7 E10 E13	R1 90 d E11 E9 E8 E8 E14	Cels/gSSV	UASB	Vinazas	
López et al, 1993	F BAp BAb BMA BMH	1.37E16 5.69E5 2.85E6 1.59E8 2.85E13		Cels/gSSV	USAB	Propionato Butirato Acetato		
Macarie et al, 1995	BAp BAb BMA BMH	R1 2.8E9 1.5E9 3.1E9 7.7E10	R2 3.9E6 3.9E6 4.9E8 4.9E7	R3 5.8E8 NC 5.0E8 3.7E10	R4 8.4E7 7.5E7 4.7E8 7.4E10	Cels/gSSV	UASB	Ácido Tereftálico

a, Reactor acidogénico; b, Reactor metanogénico; d, días; R, reactor; NC, no cuantificado.