

00361  
6  
205.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFEECTO DEL SUSTRATO, DE LA CARGA ORGANICA Y DEL TIEMPO  
DE RETENCION HIDRAULICA SOBRE LA GRANULACION DE LODOS  
EN REACTORES ANAEROBIOS DE LECHO DE LODOS (UASB).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

**p r e s e n t a**

**CELIA BARRENA GONZALEZ**

**México, D.F.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**1991**



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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
NOMENCLATURA	III
RESUMEN	1
1 INTRODUCCION	3
Objetivos	
2 GENERALIDADES	4
2.1 REACTORES ANAEROBIOS	4
2.2 BIOCONVERSION ANAEROBIA	6
2.3 GRANULACION	8
2.3.1 Factores que afectan la granulación	9
2.3.1.1 Condiciones Ambientales	10
2.3.1.2 Variables Operacionales	13
2.3.1.3 Composición de los granos	14
2.3.1.4 Bacterias que forman el grano	17
2.3.1.5 Actividad de los granos	20
2.3.2 TEORIAS SOBRE LA GRANULACION	22
2.3.2.1 Teoría de de Zeeuw	23
2.3.2.2 Teoría del Sphagetti	24
2.3.2.3 Teoría de Hulshoff	25
2.3.2.4 Teoría de Sam-Soon	27
3 MATERIAL Y METODO	30
3.1 DESCRIPCION DE LOS REACTORES	30

3.2 CONDICIONES DE INOCULACION Y OPERACION	30
3.3 PARAMETROS DE CONTROL	31
3.3.1 A NIVEL DE ENTRADA Y SALIDA	31
3.3.2 A NIVEL DE LODOS	32
3.3.2.1 Número Más Probable	33
3.3.2.2 Pruebas Bioquímicas	34
3.3.2.3 Actividades Metanogénicas	34
3.3.2.4 Pruebas Fisicoquímicas	35
4 RESULTADOS Y DISCUSION	36
4.1 REACTORES ALIMENTADOS CON GLUCOSA	36
4.1.1 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE RETENCION HIDRAULICA (TRH).	36
4.1.1.1 Índice volumétrico y producción de biomasa	36
4.1.1.2 Evolución de las poblaciones microbianas	47
4.1.1.3 Evolución de las actividades metabólicas	52
4.1.2 INFLUENCIA DE LA CARGA ORGANICA	57
4.1.2.1 Índice volumétrico y producción de biomasa	57
4.1.2.2 Evolución de las poblaciones microbianas	60
4.1.2.3 Evolución de las actividades metabólicas	62
4.2 REACTORES ALIMENTADOS CON DIFERENTE TIPO DE SUSTRATO (GLUCOSA, ALBUMINA, AGV Y AGV + Fe SO <sub>4</sub> ).	64
4.2.1 Índice volumétrico y producción de biomasa	64
4.2.2 Evolución de las poblaciones microbianas	73
4.2.3 Evolución de las actividades metabólicas	80
5 CONCLUSIONES	83
6 BIBLIOGRAFIA	

## LISTA DE TABLAS

No. Tabla

### Generalidades

2.1 Plan experimental

### Metodología

3.1 Caracterización del inóculo

3.2 Condiciones de alimentación y operación de los reactores

3.3 Composición de la fracción mineral del agua residual sintética

### Efecto del tiempo de retención hidráulica

4.1.1 Características fisicoquímicas de los lodos.

4.1.2 Cinética de la formación de lodos y tiempos de arranque en los reactores.

4.1.3 Comparación entre muestras homogéneas y de la parte baja del reactor en el contenido de SSV (%) en los SST .

4.1.4 Incremento en biomasa.

4.1.5 Comparación entre las tasas de conversión a biomasa y la relación DQO:N.

4.1.6 Comparación entre el NMP de bacterias en el volumen total del reactor y las Y.

4.1.7 Evolución de las poblaciones bacterianas.

4.1.8 Comparación entre otros conteos bacteriales.

4.1.9 Cinéticas de degradación de los ácidos grasos volátiles.

4.1.10 Logaritmos de los números de bacterias contenidas en los SSV en el volumen total del reactor a los 225

días.

#### Efecto de la carga orgánica

- 4.1.11 Características fisicoquímicas de los lodos.
- 4.1.12 Comparación entre muestras homogéneas y de la parte baja del reactor en el contenido de SSV en los SST.
- 4.1.13 Comparación entre el incremento en biomasa y las tasas de conversión (Y).
- 4.1.14 Logaritmos de los números de bacterias contenidas en los SSV en el volumen total del reactor a los 225 días.
- 4.1.15 Evolución de las poblaciones bacterianas.
- 4.1.16 Cinéticas de degradación de los ácidos grasos volátiles.

#### Efecto del tipo de sustrato

- 4.2.1 Características fisicoquímicas de los lodos.
- 4.2.2 Comparación entre muestras homogéneas y de la parte baja del reactor en el contenido de SSV en los SST.
- 4.2.3 Incremento en biomasa.
- 4.2.4 Comparación entre las tasas de producción de biomasa).
- 4.2.5 Logaritmo del número de bacterias contenidas en los SSV en el volumen total del reactor a los 225 días.
- 4.2.6 Evolución de las poblaciones bacterianas.
- 4.2.7 Cinética de degradación de los ácidos grasos volátiles.



## LISTA DE FIGURAS

### No. Figura

### Generalidades

- 2.1 Diagrama del proceso de conversión de la materia orgánica particulada a metano.
- 2.2 Teorías propuestas sobre la granulación.

### Metodología

- 3.1 Diagrama esquemático del reactor UASB empleado en el estudio.
- 3.2 Diagrama de flujo del muestreo.

### Efecto del tiempo de retención hidráulica

- 4.1.1 Evolución del índice volumétrico de lodos.
- 4.1.2 Evolución de los SSV (%) en los SST.
- 4.1.3 Evolución la moda en el diámetro de los lodos
- 4.1.4 Evolución de diámetro promedio del grano.
- 4.1.5 Evolución de las poblaciones metanogénicas acetoclásticas.
- 4.1.6 Evolución de las poblaciones metanogénicas hidrogenogílicas.

### Efecto de la carga orgánica

- 4.1.7 Evolución del índice volumétrico de lodos.
- 4.1.8 Evolución diámetro promedio del grano.
- 4.1.9 Evolución de las poblaciones metanogénicas acetoclásticas.
- 4.1.10 Evolución de las poblaciones metanogénicas

hidrogenofílicas.

Efecto del tipo de sustrato

- 4.2.1 Evolución índice volumétrico de lodos.
- 4.2.2 Evolución del diámetro promedio del grano.
- 4.2.3 Evolución de las poblaciones metanogénicas acetoclásticas.
- 4.2.4 Evolución de las poblaciones metanogénicas hidrogenofílicas.

## N O M E N C L A T U R A

AGV	Acidos grasos volátiles
Asp	Actividad específica
AspT	Actividad de los lodos en el volumen total del reactor en condiciones ideales.
Bac. A	Bacterias metanogénicas acetoclásticas
Bac. H	Bacterias metanogénicas hidrogenofilicas
Bac. Ob	Bacterias OHPA que utilizan butirato
Bac. Op	Bacterias OHPA que utilizan el propionato
C O	Carga orgánica
DQO alim.	DQO de alimentación
DQO rem.	DQO removida
E	Eficiencia
Efl	Efluente
GRAN	Diámetro promedio del grano
Inf	Influente
IVL	Indice volumétrico de lodos
R	Reactor
s	Desviación estándar
SSF	Sólidos suspendidos fijos
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
SSVT	Sólidos suspendidos volátiles en el volumen total del reactor.
TRH	Tiempo de retención hidráulica
Vel. asc.	Velocidad ascendente
Vel. max.	Velocidad máxima

## RESUMEN

La aplicación de la tecnología anaerobia para el tratamiento de aguas residuales se ha incrementado sensiblemente en los últimos años en un buen número de países. Exceptuando los digestores de lodos de purga, el reactor anaerobio de lechos de lodos (UASB) es el más utilizado. Para su correcta selección, operación y control se requiere de la comprensión de los fenómenos que intervienen en la formación y crecimiento de los granos que forman el lecho en la base del reactor. El objetivo del presente trabajo es considerar los parámetros operacionales como tiempo de retención hidráulica y carga orgánica, la naturaleza del sustrato y el efecto del sulfato ferroso en la formación de lodos granulares de reactores UASB. Para ello se utilizaron 8 reactores UASB de 2.3 l de volumen útil, inoculados con la misma fuente (lodos activados adaptados en anaerobiosis) y alimentados con medios sintéticos durante 225 días.

**INFLUENCIA DEL TRH** [reactores 1, 2 y 3 misma carga orgánica (1 Kg DQO/Kg SSV.d), mismo sustrato (glucosa)]. Se presentaron diferencias en el IVL de acuerdo a las condiciones de operación: a menor TRH (6h, 12h y 24 h) menor IVL (22, 28.9 y 30.8 ml/g); el diámetro de grano alcanzado sigue un orden inverso al TRH (2.0, 1.7 y 1.5 mm). Se obtuvieron lodos con IVL de 30 ml/g en 90 días con TRH de 6 y 12 horas; en cambio el reactor que operó con 24 h requirió 180 días para alcanzar este valor. La actividad en los lodos fue mayor a los 225 con los valores siguientes:  $R_a$  (6h) 0.25 mmol/g SSV/h;  $R_a$  (12 h) 0.83 mmol/g SSV/h y  $R_a$  (24 h) 0.33 mmol/g SSV/h.

**INFLUENCIA DE LA CARGA ORGANICA** [reactores 2, 4 y 5 mismo TRH (12 h) mismo sustrato (glucosa)]. El tamaño de grano se vio influenciado por la carga orgánica alcanzándose valores de 1.7 mm con 1 Kg DQO/Kg SSV.d y de 1.4 mm con una carga orgánica de 0.5 Kg DQO/Kg SSV.d. La carga orgánica elevada (5 Kg DQO/Kg SSV.d) provocó daños severos en la población metanogénica, no permitiendo

el arranque del reactor.

**INFLUENCIA DEL TIPO DE SUSTRATO [reactores 2, 6, 7 y 8 mismo TRH (12 h)].** El empleo de ácidos grasos volátiles como sustrato (R7) no permitió la formación de granos con tamaños mayores de 0.6 mm, a diferencia de los alcanzados en los lodos de los reactores alimentados con glucosa (R2 1.2 mm 135 días) y albúmina R8 (1.7 mm). Asimismo, el IVL encontrado en los lodos de dicho reactor presentó pobres características de sedimentación (41.4 ml/g) a diferencia de los lodos alimentados con albúmina (14 ml/g) y glucosa (28.9 ml/g). El sulfato ferroso favoreció las condiciones de óxido-reducción dentro del reactor 8 propiciando el desarrollo de la población metanogénica. La hipótesis de San Soon y colaboradores (1988) quienes señalan que la granulación se debe a la formación de polipeptidos extracelulares a partir de organismos del tipo de Methanobacterium Strain AZ coincide con los resultados encontrados en este estudio debido a que: Se encuentra mayor diámetro de granos en los reactores alimentados con glucosa y albúmina así como el mayor contenido de bacterias hidrogenofílicas en ellos. La disposición alta de nitrógeno favorece la producción de biomasa, pero el número de bacterias acetoclásticas no incrementa. No se favoreció la formación de granos en los reactores alimentados con una mezcla de AGV y AGV más sulfato.

## 1. INTRODUCCION

El tratamiento anaerobio de aguas de desecho está incrementándose en todo el mundo dado el interés en proteger el ambiente y recuperar este recurso. En los últimos 10 años la biotecnología anaerobia ha tenido grandes avances en la ingeniería del proceso lo que en parte ha sido posible debido a nuevos conocimientos en la fisiología y bioquímica de las bacterias anaerobias (Hulshoff Pol et al., 1983; Speece, 1983).

El auge que están teniendo los procesos anaerobios se debe principalmente a las ventajas que presentan sobre los sistemas aerobios, como es el ser más económicos por no necesitar equipo ni energía para la aeración, ser altamente eficientes, producir una limitada cantidad de lodos de desecho y tener la capacidad de formar metano (McCarty, 1964).

Dentro de los sistemas anaerobios, los reactores del tipo lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) cuentan con una biomasa granular que, al ser retenida por sedimentación, permite separar el tiempo de retención hidráulica del tiempo de retención celular; con ello se logra tratar materia orgánica, en reactores de tamaño reducido. El principal problema que presentan los reactores anaerobios en general es el arranque, el cual es un proceso lento debido a la baja tasa de crecimiento de las bacterias metanogénicas y, en el caso particular del UASB, al lavado de parte del lodo de siembra (Hulshoff Pol et al., 1982); sin embargo esta desventaja puede ser superada si se cuenta con un buen inóculo.

Para el funcionamiento óptimo del reactor UASB se requiere comprender los fenómenos que intervienen en la formación y el crecimiento de los granos en el reactor. Para ello se realizan actualmente investigaciones sobre las especies bacterianas involucradas más importantes, los sustratos que inducen la granulación y las condiciones de operación que actúan como parámetros de selección dentro del reactor. De cualquier manera,

son relativamente pocas las investigaciones realizadas sobre el fenómeno de la granulaci3n y la formaci3n de in3culos adecuados.

El reactor UASB puede ser una alternativa a las necesidades de tratamiento de aguas residuales en M3xico, pero su implantaci3n se ver3 frenada si no se cuenta con in3culo en cantidad y calidad suficiente (Arias y Noyola, 1988). En este estudio se pretende contribuir en el conocimiento de la formaci3n de lodos granulares considerando la influencia del tiempo de retenci3n hidr3ulica (velocidad ascendente), la carga org3nica, la naturaleza del sustrato, as3 como la influencia de sulfato ferroso usando 3cidos grasos vol3tiles como sustrato.

## 2. GENERALIDADES

En algunos ecosistemas se pueden encontrar condiciones anaerobias en donde las especies involucradas no producen metano como tal, aunque estas especies pueden jugar un papel importante en ese ambiente, como por ejemplo los protozoarios fermentativos anaerobios, algunos hongos y otros organismos. Las bacterias son en realidad las principales responsables del proceso de metanizaci3n, el cual ocurre en un gran n3mero de ambientes anaerobios que tienen un reciclaje lento de materiales y donde el principal aceptor de electrones ( $CO_2$ ), es producto de los sustratos que son degradados. Algunos ejemplos de estos ambientes son los digestores anaerobios de aguas de desecho org3nicas, sedimentos acu3ticos de lagos, r3os y mares, as3 como suelos inundados, pantanos y ci3negas.

### 2.1 REACTORES ANAEROBIOS

En la fermentaci3n met3nica, la materia org3nica es degradada a productos gaseosos (metano y di3xido de carbono). Cerca del 90% de la energ3a del sustrato se retiene como metano, por lo que, aunque una gran cantidad de materia org3nica sea

degradada, solo se obtiene una relativamente baja producción de células microbiales. Debido a esto y a la gran cantidad de materia orgánica en ambientes anaerobios, el proceso es muy importante para el ciclo del carbono y nitrógeno en la naturaleza y se ha usado para la estabilización de aguas de drenaje y otras aguas de desecho orgánicas (Mc Inerney y Bryant, 1980).

Los procesos anaerobios aplicados en sistemas de tratamiento de aguas residuales se clasifican de la siguiente manera:

- Ia. Generación , que comprende los tanques sépticos, los digestores convencionales, los completamente mezclados y el proceso de contacto.
  
- 2a. Generación, donde se encuentran el filtro anaerobio (Young y McCarty, 1969), el reactor tubular de película fija (van der Berg y Lentz, 1979), el reactor de lecho de lodos (Lettinga et al. ., 1980; Bachmann et al., 1985), los biodiscos anaerobios (Tait y Friedman, 1980; Noyola et al., 1988).
  
- 3a. Generación , que considera a los reactores de lecho expandido (Switzembaun y Jewell, 1980) y lecho fluidizado (Switzembaum et al., 1984).

Dentro de los reactores avanzados se encuentra el reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente "Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor" (UASB), desarrollado por Lettinga y colaboradores en Holanda a fines de la década de los setentas; éste consiste básicamente de un tanque que contiene en la parte inferior una cama o lecho de lodos que funciona como digestor y en la parte superior un separador gas-líquido-sólido. Las aguas por tratar son uniformemente distribuidas en la base del reactor y pasan a través de la cama de lodos biológicos, la cual transforma la materia orgánica en biogás, que se retiene por medio de colectores en la parte superior del reactor. Al operar este reactor con flujo ascendente se ejerce cierta selectividad sobre los organismos presentes y favorece la formación de lodo con



buenas propiedades de floculación y sedimentación, obteniéndose así la cama de lodos de textura granular. De la misma manera, este flujo ascendente bien repartido en la base del reactor, evita la necesidad de agitación mecánica y la formación de zonas muertas y cortos circuitos hidráulicos (Lettinga et al., 1980).

Para una rápida operación del reactor se requiere que al arrancarlo se inocule con un volumen suficiente de lodos granulares. Sin embargo, para ello es necesario contar con reactores UASB en funcionamiento y que hayan acumulado suficientes lodos, lo cual no siempre es posible. Recientemente se han hecho investigaciones sobre varias fuentes de inóculo alternativo como son: estiércol de vaca (Wigant y de Mann, 1985), sedimentos de río, lodos de fosa séptica (García Rojas et al., 1988), lodos activados de purga adaptados (Noyola y Briones, 1988). Wu y colaboradores (1987) mencionan tres ventajas importantes en los lodos activados como son 1) se encuentran en ellos una gran cantidad de bacteria metanogénicas, 2) se pueden obtener grandes cantidades de ellos a partir de plantas de lodos activados y 3) contienen poca cantidad de arena y suelo ya que están compuestos principalmente de biomasa.

En este sentido, se han realizado en México una serie de estudios enfocados a obtener inóculo anaerobio para reactores UASB a partir de de lodos activados de purga, que tengan buena sedimentabilidad y alta actividad metanogénica, (Sanchez, 1988; González Ugalde, 1988; Calderon, 1989; Noyola et al., 1990).

## 2.2 BIOCONVERSION ANAEROBIA

En los procesos de digestión anaerobia usados en el tratamiento de aguas residuales, se llevan a cabo diversas transformaciones bioquímicas como resultado de diferentes grupos tróficos de microorganismos que degradan una amplia variedad de sustratos. Gujer y Zenhder (1983) proponen un esquema de 6 pasos en la conversión anaerobia de materia orgánica degradable de alto peso

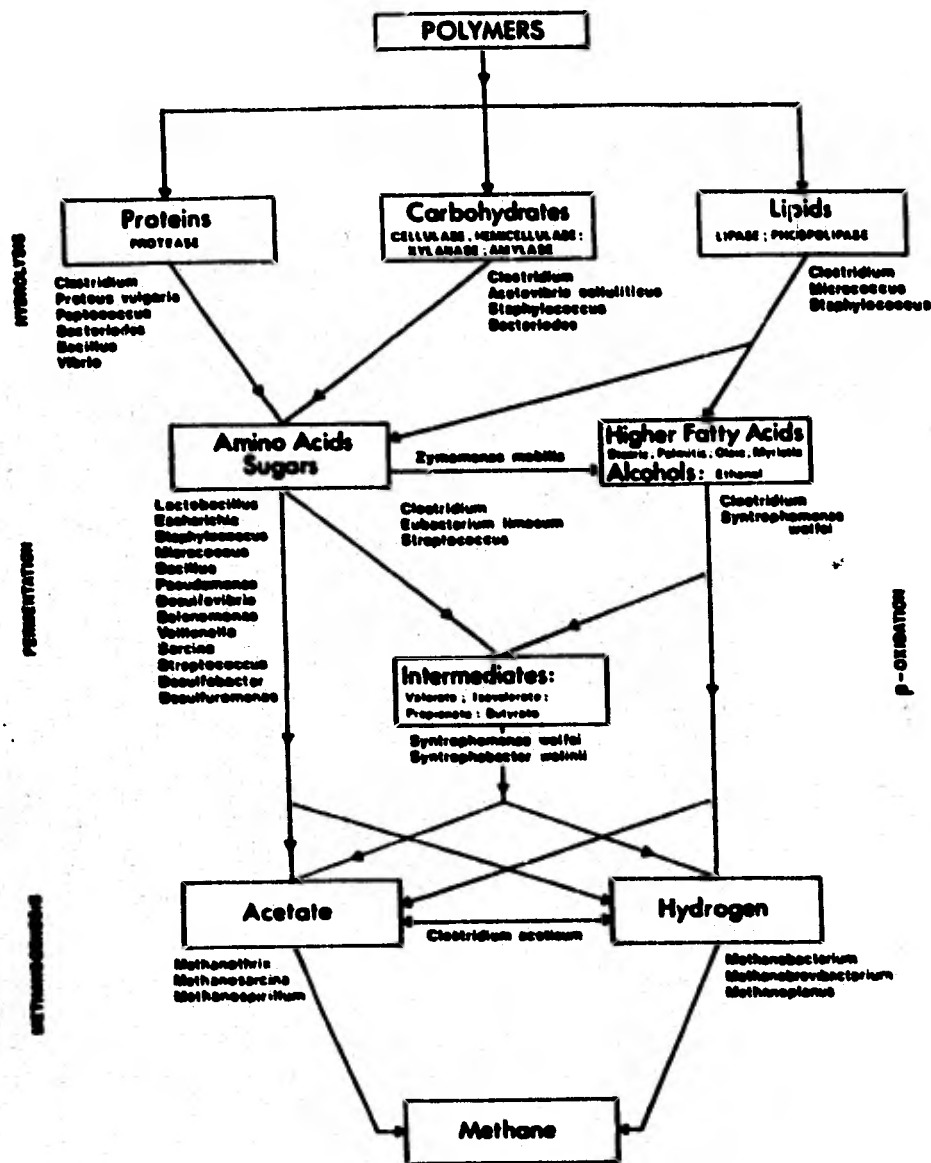


Fig. 2.1 Diagrama del proceso de conversión de la materia orgánica particulada a metano.

molecular a metano y dióxido de carbono. Estos comprenden:

- 1) Hidrólisis de proteínas, lípidos y carbohidratos.
- 2) Fermentación de azúcares y aminoácidos.
- 3) Oxidación anaerobia de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes.
- 4) Oxidación anaerobia de intermediarios tales como ácidos grasos volátiles (con excepción del acetato).
- 5) Conversión de acetato a metano.
- 6) Conversión de hidrógeno a metano.

La Fig. 2.1 muestra la vía de biodegradación anaerobia (Gujer y Zehnder, 1983) así como algunos microorganismos involucrados.

De esta manera, la bioconversión de las aguas residuales orgánicas es realizada por las comunidades anaerobias en donde la materia orgánica compleja como polisacaridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos es hidrolizada por bacterias quimiheterótrofas no metanogénicas a sus monómeros respectivos, además de acetato, hidrógeno, dióxido de carbono y una serie de productos fermentados reducidos como ácido propiónico, ácido butírico, lactato, succinato y alcoholes. Subsecuentemente estos últimos son oxidados a acetato e hidrógeno, sustratos metanogénicos, por bacterias acetogénicas. Dos sistemas microbianos distintos se encargan de convertir el acetato y el hidrógeno en metano; el primero constituido por bacterias metanogénicas acetoclásticas que producen a partir del acetato más del 70% de metano y el segundo grupo constituido por bacterias metanogénicas hidrogenofílica que reducen el  $\text{CO}_2$  con el  $\text{H}_2$ .

Existe una relación obligada entre las bacterias que convierten los ácidos propiónico y butírico a acetato e hidrógeno y las bacterias metanogénicas que utilizan el hidrógeno. La presión parcial del hidrógeno debe mantenerse en un nivel extremadamente bajo para favorecer termodinámicamente la conversión de ácidos grasos volátiles y alcoholes a acetato. Bajo condiciones estándares de una atmósfera de hidrógeno, el cambio de energía libre es positiva para esta reacción. Para la conversión de

propiónato a acetato e hidrógeno se requiere que la presión parcial de hidrógeno sea menor de  $10^{-4}$  atm. Las encargadas de mantener esta presión extremadamente baja son las bacterias metanogénicas que utilizan el hidrógeno; de no ser así, el sistema acumula ácidos propiónico y butírico. Esta sintrofia fue descubierta por Bryant y colaboradores (1967) y fue llamada: transferencia interespecie de hidrógeno.

En el sistema anaerobio, la conversión de glucosa a metano y  $\text{CO}_2$  lleva a la síntesis de aproximadamente 5 ATP por mol de glucosa; las bacterias fermentativas primarias aprovechan 3 o 4 ATP de los 5 disponibles, por lo que sólo poca energía está disponible para las fermentadoras secundarias y las metanogénicas. La energía libre para la conversión de acetato a metano es solo de -28 KJ/mol. Esta limitada energía libre se considera insuficiente para la producción de ATP (Thauer et al., 1977). Existen ahora evidencias de producción de ATP vía un mecanismo quimiosmótico, por gradientes de protones a través de la membrana.

### 2.3 GRANULACION

El proceso de granulación se da en los reactores UASB cuando la biomasa es retenida dentro de éste, de manera que las biopartículas son estructuralmente estables y tienen buenas propiedades de sedimentación. Por otra parte, deben estar lo suficientemente agregadas para resistir la fuerza hidráulica del líquido que fluye en forma ascendente, formándose granos o "pellets". La formación de granos es un fenómeno metabólico y depende de la disponibilidad de sustrato (Mahoney et al., 1987). Los microorganismos se agregan para intercambiar alimento, se realiza cometabolismo entre especies transfiriéndose hidrógeno lo que mas tarde puede estimular el crecimiento de microcolonias (Mahoney et al., 1987).

La granulación de los lodos se realiza preferentemente en aguas de

desecho que contengan 2-10 Kg DQO m<sup>-3</sup> con pocos o sin sólidos suspendidos; un requisito para la agregación de los lodos en el mantenimiento del máximo crecimiento bacterial (Hulshoff Pol et al., 1982). Es difícil cuantificar el proceso de granulación ya que es un proceso dinámico sin un punto claro de inicio (Hulshoff Pol et al., 1982). El mecanismo de la formación de granos metanogénicos difiere del de granulación en reactores de denitrificación y de reactores acidificantes, ya que los primeros se pueden conservar sin alimentar por largo tiempo, en tanto estos últimos son inestables bajo estas condiciones (Hulshoff Pol et al., 1983).

Los lodos anaerobios se han clasificado (Field, 1987) de la siguiente manera:

- 1) Lodo disperso. No hay agregados de partículas de lodo, pobres propiedades de sedimentación.
- 2) Lodo floculento. Agregados en flóculos sueltos, propiedades intermedias de sedimentación.
- 3) Lodo granular. Agregados en granos compactos, excelentes propiedades de sedimentación.

Los lodos granulares de buena calidad, deben tener velocidades de sedimentación, cerca de 60 m. h<sup>-1</sup>, siendo agregados compactos de 0.5 a 3 mm de diámetro (Zergers, 1987). Los lodos floculentos tienen velocidades de sedimentación cerca de 2 m. h<sup>-1</sup> y los lodos dispersos tienen velocidades de sedimentación de 0.5 m.h<sup>-1</sup> a 0.2 m. h<sup>-1</sup> (Field, 1987).

### 2.3.1 Factores que afectan la granulación.

Se considera que los siguientes factores afectan el proceso de

granulación en el tratamiento anaerobio:

#### 2.3.1.1 Condiciones ambientales.

Las principales condiciones ambientales que inciden en un tratamiento anaerobio de un agua residual, están relacionados con aquellos parámetros cuyo control permite un mejor crecimiento de biomasa y un alto porcentaje de remoción de la materia orgánica, y por lo tanto un mayor volumen de producción de biogás.

Además de los requerimientos fundamentales de macronutrientes como nitrógeno, fósforo y azufre, gran número de bacterias anaerobias no son capaces de sintetizar algunas vitaminas esenciales o aminoácidos, por lo que es necesario suplementar el medio con ciertos nutrientes específicos para su crecimiento y actividad. Frecuentemente las aguas de desecho industriales contienen exceso de algunos nutrientes, pero otros como los iones de zinc y cobre se encuentran en valores limitantes por lo que se recomienda un suplemento químico o la adición de otras aguas de desecho (Byrd, 1961).

Los elementos traza pueden ayudar a la digestión anaerobia al mantener la estabilidad de los componentes celulares (Stronach, 1986). La presencia de metales traza tales como hierro, molibdeno, selenio, tungsteno y níquel es necesaria para la actividad de varios sistemas enzimáticos; las hidrogenasas requieren selenio y su limitación reduce la actividad enzimática (Lester, 1971). Se conoce que el  $Ni^{+2}$  es un "elemento esencial" para las bacterias metanogénicas, debido a su asociación con el cofactor F<sub>430</sub> (Schoberth, ). Por otra parte la adición de níquel, cobalto y molibdeno incrementan la producción total de gas (incluyendo metano) en un 42% , al tratarse aguas de desecho del proceso de alimentos (Stronach, 1986). De esta manera, se debe disponer de los nutrientes esenciales para que las condiciones de crecimiento sean óptimas.

En trabajos realizados por van den Berg y colaboradores (1980) sobre digestores, encuentran que hay un efecto estimulante sobre las bacterias metanogénicas alimentadas con acetato, cuando se combina sulfato más hierro en concentraciones superiores a 0.6 mM y 0.5 mM respectivamente. El efecto positivo del hierro sobre la metanogénesis se puede explicar por la precipitación de los sulfuros producidos, ya que el sulfuro precipitado, puede aun ser utilizado por las bacterias acetoclásticas. Otro experimento realizado a nivel laboratorio (Guyot y Traore, 1985) demuestra que un cultivo mixto con Methanosarcina barkeri y una bacteria sulfato reductora que utiliza propionato, el acetato producido por sulfato reducción puede ser utilizado por M. barkeri, únicamente en presencia de  $Fe^{2+}$ , el cual precipita el sulfuro producido. De no estar presente hay acumulación de sulfuro y por tanto se inhibe la metanogénesis.

Otro factor importante que gobierna la degradación anaerobia es el pH. Las bacterias metanogénicas tienen un rango de pH limitado alrededor de la neutralidad (6.2 - 7.8). La acidez o alcalinidad en el reactor es el resultado de interacciones en el sistema ácido-base, como resultado de reacciones que ocurren durante los procesos de degradación. El control del pH y la alcalinidad permitirá mantener el pH en el rango óptimo para la metanogénesis. En la mayoría de los reactores anaerobios, los sistemas ácidos-base son el carbónico, hidrosulfúrico y ortofosfórico (Stronach, 1986) y el amonio ( $NH_4^+$ ).

La toxicidad de gran números de compuestos se relaciona con el pH; por ejemplo el amoníaco, el  $H_2S$  y los AGV, todos ellos se disocian en alguna proporción en el agua. Esta proporción está determinada por el pH y la constante de disociación del compuesto. La forma tóxica es la no-ionizada, ya que estas moléculas pueden atravesar fácilmente la pared celular de las bacterias metanogénicas y una vez dentro pueden disociarse produciendo un cambio en el pH interno (Rojas, 1988). De manera especial el ácido propiónico se reporta comúnmente por ser tóxico para aquellos organismos que asimilan  $H_2$  (Stronach, 1986).

Naturalmente, la eficiencia de la conversión de la fuente de carbono a masa celular está sujeta a la influencia de la temperatura. En los procesos anaerobios generalmente se usa el rango mesofílico (25-45°C); la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos es 35°C.

Se ha observado también que el tipo de aguas de desecho es importante con respecto a su composición, la biodegradabilidad de la materia orgánica, la presencia de materia finamente dispersa tanto de origen orgánico como inorgánico, la composición iónica (concentración de cationes uni y divalentes) y la presencia de compuestos inhibidores (Hulshoff Pol et al., 1983).

Lettinga y colaboradores (1985) indican que la granulación se lleva a cabo más rápido cuando el influente está compuesto principalmente de carbohidratos solubles tales como glucosa, por lo que las aguas residuales de azúcar de remolacha, aguas de desecho de la papa y efluentes de cervecerías se reportan comúnmente en trabajos que hacen referencia a la granulación. No obstante se presentan problemas en aguas de desecho de destilería y del proceso de fécula de maíz. Sin embargo, con estos tipos de aguas de desecho últimamente la granulación ha ocurrido (Hulshoff Pol et al., 1983).

La presencia de materia finamente dispersa bien sea de origen orgánico como inorgánico, también juega un papel importante en la granulación, pues el reactor UASB es un proceso eficiente para efluentes con un alto grado de solubilidad. Lettinga y colaboradores (1980) recomiendan cantidades de SST menores a 1000 ppm.

Por otro lado la presencia de iones metálicos divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  pueden crear en la superficie celular puentes entre los grupos de carga negativa, lo cual resulta importante en el fenómeno de la granulación. Concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  entre 40 y 100 mg/L en las aguas de desecho favorecen la granulación.



Cail y Bedford (1985) encuentran que concentraciones cercanas a 150 mg/L también la promueven. El calcio puede actuar no solo para facilitar los puentes de célula a célula sino también para promover indirectamente el crecimiento de agregados (Mahoney et al., 1987), ya que al agruparse tienen mejores oportunidades de intercambiar sustrato (Harvey et al., 1984).

Los metales pesados y los elementos tóxicos empiezan a ser nocivos a una concentración relativamente alta. Se ha comprobado que en el proceso anaerobio, en general se realiza una etapa de adaptación, que permite la presencia de tales concentraciones, en compuestos que hasta hace poco años se determinaron como fuertemente tóxicos (Speece, 1983).

#### 2.3.1.2 Variables Operacionales

Se deben considerar también las condiciones aplicadas en el arranque de los reactores, ya que es importante el procedimiento seguido al incrementar la carga orgánica, con el fin de evitar el exceso de carga y el subsiguiente lavado de sólidos suspendidos. De la misma manera, se debe considerar la cantidad de lodos de siembra usados (Hulshoff Pol et al., 1983). Generalmente se recomienda inocular con 30% del volumen del reactor con lodos activos (Stronach, 1986), Wu y colaboradores (1987) recomiendan inocular con una concentración de 30 a 40 g/l de SSV.

Se ha observado que la carga orgánica afecta la tasa de granulación; la carga orgánica determina la tasa de crecimiento y es prerequisite para el desarrollo del lodo granular. Investigaciones realizadas por Hulshoff Pol y colaboradores (1983) encuentran que la granulación solo se observa cuando la tasa de carga está por arriba de 0.6 Kg DQO SSV<sup>-1</sup> día. También consideran que la tasa de granulación será baja en concentraciones de DQO en el influente inferiores a 1g/l. Por otra parte, Boulenger y colaboradores (citado por Guyot, 1988) reportan que la aplicación de cargas demasiado elevadas pueden desfavorecer el proceso de granulación.

La selección de lodo con buena sedimentación dentro del reactor está gobernada por la tasa de producción de gas (dependiente de la tasa de carga orgánica) y de la tasa de carga hidráulica. A altas tasas de carga orgánica, el incremento en la producción de gas juega un papel importante en los procesos de lavado de la biomasa por causar agitación en la cama y acarreo de los sólidos con el biogás. Por otro lado, la carga hidráulica provoca turbulencia en la cama de lodos, incrementando el contacto entre biomasa y sustrato.

Por lo anterior, la eficiencia del reactor UASB depende en gran medida de una buena distribución hidráulica y un máximo de sustrato disponible para los microorganismos del digestor; si tanto la biomasa como el influente están uniformemente distribuidos se logra la utilización máxima del sustrato disponible.

En la cama de lodos, la concentración promedio de lodos es afectada por la velocidad del flujo ascendente a través de ella, por lo que la velocidad de sedimentación del lodo debe ser mucho mayor que la velocidad del fluido. De esta manera se tiene un efecto significativamente pequeño en el transporte ascendente del lodo. No obstante, la velocidad del fluido ascendente también es una función de la producción de gas, siendo proporcional al gas formado dentro de la cama de lodos. En el reactor UASB el grado de mezclado controla el tamaño de las partículas granulares. Se han usado tasas de carga hidráulica alrededor de ( $0.3 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) obteniéndose granulaciones favorables (Wu et al., 1987).

#### 2.3.1.3 Composición de los granos.

Hulshoff Pol y colaboradores (1983) encontraron en los lodos anaerobios material inerte que de alguna manera sirve como material de soporte. Su contenido mineral puede variar ampliamente

ya que se ha encontrado que contiene entre 10 y 20 % de cenizas dentro de un mismo reactor, y comparando entre varios reactores se ha encontrado que varía entre 21 y 46% (Alibhai y Foster, 1986), o entre 11 y 55% (Hulshoff Pol et al., 1986). Por otro lado, Dubourgquier (1987) encuentra que existe correlación entre la densidad y el contenido de cenizas de los granos; también observó variabilidad en el contenido de cenizas de acuerdo al tipo de agua tratada y al método de muestreo, así como al nivel al que se efectuó este en el digestor. Por otro lado, se encuentran diferencias significativas en la estabilidad de los granos referida como mayor resistencia a la desintegración por contener una matriz polimérica, diferencias también en la porosidad y carga superficial en los lodos de varios reactores UASB (Hulshoff Pol et al., 1983).

Dolfing y colaboradores (1985) reportan que cerca del 30% de la fracción de cenizas contienen FeS; también se ha encontrado Ni y Co como precipitados de azufre. Otras investigaciones reportan Al, P y Si (Mahoney et al., 1987). En cuanto al contenido de calcio, este se ha encontrado hasta en un 50% como carbonato. De una serie de análisis realizados con rayos X y mapeo elemental se ha visto que la distribución espacial de los minerales dentro del grano va a depender de las condiciones locales creadas por las actividades bacterianas (Dubourgquier, 1988). Hulshoff Pol y sus colaboradores (1986) al intentar relacionar el contenido de cenizas con la longitud del grano encuentran que esto no es posible.

Mediante la observación directa es posible ver la heterogeneidad estructural de los granos. En lodos procedentes de digestores anaerobios se observa por fotografías al microscopio electrónico que células filamentosas de Methanotrix sp están cubiertas por colonias de cocos y bacilos formando microfóculos de 10 a 50  $\mu\text{m}$  (Dubourgquier et al., 1988; Macario y Conway de Macario, 1988). Estos microfóculos se agregan mediante los filamentos de Methanotrix, los cuales parecen servir de puentes, llegando a encontrarse granos de más de 200  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, Hulshoff Pol y colaboradores (1980) sostienen que las presiones de selección creadas dentro del reactor dan como resultado el crecimiento

bacterial sobre núcleos de material orgánico e inorgánico presentes como material acarreador originado a partir del lodo de siembra.

Al examinar la superficie de las muestras mediante el microscopio electrónico de barrido se nota que éstas se deterioran y llegan a romperse después de la fijación. Además es difícil hacer observaciones precisas, ya que se encuentra una gran cantidad de material extracelular que cubre las células bacteriales y las microcolonias. Cuando se logra remover este material se pueden apreciar microcolonias asociadas que indican la existencia de sintrofia (Dubourguier et al., 1988).

Con respecto a las observaciones hechas con microscopio electrónico de transmisión, éstas son técnicamente más adecuadas para estudiar la estructura interna de los granos (Dubourguier et al., 1988), ya que a altas resoluciones se puede observar que la matriz del grano parece contener grandes cantidades de paredes celulares de varios géneros de bacterias. En algunos casos se piensa que se trata de paredes celulares de Methanotrix atacadas por bacteriófagos líticos (Prensier et al., 1988a; Roustan et al., 1986). La matriz parece ser traslúcida a los electrones. También se pudo observar que las células bacteriales presentan varias clases de material extracelular. (Dubourguier et al., 1988).

La estabilidad estructural parece depender de la existencia de la matriz polimérica en la superficie; cuando esta no existe la desintegración de los lodos es más rápida. Estos exopolímeros pueden llegar a tener un papel importante en la adhesión y estabilización del grano, aunque éstos representan sólo entre el 1 y 2% del peso seco (Dolfing et al., 1985).

Mediante observaciones realizadas en fotografías al microscopio electrónico, varios autores (Harada et al., 1988) citan la existencia de una matriz polimérica en granos cultivados en aguas de desecho que contienen azúcares, en donde además de encontrarse diversas morfologías de bacterias, se pueden apreciar grietas y aberturas en dicha matriz, las cuales se utilizan probablemente

para el transporte de sustancias hacia adentro y la salida de productos. Las cubiertas poliméricas con grosores de 20 a 40  $\mu\text{m}$  parecen servir para la adhesión de célula a célula. Al analizar la composición de los polímeros extracelulares se encontró que los principales azúcares neutros que los constituyen fueron glucosa, ramnosa, galactosa, manosa y ribosa (Dolfing et al., 1985; Harada et al., 1988). Este último autor sugiere la presencia de polisacáridos aniónicos ya que estos fueron positivos al rojo de ruthenium, el cual es específico para polisacáridos y ácido hialurónico. Otras moléculas como las proteínas pueden funcionar como polímeros extracelulares, ya que pueden aportar importantes sitios de unión, pues aunque tengan una carga neta negativa, los grupos positivos pueden formar fuertes uniones con sitios negativos. Los lipopolisacáridos también se consideran importantes constituyentes de la matriz en biopelículas anaerobias, pero estos no se tifican con el rojo de ruthenium. (Dubourguier et al., 1988).

Los granos que crecen únicamente en acetato no presentan biopolímeros en la superficie y dentro del grano. El género Methanotrix se observa en los granos de acetato junto con otros morfotipos de bacterias, lo cual sugiere que la síntesis y excreción de biopolímeros extracelulares no es un prerrequisito para la formación de granos, pero puede usarse para reforzar la fuerza mecánica y estabilidad del grano (Harada et al., 1988).

#### 2.3.1.4 Bacterias que forman el grano.

Los lodos granulares o pellets tienen una composición microbial muy variable. Algunos reactores producen granos formados predominantemente por bacterias bacilares, mientras en otros las bacterias filamentosas son dominantes. Esto puede ser de alguna manera controlado de acuerdo a las características de operación del reactor; por ejemplo, estas condiciones promueven diferencias en los productos de conversión del sustrato (como el acetato) y pueden causar la selección de especies como Methanosarcina o Methanotrix (Hilton et al., 1983; Reynolds, 1986; Noike et al., 1985). Cuando se tiene baja concentración de acetato con buen

mezclado, las bacterias del tipo de Methanotrix y Methanospirillum se observan, en tanto en los sistemas con altas concentraciones de acetato y menor mezclado se encuentran formas cocoides parecidas a Methanosarcina. Existe competencia por sustratos similares como la que se realiza entre Methanobacterium y Methanospirillum por el hidrógeno, donde se tiene crecimiento rápido y baja afinidad contra alta afinidad (Tomei et al., 1985), o con respecto al ácido propiónico (Heyes y Hall, 1983) y probablemente muchos otros sustratos. Esta competencia no sólo determina las especies microbiales predominantes en el grano, sino también características físicas tales como tamaño y distribución espacial.

Methanotrix shoehngeni se reporta como la especie dominante de las metanógenas acetoclásticas en análisis realizados por Dubourguier et al. (1985) y Dolfing et al. (1985), en lodos granulares de la industria del almidón. Dubourguier y colaboradores (1988) encuentran Methanobrevibacter como especie dominante de las metanógenas hidrogenofílicas. Archer y Powel (1985) consideran que Methanobrevibacter tiene el principal papel en las asociaciones sintróficas.

En relación a la identificación de los microorganismos que forman el grano, tomando como criterio de selección el tipo de sustrato existen técnicas disponibles para establecer cada grupo fisiológico de bacterias. El método clásico para evaluar el número de bacterias en una muestra, en placas de agar, contando las colonias después de un período de tiempo. La adaptación de estos métodos a la anaerobiosis y al crecimiento lento de bacterias da lugar a las técnicas de tubos de agar rodados y a los métodos de agar profundo. Estos métodos destruyen las interacciones entre las especies de las muestras y pueden dar grandes distorsiones en el entendimiento de la estructura de la comunidad a causa de la selectividad en los métodos de cultivo. La microflora en general puede ser establecida por tinción de los ácidos nucleicos con naranja de acridina (Hobbie et al., 1977) o con DAP (Porter y Feig, 1980) teniendo diluciones adecuadas de las muestras y contando la fluorescencia creada por iluminación de epifluorescencia. Como el lodo granular es un concentrado de

bacterias, este método da siempre los mismos resultados, por ejemplo entre  $1 \times 10^{12}$  y  $4 \times 10^{12}$  células por gSSV; además, no se puede obtener información sobre grupos tróficos específicos (Dubourguier et al., 1988).

Por diluciones en serie e inoculaciones de medios de cultivo que contengan una fuente de carbono y los nutrientes esenciales, la estimación del número más probable es posible si se consideran los últimos tubos subcultivados, bien sean 3, 5 o 10. Obviamente se tienen resultados más precisos en este último número de repeticiones por dilución. Después de la incubación (desde una semana hasta varios meses, dependiendo del grupo de bacterias que interesen), el análisis de productos terminales metabólicos junto con exámenes microscópicos dan la concentración de bacterias que degradan una fuente de carbono y la identificación presuntiva de las bacterias dominantes (Dubourguier et al., 1988).

#### 2.3.1.5 Actividad de los granos

Smith y Mah (1966), observaron que el acetato produce aproximadamente el 73 % del metano generado en los digestores anaerobios. En virtud de que el acetato es el principal precursor de la producción de metano, la reacción acetoclástica ha sido principalmente estudiada, basándose en los sustratos acetogénicos que son los ácidos grasos volátiles.

Según Kaspar y Wuhrman (1987), en el proceso de la degradación de la materia orgánica soluble, la degradación del acetato es la reacción limitante. Por lo tanto su cinética de degradación y la de los ácidos grasos volátiles dan información sobre la tasa máxima metanogénicas y la carga orgánica aplicable que se puede obtener con un lodo de digestor. Asimismo, proporcionan datos sobre los pasos limitantes del proceso y se puede apreciar indirectamente la evolución de la biomasa.

La capacidad de consumo del sustrato está relacionada al TRH y a la carga orgánica, así como también a la biomasa activa y a las limitaciones de transferencia de masa en el grano (Hulshoff Pol et al., 1983).

La "actividad metanogénica específica" del lodo es la cantidad de sustrato convertida a metano por unidad de masa de lodo, por unidad de tiempo. Generalmente las unidades son  $\text{gDQO CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV lodo} \cdot \text{d}^{-1}$ . La máxima actividad metanogénica específica es la actividad bajo condiciones ideales como son temperatura, pH, adecuada concentración de nutrientes y sustrato, así como perfecto contacto sustrato-lodo.

Las actividades metabólicas específicas pueden ser medidas en experimentos "batch" con sustratos definidos. Con una mezcla de AGV, el valor se encuentra en el rango de 6.5 - 27  $\mu\text{mol CH}_4/\text{g SSV}/\text{min}$  (Hulshoff Pol et al., 1986). Cuando se prueban los mismos sustratos en los que fueron cultivados los lodos se tienen los valores máximos de actividades específicas, ya que la microflora está adaptada.

Las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas presentan actividades



específicas de 250  $\mu\text{mol CH}_4/\text{g SSV}/\text{min}$  y las metanogénicas acetoclásticas 25  $\mu\text{mol CH}_4/\text{g SSV}/\text{min}$  (Dolfing y Bloemen, 1985), Las actividades específicas de varios grupos tróficos pueden clasificarse como azúcar > acetato > propionato. Dubourguier (1988) reporta que la degradación del propionato durante la metanogénesis es al parecer el paso limitante en la degradación de sustratos solubles.

En biopelículas gruesas, el sustrato no alcanza a llegar a zonas profundas debido a la resistencia a la transferencia de masa (Dolfing, 1985). Este efecto puede ser de gran significado para la tasa de reacción en un reactor. El gradiente de concentración en la biopelícula estimado de acuerdo a la 1a. ley de Fick es:

$$F = -\rho D \cdot dc/dx$$

donde  $F$  es el flujo del sustrato,  $\rho$  es la porosidad de la biopelícula,  $D$  es el coeficiente de difusión y  $dc/dx$  es el gradiente de la concentración de sustrato en la biopelícula. La ley de Fick predice que un flujo de sustrato a través de una biopelícula es acompañado por un gradiente de concentración. La magnitud del gradiente incrementa cuando aumenta el flujo. El flujo depende de la actividad específica y de las dimensiones de la biopelícula. Debido a la existencia del gradiente, las bacterias dentro de la biopelícula están expuestas a más bajas concentraciones de sustrato en comparación con las bacterias de la superficie, de manera que mostrarán una baja actividad. La relación entre actividad y concentración de sustrato sigue generalmente la cinética de Monod (Dolfing, 1985).

La ecuación de Monod predice que la velocidad de una reacción enzimática depende linealmente de la cantidad de sustrato presente a concentraciones alrededor del valor de  $K_m$  y por abajo de éste. De esta manera, la resistencia a la transferencia va a ser significativa si la concentración del sustrato está en los valores antes señalados o si el gradiente en la biopelícula alcanza este rango. Esto implica que los efectos de resistencia a la transferencia de masa dependen:

- a) de la concentración de sustrato,
- b) de los valores de  $K_m$  de las bacterias para el sustrato,
- c) del grosor de la biocapa ,
- d) de la actividad máxima específica de la biocapa.

Este último factor determinan el flujo e influencia el gradiente de concentración en la biocapa. (Dolfing, 1985).

Henze y Harremoes (1983) predicen que la resistencia a la transferencia de masa en biopelículas metanogénicas no es significativa cuando el grosor de la capa es menor de 1 mm. Dolfing (1985) encuentra que las actividades metanogénicas con acetato y propionato no están influenciadas por el tamaño del grano, pero que la metanogénesis a partir de  $H_2-CO_2$  mejora cuando los granos han sido macerados y la presión parcial de  $H_2$  esta abajo de 1 atm. Por otro lado, encuentra que la transferencia de  $H_2$  esta limitada en los granos intactos a bajas presiones parciales de hidrógeno. En reactores industriales no se detecta limitaciones de transferencia de masa para AGV; esto se debe probablemente a los tamaños relativamente pequeños de los granos (diámetro promedio = 2 mm) y su relativamente baja actividad metanogénica específica para el  $H_2$ , acetato y propionato. Sin embargo la resistencia se observa en granos cultivados con etanol-propionato que tienen altas actividades específicas metanogénicas (Dolfing, 1985).

Alibhai y Foster (1986) al comparar las actividades metanogénicas de lodo granular y flocular encuentran que los lodos granulares tienen una actividad específica alta ( $4 \text{ Kg DQO removido} \cdot \text{Kg}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{día}$ ) comparado con los sistemas no granulares ( $1.8 \text{ Kg}^{-1} \text{DQO} \cdot \text{Kg}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}$ ). No obstante que el lodo flocular presenta una mejor área superficial y que se esperaría favoreciera el transporte de nutrientes.

### 2.3.2 TEORIAS SOBRE LA GRANULACION

### 2.3.2.1 Teoría de De Zeeuw

De acuerdo con De Zeeuw (1988), varias formas de lodo granular pueden observarse en los reactores UASB de laboratorio, lo cual no sucede en reactores a escala completa. Al estudiar los tipos de granos desarrollados durante el arranque de reactores de laboratorio alimentados con AGV, encuentra 3 tipos de granos, de acuerdo a sus diferencias macroscópicas:

A: granos esféricos compactos formados principalmente de bacterias del tipo de Methanothrix soehngeni, los cuales se conocen como granos-bacilares.

B: "pellets" más o menos esféricos que contienen bacterias filamentosas difusamente entretrejidas, adheridas a una partícula inerte; la bacteria dominante es Methanothrix soehngeni. A estos granos también se les llama granos filamentosos.

C: Granos esféricos compactos compuestos predominantemente por bacterias del tipo de Methanosarcina.

Este autor considera que los tipos de granos están relacionados con el patrón de arranque, el tipo de lodo de siembra y el tiempo de retención de la biomasa, según los siguientes criterios:

#### Granos de tipo A.

En experimentos de tipo batch para conocer la cantidad de biomasa activa en el reactor de acuerdo a la tasa de producción de metano, De Zeeuw (1984) encuentra que la actividad específica máxima fue de 2.85 Kg CH<sub>4</sub>-DQO / (Kg SSV . d), este valor concuerda con los datos reportados para cultivos puros de Methanothrix (Huser, 1981), lo que hace pensar que este tipo de granos contiene predominantemente organismos como este. De Zeeuw (1984) reporta un factor de rendimiento de 0.024 g de biomasa-SSV/g CH<sub>4</sub>-DQO.

De Zeeuw propone que los granos de tipo A se forman a través de la colonización por Methanothrix de las cavidades centrales de Methanosarcina; esta última es seleccionada en los estados

iniciales por las altas concentraciones de acetato. Esto ha sido apoyado por las observaciones de pequeños granos jóvenes que tienen centros compuestos exclusivamente de Methanothrix, con Methanosarcina en la periferia. El crecimiento subsecuente bajo tales condiciones de arranque, producen granos de tipo Methanothrix y la pérdida de las capas externas de sarcinas.

#### Granos de tipo B.

Estos se forman durante el arranque cuando se lleva a cabo el lavado del lodo flocular ejerciéndose fuerte selección sobre las partículas de mayor densidad las cuales generalmente constan de material inerte, Methanothrix puede adherirse a estas partículas acarreadoras.

#### Granos de tipo C.

Independientemente de la tendencia de Methanosarcina a agregarse, cuando se tienen largos tiempos de retención de biomasa que favorecen el crecimiento de granos de gran tamaño, y cuando se tienen concentraciones arriba de 1 Kg DQO/m<sup>3</sup> se va a favorecer el desarrollo de organismos de este tipo ya que bajo estas condiciones no se tiene practicamente competencia con Methanothrix (70 h). Este tipo de grano no se recomienda debido a su inestabilidad dentro del reactor, provocando un mal funcionamiento así como a las limitaciones por sus altos valores de K<sub>s</sub>.

#### 2.3.2.2 Teoría del spaghetti.

Weigant (1988) considera que la granulación con Methanothrix como organismo dominante se puede realizar de la siguiente manera:

Si el reactor es operado durante el arranque a bajas concentraciones de sustrato se favorece el crecimiento de Methanothrix, ya que esta puede estar presente en el material de siembra (como partículas aún con diámetros de 0.37 mm). Cuando la concentración de Methanothrix es lo suficientemente alta y la concentración de material inerte es baja, Methanothrix puede crecer en pequeños granos o adherirse a la materia finamente

dispersa debido a que dicha bacteria se desplaza alrededor de la cana de lodos por la turbulencia del gas generado. La selección para los agregados se impone cuando se incrementa la velocidad de flujo. A una carga orgánica constante, las partículas precursoras del grano crecen hacia afuera por el crecimiento combinado de bacterias individuales y por adhesión a material no bacterial. El crecimiento en forma esférica se debe al movimiento moderado y constante del biogás. Los granos en crecimiento son de tipo filamentosos. Bajo el microscopio se parecen a un plato de spaghetti en el cual hay partes entretrejidas y partes en agregados.

Los granos de tipo bacilar, consisten principalmente de filamentos cortos de Methanothrix; estos se han encontrado en instalaciones a escala completa. Este tipo de grano puede crecer cuando se logran tiempos largos de retención de lodos durante el arranque. Al parecer, la formación de granos de tipo bacilar es el resultado de un incremento en la densidad, lo cual puede ser generado por el tiempo que han sido retenido los lodos de siembra.

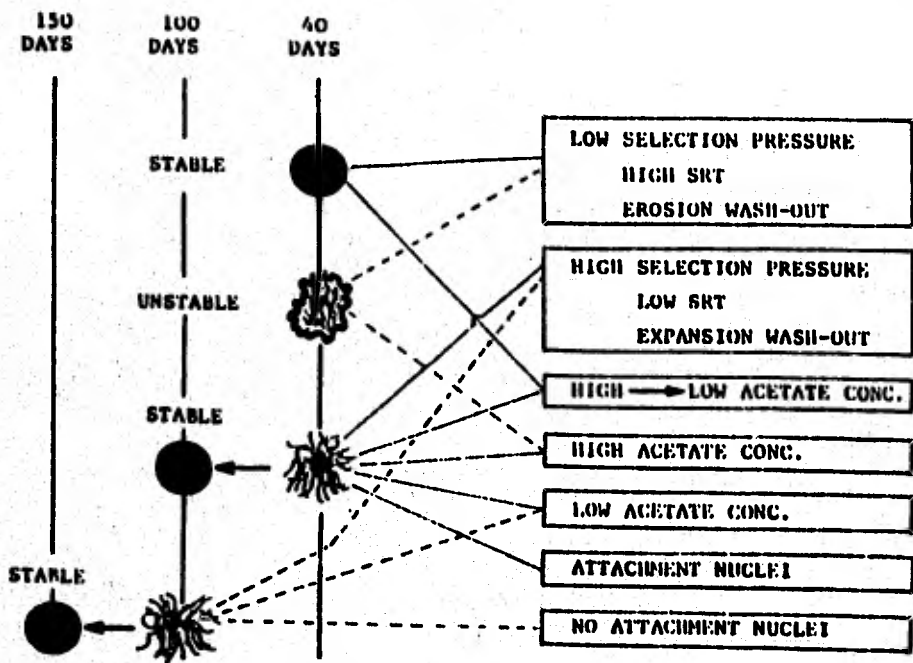
#### 2.3.2.3 Teoría de Hulshoff.

Hulshoff Pol (1988) considera que la formación de lodos en los reactores UASB se origina principalmente del crecimiento bacterial<sup>10</sup> ligado a un número limitado de núcleos en crecimiento. Estos pueden consistir de materiales de soporte orgánicos e inorgánicos, así como también de agregados bacteriales presentes en el lodo de siembra. Como las dimensiones de agregados y los grosores son limitados (por ejemplo, dictado por las fuerzas de unión internas y el grado de mezclado) en un cierto tiempo, una nueva generación de núcleos crece (núcleos secundarios), los cuales serán generados de la unión de películas y fragmentos de granos rotos. Estos núcleos crecerán en tamaño y eventualmente producirán una nueva generación. La primera generación consiste de agregados relativamente voluminosos, los cuales gradualmente se vuelven densos, dado que el crecimiento bacterial no sólo se limita al crecimiento externo del grano, sino también a la parte

interna de los agregados, ya que en este caso:

- la limitación de difusión del sustrato es menor que con agregados bacteriales densos.
- el sustrato puede penetrar profundamente en los agregados ya que la actividad bacteriana volumétrica del grano es baja. La disminución de la concentración del sustrato en el grano con respecto a la distancia (radio), está relacionada con la densidad de los agregados.

Finalmente Collieran (1988) propone un esquema donde sintetiza las teorías propuestas anteriormente por los tres autores (de Zeeuw, Hulshoff-Pol y Weigant) sobre los factores primarios que gobiernan la formación de granos estables con buena sedimentación Fig.2.2 En todos estos estudios se utilizaron mezclas de ácidos grasos volátiles como sustrato y la formación de granos fue interpretada casi exclusivamente en términos del papel que juegan las bacterias metanogénicas acetoclásticas por ejemplo Methanotrix y Methanosarcina. El crecimiento de los granos en aguas de desecho que contienen azúcares implica también la participación de una variedad de bacterias acidogénicas y acetogénicas, pero la naturaleza de su relación y su importancia en el fenómeno de la granulación aún no es clara. Dubourguier y colaboradores (1988) observaron que los granos pequeños, presumiblemente jóvenes tenían altas relaciones de actividad acidogénica con respecto a la acetoclástica; así, los granos grandes probablemente estén relacionados con las especies acidogénicas en las primeras etapas de la granulación. Guiot (1988) también reporta cambios complejos en las relaciones de las actividades acidogénicas, propionotróficas y acetoclásticas con incrementos en el tamaño de los granos. Los incrementos en tamaño fueron asociados con grandes aumentos en las actividades acetoclásticas y propionotróficas, mientras el incremento en la actividad acidogénica fue significativamente menor. A este respecto, Guyot et al (1990) mostraron que el aumento en biomasa de granos alimentados con una mezcla de acetato y propionato durante 11 meses, era debido al crecimiento de las bacterias utilizadoras del propionato.



**Figure 2.2** Suggested factors governing the granulation of anaerobic sludge (courtesy of W. de Zeeuw, L. Hulshoff Pol and W. Wiegant).

#### 2.3.2.4 Teoría de Sam-Soon (1987)

Un requerimiento básico para la formación de granos es una presión parcial de hidrógeno alta, por consiguiente no sólo el sustrato debe producir  $H_2$  en la fermentación, sino también la presión parcial de  $H_2$  debe llegar a ser alta (mayor de  $10^{-4}$  atm). En influentes donde los sustratos no producen hidrógeno (como por ejemplo el acetato), la granulación es pobre o puede llegar a detenerse si la presión parcial de hidrógeno es baja (por ejemplo con propionato y lípidos), o cuando los sistemas de sintrofia por sí mismos promueven presiones parciales bajas de  $H_2$ .

Estos autores consideran que la granulación en sistemas anaerobios se debe a la acción de organismos metanogénicos del tipo de Methanobacterium Strain AZ (M. Strain AZ). Este organismo utiliza hidrógeno como única fuente de energía, puede producir todos sus aminoácidos excepto cisteína, la cual debe ser suministrada por fuentes externas. Con una deficiencia de cisteína en un ambiente de presión parcial alta de hidrógeno y nitrógeno amoniacal disponible, la síntesis protoplásmica está limitada, de manera que el exceso de aminoácidos producidos son excretados como polipéptidos extracelulares. Los aniones poliméricos de varios organismos anaerobios juntos forman los granos, además de que probablemente existan otros organismos metanogénicos que utilizan hidrógeno de manera similar a M. Strain AZ y contribuyan a la formación del grano. Esto lo proponen después de haber realizado estudios en reactores UASB con efluentes del proceso de jugo de manzana y con glucosa, en ambos experimentos midieron los productos de fermentación a lo largo del reactor y observaron la formación de 3 zonas:

##### 1) Zona activa baja

En esta zona los ácidos acético y propiónico alcanzan su máxima concentración; la concentración de nitrógeno amoniacal se hace mínima y la concentración de nitrógeno orgánico incrementa al máximo, el crecimiento de los granos se realiza en esta zona con un valor de  $Y$  de aproximadamente 0.36 mgSSV/mgDQO



utilizado.

2) Zona activa superior

En donde la concentración de DQO se reduce a un mínimo; la concentraciones de los ácidos acético y propiónico decrecen cerca de cero y la concentración de nitrógeno amoniacal permanece casi constante y el nitrógeno orgánico decrece a un mínimo. Es en esta zona donde se realiza la ruptura de los granos.

3) Zona inactiva superior

En esta zona no se observan reacciones biocinéticas excepto en los granos rotos, los fragmentos son depositados en el manto suspendido de la cama.

En la zona activa baja el incremento en la concentración de ácido propiónico indica que la tasa de generación y utilización es tal que una alta presión de hidrógeno es mantenida. Esta zona termina donde la presión parcial de  $H_2$  cae de manera que es posible que las acetógenas puedan convertir el ácido propiónico en ácido acético, hidrógeno y  $CO_2$ . En la zona activa baja no se dan las condiciones del proceso de fermentación normal por lo que Sam Soon y colaboradores propusieron la teoría explicada en un inicio.

De acuerdo a lo antes expuesto son varias las teorías propuestas para explicar el fenómeno de la granulación, dado que si se entiende la microbiología del proceso la aplicación del sistema UASB se extenderá aún más, ya que, hasta el momento existen ciertas limitaciones para su tecnología como no formarse lodo granular en algunas aguas de desecho o cambiar las propiedades de este lodo en la transición de una agua de desecho en otra, o a la presencia de sustancias tóxicas en el influente. De tal manera que si se logra esto se tendrá un mejor control y se superaran algunas de las limitaciones lograndose desarrollar estrategias de control basadas en la microbiología de las comunidades metanogénicas. Sin embargo esto no resulta fácil ya que se deben considerar todos los grupos bacterianos involucrados estrechamente. De esta manera, el presente trabajo considera

parámetros operacionales como tiempo de retención hidráulica y carga orgánica, así como diferentes sustratos y el efecto del del sulfato ferroso, para tratar de relacionarlos con la formación de granos y las teorías expuestas. Proponiéndose el siguiente plan experimental:

NUMERO DE REACTOR	1	2	3	4	5	6	7	8
TIEMPO DE RETENCION HIDRAULICA (h)	6	12	24	12	12	12	12	12
CARGA ORGANICA INICIAL (g DQO/ g SSV . d)	1	1	1	0.5	5.0	1	3.2	3.2
SUSTRATO	G	G	G	G	G	A	AGV	AGV*

G:glucosa; A: albúmina de huevo; AGV: Ácidos grasos volátiles;  
AGV\*:ácidos grasos volátiles con FeSO<sub>4</sub>.

### 3. MATERIAL Y METODO

#### 3.1 DESCRIPCION DE LOS REACTORES.

El experimento se inició con el montaje de 7 reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (Uplow Anaerobic Sludge Blanket, UASB), de alimentación continua, contruídos de tubo de vidrio de un diámetro interno de 9.6 cm, con una altura de 36 cm, y un volúmen útil de 2.3 litros, instalados en un cuarto de temperatura controlada a 30 °C. Se presenta un esquema del reactor tipo en la Fig. 3.1

En la base del reactor, de forma cónica era alimentado el flujo ascendente por medio de bombas peristálticas "masterflex". El medio de alimentación procedía de una cámara fría contigua al cuarto de temperatura controlada.

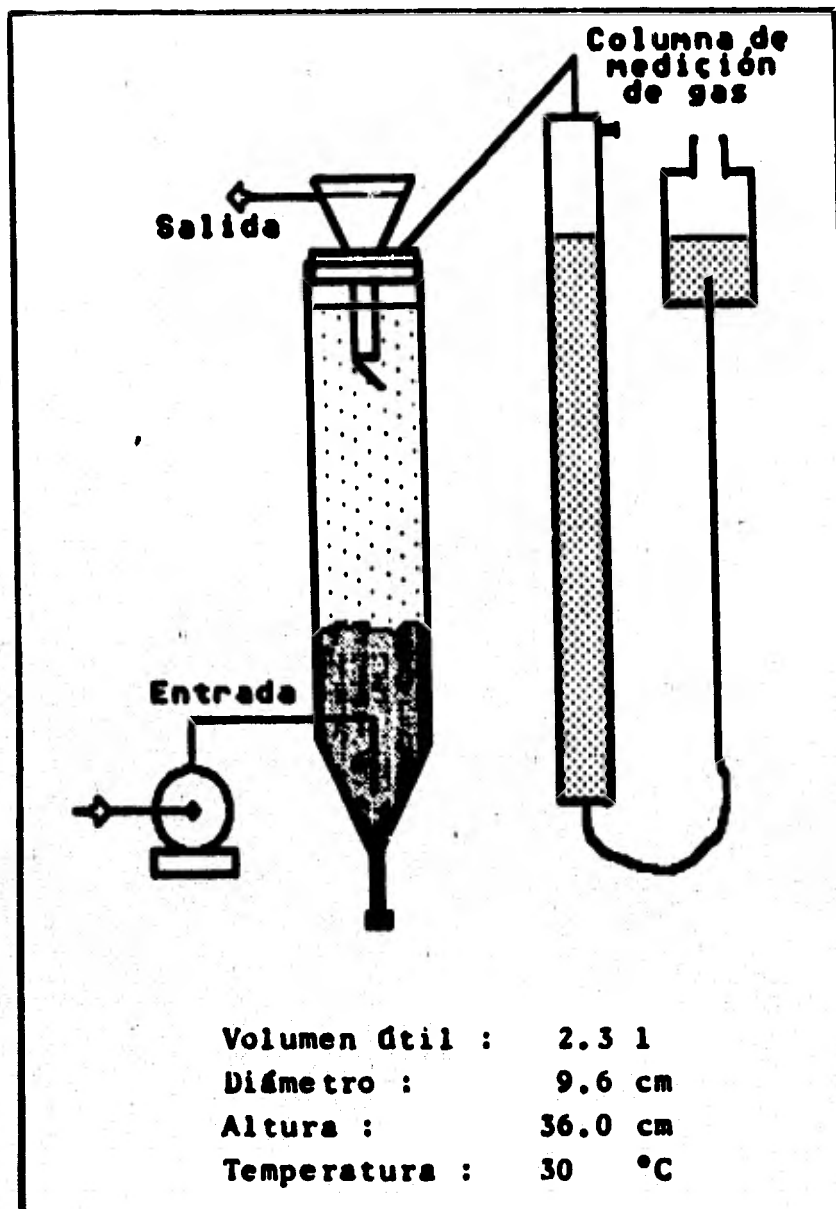
En la parte superior del reactor se encontraba un dispositivo que funcionaba como separador de fases líquida-sólida-gaseosa. El gas era recuperado en una columna de medición de gas. Esta columna contenía una solución coloreada con rojo de metilo, preparada con agua corriente acidificada a pH menor de 4 y saturada con NaCl (400 g/l), cuya función era reducir la solubilidad de los gases y facilitar la cuantificación de biogás.

En la parte superior lateral de cada columna de medición se localizaba una entrada sellada con un septum, para la toma de muestras de gas. Las columnas estaban a su vez conectadas en la parte inferior con un recipiente de plástico, cuyas funciones eran regular la presión interna del sistema y recibir la solución salina de las columnas, conforme esta era desplazada por el volúmen de gas producido.

La evacuación de las aguas tratadas se realizaba a través de la parte superior del reactor para dar directamente al drenaje.

#### 3.2 CONDICIONES DE INOCULACION Y OPERACION

Los reactores se alimentaron con agua residual sintética preparada con agua corriente 2 o 3 veces por semana. Las condiciones de operación para cada reactor se detallan en la



**Fig. 3.1** DIAGRAMA ESQUEMATICO DEL REACTOR UASB EMPLEADO EN EL ESTUDIO

**Composición de la fracción mineral del agua residual sintética**

*(Adaptado de Boone, 1984 y de Kennedy y Droste, 1985)*

COMPUESTO	Concentración final en el medio de alimentación * (mg/l)	Concentración en solución stock (g/l)	sol. stock medio final (ml/l)	OBSERVACIONES
$\text{NaHCO}_3$	600.00	60.000	10	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100.00	100.000		Su preparación se hace separadamente, para evitar precipitaciones.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200.00	200.000		
$\text{ZnCl}_2$	1.00	1.000	1	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.00	1.000		
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.00	1.000		
<b>Solución UASB</b>				Se preparan en una misma solución (UASB).
$\text{NH}_4\text{Cl}$	660.00	66.000		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	250.00	25.000		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	130.00	13.000		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	100.00	10.000	10	
$(\text{NH}_4)_6\text{Mg}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10.00	1.000		
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.005		
$\text{AlKSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.10	0.001		
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.20	0.002		

\* El agua de dilución, es agua ría la llave.

**Tabla 3.3**  
**Condiciones de alimentación y operación**  
**de los reactores**

Reactor Nº	SUSTRATO (g/l)	TRH (h)	C.O (gDQO/gSSV.d)	DQO alim. (mg/l)	
1	Glucosa	0.83	6	1.0	859
2	Glucosa	1.66	12	1.0	1,717
3	Glucosa	3.30	24	1.0	3,435
4	Glucosa	0.83	12	0.5	859
5	Glucosa	8.26	12	5.0	8,587
6	Albúmina de huevo	1.47	12	1.0	1,717
7	Acetato **	5.00			
	A. propiónico	1.00*	12	3.2	5,650
	A. butírico	1.00*			
8	Acetato **	5.00			
	A. propiónico	1.00*	12	3.2	5,650
	A. butírico	1.00*			
	Fe SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.50			

\* ml/l

\*\* Como sal de sodio trihidratada.

Tabla 3.1. Por otra parte la composición mineral del medio se encuentra en la Tabla 3.2

Los reactores fueron inoculados con 660 ml de lodos activados adaptados a anaerobiosis, procedentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UNAM. Estos lodos fueron llevados a un volumen total dentro de los reactores de 3 litros con agua del efluente del reactor UASB de la UAM-Iztapalapa; este tipo de agua era la más indicada por estar libre de oxígeno.

Se hizo un estudio preliminar para caracterizar el inóculo, obteniéndose los siguientes valores:

<u>SST</u> :	15.5 g/l
<u>SSV</u> :	10.3 g/l
<u>IVL</u> :	86.8 ml/g
<u>BMA</u> :	$8 \times 10^8$ bacterias/gSSV
<u>BMH</u> :	$8 \times 10^{10}$ bacterias/gSSV
<u>OP</u> :	$9 \times 10^8$ bacterias/gSSV

SST: Sólidos Suspendidos Totales; SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles; IVL: Índice Volumétrico de Lodos; BMA: Bacterias Metanogénicas Acetoclásticas; BMH: Bacterias Metanogénicas Hidrogenofílicas; OP: Bacterias OHPA utilizadoras de Propionato.

### 3.3 PARAMETROS DE CONTROL

#### 3.3.1 A nivel de entrada y salida.

Los parámetros seleccionados para efectuar la operación de los reactores se eligieron tomando en cuenta su importancia en el control de este tipo de procesos y su utilidad al momento de analizar los sistemas. Los análisis se efectuaron a nivel de entrada y salida de cada reactor durante el proceso de operación, la Tabla 3.4 enlista los parámetros registrados, la frecuencia y el método utilizado.

**TABLA 3.4**  
**PARAMETROS REGISTRADOS EN EL INFLUENTE Y EFLUENTE**

PARAMETRO	FRECUENCIA (veces por semana)	METODO
Potencial hidrógeno	3 (I/E/L)	-
Alcalinidad	3 (I/E)	M. Stándar
Demanda Química de Oxígeno	2 (I/E)	"
Sólidos Totales	2 (E)	"
Sólidos Totales Fijos	2 (E)	"
Sólidos Totales Volátiles	2 (E)	"
Sólidos Suspendidos Totales	2 (E)	"
Sólidos Suspendidos Fijos	2 (E)	"
Sólidos Susp. Volátiles	2 (E)	"
Acidos Grasos Volátiles	1 (E)	Cromatografía
Producción de gas	2 (E)	Desplazamiento vol.
Metano en el gas	1 (G)	Cromatografía

I: Influyente; E: Efluente; G: Gas; L: Lodos.

### 3.3.2 A nivel de lodos.

Las pruebas analíticas para los lodos se pueden dividir en tres grupos:

- MICROBIOLOGICAS:
  - a) Número Más Probable
  - b) Actividades Metabólicas
- BIOQUIMICAS:
  - a) Azúcares Totales
  - b) Proteínas
- FISICOQUIMICAS
  - a) Índice Volumétrico de Lodos
  - b) Sólidos Suspendidos Totales y Volátiles
  - c) Granulometría.

Se efectuaron 5 muestreos cada 45 días, de acuerdo al diagrama de la Fig. 3.2. Como se podrá observar, se tomaba una muestra de 45 ml de la cama de lodos de cada reactor. Esta se subdividía en 2



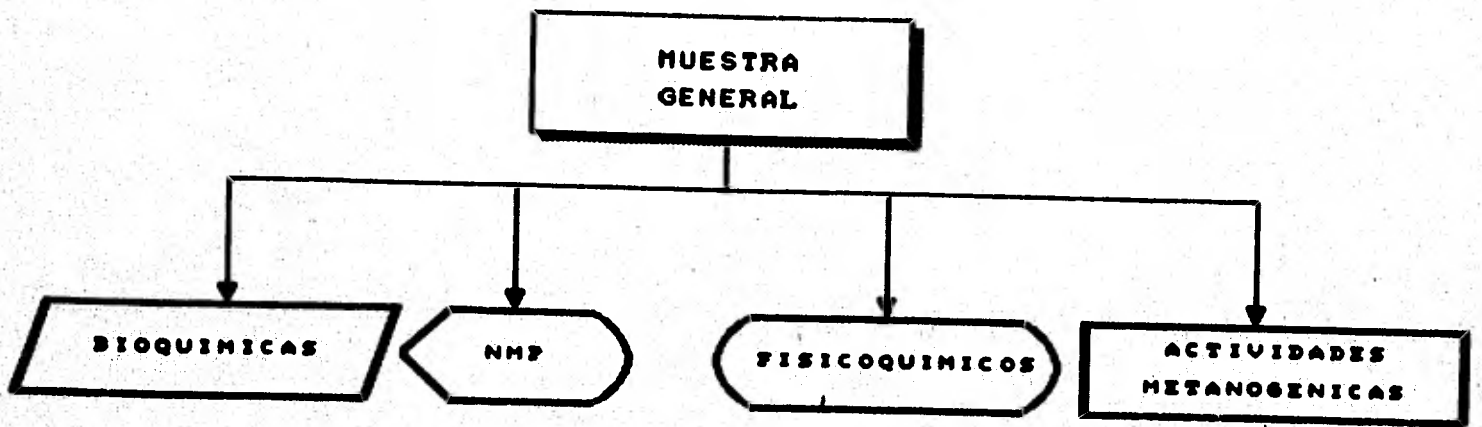


Fig. 3,2 Diagrama de Flujo del Muestreo

partes; la primera de ellas se destinaba para la determinación del número más probable (NMP) y para las pruebas bioquímicas, la segunda para las pruebas fisicoquímicas y actividades metanogénicas. Los lodos de la primera fracción se maceraban con un potter (macerador manual de tejidos), dentro de la cámara anaerobia (marca Coy Laboratory Products Inc, con una atmósfera de 90-95% de N<sub>2</sub> y 5-10% de H<sub>2</sub>).

### 3.3.2.1 Número más probable (NMP)

El NMP permitió conocer cuantitativamente las concentraciones de bacterias en los lodos por grupos de bacterias acetoclásticas, hidrogenofílicas y las consumidoras de propionato y butirato. Se utilizaron las técnicas de Hungate (1969) y Balch et al. (1976), para la preparación de los medios de cultivo, la transferencia de sustratos y las inoculaciones.

La cuantificación de bacterias se realizó usando la técnica del número más probable (NMP), con cinco tubos, detectándose el metano producido (García et al., 1982). Los medios de Balch et al. (1979) fueron utilizados para el cultivo de las bacterias metanogénicas. Para las bacterias OHPA (obligate producing acetogenic bacteria) (Mc Inerney y Bryant, 1981) se emplearon los mismos medios, excepto que los sulfatos fueron cambiados por cloruros. El rango de diluciones utilizado fue el siguiente:

- Bac. Metanogénicas Acetoclásticas (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-10</sup>)
- Bac. Metanogénicas Hidrogenofílicas (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-11</sup>)
- Bac. OHPA que utilizan el propionato (10<sup>-3</sup> a 10<sup>-8</sup>)
- Bac. OHPA que utilizan el butirato (10<sup>-8</sup> a 10<sup>-9</sup>)

El tiempo de incubación fue de 3 semanas a un mes, después del cual se tomaron las muestras de gas de los tubos y se analizaban con un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama (FID) para determinar la presencia de metano.

### 3.3.2.2 Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron siete días después, descongelando la muestra paulatinamente. Los lodos descongelados eran homogenizados por medio de un vértex, y se tomaba 1 ml de lodos en un tubo eppendorf y centrifugaba a 13 500 rpm, durante 20 minutos, haciéndose 2 lavados con agua destilada. Los lodos lavados se diluían 1/100 con agua destilada, y se realizaban las pruebas correspondientes.

El método colorimétrico para la determinación de azúcares totales fue el propuesto por Dubois (1956) usando glucosa como estándar, realizándose por triplicado.

Las proteínas se determinaron mediante el método de Lowry (1951) y en ocasiones por el método del colorante azul de Coomassie (Bradford, 1976), por duplicado usando seroalbúmina bovina como estándar.

### 3.3.2.3 Actividades Metanogénicas

Como primer paso se dejó la muestra (8 ml de lodos) sin alimentar durante 24 horas con el propósito de que las bacterias terminaran de consumir los sustratos residuales. En este lapso, la muestra permaneció dentro de la cámara anaerobia bajo vacío, de manera que los gases producidos pudieran escapar más fácilmente.

A 4 ml de estos lodos se les agregó posteriormente 16 ml de medio de cultivo anaerobios sin sustrato (Anexo 1) en frascos de 40 ml (de tipo antibiótico) y fueron cerrados con un tapón grueso de hule. Se utilizaron muestras por duplicado.

Al tiempo cero se agregó una cantidad determinada de sustrato (acetato, propionato + butirato) a concentración de 10 mM para cada uno; a esta concentración los sistemas microbianos están en saturación (Guyot, 1988). Después de cada 30 minutos se tomaron muestras del sobrenadante. El tiempo en el que se siguió el experimento fue de 6 horas, establecido de acuerdo a otras investigaciones (Guyot, 1989, 1990). Dada la gran cantidad de

muestras obtenidas con los 7 reactores, estas fueron acidificadas, congeladas y almacenadas para su posterior procesamiento.

Los AGV se analizaron por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID) utilizando una columna de acero inoxidable 1/2" y 3 m de longitud empacada con Porapak QS. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Temperatura del detector	230
Temperatura del inyector	210
Temperatura de la columna	200
Atenuador	5
Volumen de muestra inyectada	2 ul.

#### 3.3.2.4 Pruebas Fisicoquímicas

La medición de los sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) fueron determinados por duplicado de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 1980).

La técnica del índice volumétrico de lodos (IVL) fue modificada utilizando 20 ml de lodos concentrados y llevados a 60 ml con agua destilada; la mezcla se homogenizó y se dejó decantar durante 30 minutos, en una probeta de 100 ml, la prueba se determinó por duplicado. El IVL se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{IVL} = \frac{\text{volumen ocupado por los lodos después de 30' (ml)}}{\text{contenido de sólidos suspendidos en la probeta (g)}}$$

Para el estudio de la distribución del tamaño de las partículas se aplicó la técnica seguida por Mahoney *et al.* (1987). Se midió el diámetro de 100 granos por muestra, con la ayuda de un microscopio binocular (American Optical modelo 1138), el cual contenía un ocular graduado en micras (Whipple). Los valores fueron tratados estadísticamente y se presentan en las tablas y gráficas correspondientes.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 REACTORES ALIMENTADOS CON GLUCOSA

#### 4.1.1 Influencia del TRH

La Tabla 4.1.1 muestra la caracterización fisicoquímica del inóculo y de diferentes muestreos de lodos en los 3 primeros reactores, comparándose el contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV), la moda y el diámetro promedio del grano así como el índice volumétrico de lodos (IVL). De acuerdo al plan de trabajo establecido anteriormente, los 3 reactores fueron alimentados con el mismo sustrato (glucosa), a la misma carga orgánica (1 Kg DQO/Kg SSV .d) pero a diferentes tiempos de retención hidráulica (TRH).

##### 4.1.1.1 Índice volumétrico y producción de biomasa.

De manera general, en la Fig. 4.1.1 se aprecia que en todos los reactores disminuye el valor del IVL conforme transcurre el tiempo, en el primer de ellos, el valor varió de 81.3 a 22.0 ml/g, en el segundo de 62.2 a 28.9 ml/g y en el tercero de 80.8 a 30.8 ml/g.

Dado que se parte del mismo inóculo, las características son en un inicio las mismas en todos los reactores. Posteriormente las 3 curvas de IVL siguen el mismo tipo de evolución, para alcanzar valores similares al día 180. Cabe señalar que el reactor 3 presenta una cinética de evolución del IVL más lenta que los otros 2 reactores.

Este comportamiento coincide con los tiempos de arranque (considerado como el tiempo requerido para alcanzar la fase estable de operación) para cada reactor (Tabla 4.1.2): (i) el reactor con 12 h de TRH (Reactor 2) fué el que tuvo un arranque

mas rápido (75 días), paralelamente en él empezó a seleccionarse un lodo con buena sedimentación; (ii) el reactor con 6 h de TRH (Reactor 1) requirió de 85 días para arrancar y se nota en la Fig. 4.1.1 que la mayor variación del IVL se tuvo en este tiempo. (iii) Por último, el tiempo de arranque para el Reactor 3 (145 días, TRH 24 h) fue el más largo, de la misma manera se nota en la Fig. 4.1.1 que los lodos de este reactor evolucionaron más lentamente y tardaron un tiempo de 180 días, para lograr sus valores mínimos de IVL.

De acuerdo con Hulshoff Pol et al (1988) y Stronach et al (1986), los parámetros operacionales durante el arranque que van a influir en la selección del tipo de lodo dentro del reactor son la carga orgánica y la velocidad ascensional del fluido. El efecto de esta última se ve aumentado por la producción de gas, dependiente de la carga orgánica; así, al sumarse la velocidad ascensional del influente con la del gas producido, se va a ocasionar el lavado de lodos floculares y la selección de lodos con buena sedimentación. Considerando lo anterior, en este experimento, donde se mantuvo constante la carga orgánica, las diferencias que se alcanzan en los valores finales del IVL y en la cinéticas (Tabla 4.1.2) se pueden atribuir al TRH aplicado en cada caso, es decir a la velocidad ascensional ( $R_1$  TRH= 6 h, vel. asc. 0.05 m/h;  $R_2$  TRH= 12 h, vel. asc. 0.02 m/h;  $R_3$  TRH= 24 h, vel. asc. 0.01 m/h), sin ser muy notoria la variación de los valores cuando los reactores alcanzan su equilibrio. Se puede observar que se obtuvieron más rápido lodos con un buen IVL en los reactores de 6 y 12 h de TRH (Tabla 4.1.2) y que la diferencia es notable, con respecto de la rapidez de su evolución, en el reactor de 24 h de TRH. Así, se confirma la influencia de la velocidad ascensional sobre la formación de lodos, pero además se manifiesta un efecto claro sobre la rapidez de obtención de lodos con buenas características de sedimentación. Sin embargo, esta rapidez no se incrementó sensiblemente al pasar de 0.02 m/h ( $R_2$ ) a 0.05 m/h ( $R_1$ ). Cabe también insistir sobre la relación que se observó entre el tiempo de arranque y la cinética de formación de estos lodos: al lograr una evolución más rápida,

TABLA 4.11 CARACTERISITICAS FISICAS DE LOS LODOS.

			Inoculo	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
TMR (horas)				6	12	24
v asc (m/h)				0.05	0.02	0.01
Tiempo (0 días)	IVL	(ml/g)	86.8			
	SSV	(t)	66.0			
	GRAN	(mm)	0.40 s-0.20			
Primer Muestreo (45 días)	IVL	(ml/g)		81.3	66.2	80.8
	SSV	(t)		69.0	75.0	69.0
	GRAN	(mm)		0.44 s-0.24	0.44 s-0.20	0.45 s-0.19
Segundo Muestreo (90 días)	IVL	(ml/g)		30.5	32.3	49.9
	SSV	(t)		62.0	66.0	72.0
	GRAN	(mm)		0.59 s-0.26	0.66 s-0.40	0.65 s-0.30
Tercer Muestreo (135 días)	IVL	(ml/g)		28.6	38.8	37.1
	SSV	(t)		74.0	73.0	71.0
	GRAN	(mm)		0.67 s-0.28	0.75 s-0.30	0.68 s-0.26
Cuarto Muestreo (180 días)	IVL	(ml/g)		25.3	22.7	27.5
	SSV	(t)		72.0	73.0	81.0
	GRAN	(mm)		2.0 s-0.59	1.3 s-0.39	1.3 s-0.50
Quinto Muestreo (225 días)	IVL	(ml/g)		22.0	28.9	30.8
	SSV	(t)		71.0	78.0	86.0
	GRAN	(mm)		2.0 s-0.45	1.7 s-0.50	1.5 s-0.32

EVOLUCION DEL INDICE VOLUMETRICO DE LODOS (IUL)

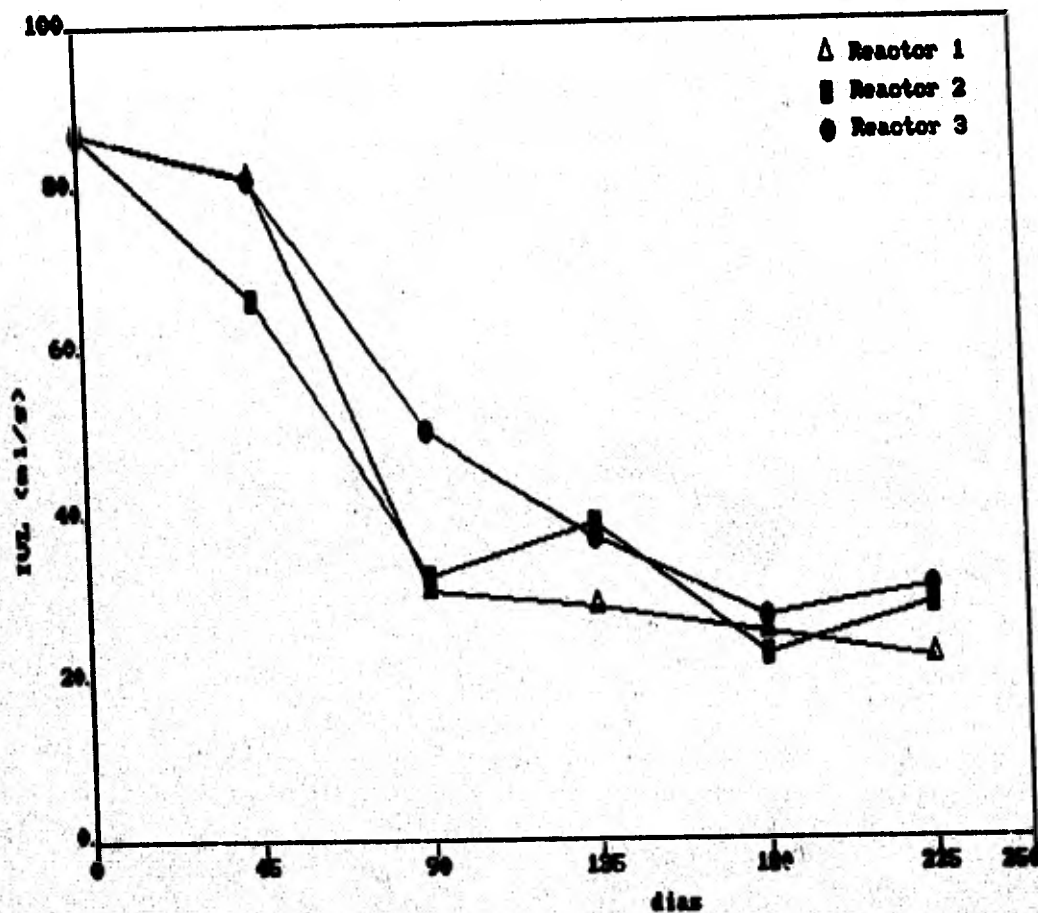


Fig. 4.1.1 Evolución del índice volumétrico de lodos en los reactores 1, 2 y 3.



se obtiene un tiempo de arranque más bajo, sin olvidar que esto depende también del tiempo necesario para que se establezcan buenas actividades microbianas.

En resumen, se puede recomendar un arranque de un reactor UASB alimentado con glucosa, en el rango de carga orgánica utilizado en este experimento. Los valores de velocidad ascensional aplicados fueron relativamente bajos. Para realmente identificar el efecto de este parámetro sobre la formación de lodos granulares convendría, investigar el efecto de diferentes velocidades ascensionales para un mismo TRH, lo que se lograría con diferentes geometrías del reactor.

Para conocer cualitativamente la evolución de la biomasa dentro de la cama de lodos de los 3 reactores se determinó la fracción (en %) de sólidos suspendidos volátiles en los SST. Como se observa en la Tabla 4.1.1 en general esta se incrementó a lo largo del estudio pasando en el reactor #1 de 66 a 71%, en el reactor reactor #2 entre 66 y 78%, y en el caso del reactor #3 de 66 a 86%. En la fig 4.1.2 se observa que es hasta el día 180 cuando empieza a haber diferencias más marcadas entre los lodos de los 3 reactores. Al final del experimento el % más alto de SSV se obtuvo en el reactor de 24 h de TRH. Este porcentaje es menor conforme disminuye el TRH, lo que se relaciona aparentemente con la observación hecha con los valores de IVL. Según parece, al disminuir el TRH se obtuvieron lodos con el más bajo contenido de SSV, y más bajo IVL. Por otra parte, hay que recordar que las muestras de SSV en este experimento procedían de la parte baja de la cama de lodos de los reactores. Al comparar los porcentajes encontrados al final del experimento con muestras homogenizadas de la totalidad de los lodos de los reactores se obtienen los siguientes valores de la Tabla 4.1.3.

SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES (SSV)

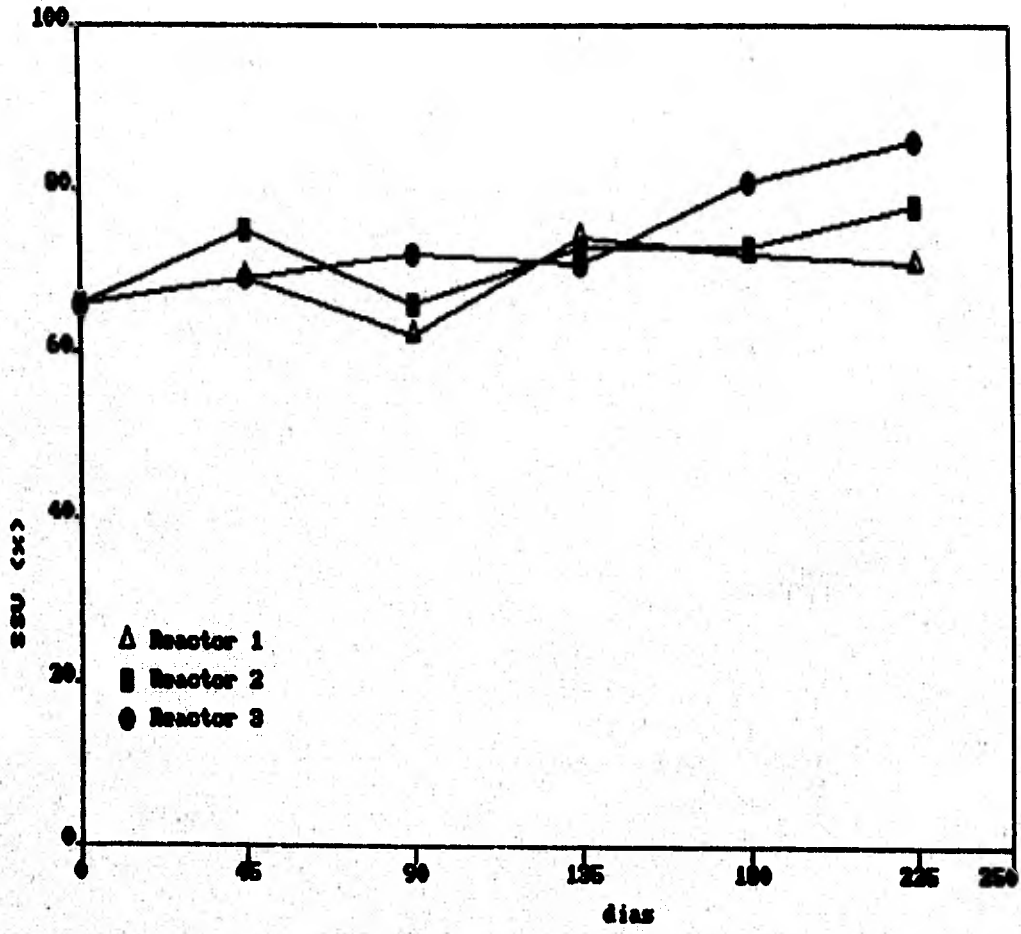


Fig. 4.1.2 Evolución de los SSV en los SST reactores 1,2 y 3

TABLA 4.1.3  
PORCENTAJES DE SSV EN 2 MUESTRAS DIFERENTES DE LODOS

Reactor	SSV (parte baja de la cama) %	SSV (del homogenizado) %
1	71	78
2	78	77
3	86	84

Como se puede observar, las diferencias encontradas entre los dos tipos de muestras son mínimas para el reactor 2 y 3. No así para el reactor 1, cuya diferencia podría deberse a una mayor acumulación de minerales en la parte baja de este reactor a causa de una mayor entrada de minerales. Esto se debe a que al aumentar el caudal (8 l/d, 6 h TRH), no se modificó la concentración en sales minerales del agua sintética, lo que provocó el incremento en la carga mineral diaria. Por otra parte, analizando el contenido de biomasa al inicio del experimento y al final se tienen los datos de la Tabla 4.1.4

TABLA 4.1.4  
COMPARACION ENTRE LA BIOMASA TOTAL (SSV Total) EN LOS REACTORES. Cantidad total de inóculo al tiempo cero 6.87 g.

Reactor	TRH (h)	biomasa final (g)	Incremento biomasa (%)
1	6	49	613
2	12	15	118
3	24	10	45

Como se puede observar, el orden de la mayor producción de lodos es inverso al aumento del TRH. De acuerdo con esto, podría pensarse que a TRH bajos se favoreció la producción de lodos. Sin embargo, de alguna manera el mayor contenido de minerales, principalmente de nitrógeno, pudo favorecer el crecimiento celular en el reactor 1, ya que este elemento se encontraba en exceso, de acuerdo con la relación DQO:N ( $R_1$  de 100:26,  $R_2$  de 100:13,  $R_3$  de 100:7) Siendo la relación comunmente aplicada de 100:2.

La Tabla 4.1.5 muestra los coeficientes de rendimiento de biomasa  $Y$  para cada reactor, así como la relación DQO:N alimentadas.

Reactor	TRH (h)	Relación DQO:N	$Y$ Kg <u>SSV</u> Kg DQO rem
1	6	100:26	0.28
2	12	100:13	0.14
3	24	100:7	0.17

Nuevamente se encuentra que los valores más altos corresponden al reactor 1 en tanto el reactor 2 y 3 tienen valores cercanos entre ellos, sin tener correspondencia directa con la concentración de nitrógeno suministrado. Dado que el cálculo de estos valores fue hecho de manera indirecta (Lara, 1990) se podría pensar en posibles errores con respecto a las  $Y$  encontradas; de cualquier manera, es clara la diferencia presentada en el reactor 1.

En un estudio realizado por Sam-Soon y colaboradores (1988) en un reactor UASB alimentado con glucosa, se realizó un seguimiento

de los productos de fermentación a lo largo del reactor. Se encontró que existe una separación de fases debida al flujo ascendente, con una región de presión parcial alta de hidrógeno en la parte baja del reactor, a la cual denominan zona activa baja. en esta zona, los ácidos acético y propiónico alcanzan sus concentraciones máximas, a la vez que las concentraciones de amonio libre y en sales ( $N-NH_4^+$ ) se reducen a un mínimo y la concentración de nitrógeno orgánico soluble se incrementa al máximo. Estas condiciones permiten a los autores plantear que en esta zona se encuentran organismos del tipo de Methanobacterium Strain AZ, la cual utiliza hidrógeno como única fuente de energía. Este organismo puede producir todos sus aminoácidos, para síntesis celular excepto cisteína. (Zhender y Whurmann, 1977 citado por Sam-Soon et al., 1988). Debido a la presión parcial alta de hidrógeno, M. Strain AZ es inducida a producir aminoácidos a una alta tasa, pero su crecimiento está limitado por la disponibilidad de cisteína de fuentes externas, bien sea a partir de la muerte de organismos o suplemento en la alimentación. De esta manera, la producción excesiva de aminoácidos induce al organismo a formar grandes cadenas de polipéptidos extracelulares, basándose en el hecho de que en cultivos puros este organismo acumula aminoácidos en el medio (Zhender y Wurhmann, 1977 citado por Sam-Soon et al., 1988).

Considerando lo anterior, podríamos pensar que en nuestro experimento se pudieron encontrar organismos de este tipo, ya que se logró finalmente una producción mayor de biomasa con respecto a la mayor concentración de nitrógeno alimentado en cada reactor. Sin embargo, se observa que en el reactor 1 la biomasa aumento mucho más que en relación a los otros reactores; esto podría ser consecuencia de haber alcanzado la concentración de nitrógeno a la cual se dispararía el mecanismo para una producción excesiva de exopolímeros de polipéptidos hecho que no se presentaría tan claramente con las otras concentraciones de nitrógeno.

Tratando de relacionar las Y con las reportadas por Sam-Soon et al., (1988), estos autores encuentran una Y de 0.36 mg SSV/mg

DQOrem en la zona de presión parcial alta de hidrógeno en el reactor, este valor es mayor a su vez a la reportada por Brummeler, Hulshoff Pol, Dolfing, Lettinga y Zehnder, 1985 (citado por Sam-Soon et al., 1988) en sistemas anaerobios alimentados con carbohidratos (0.03 mg SSV/mg DQO removida).

En nuestro caso, las Y encontradas son mayores también a las reportadas por Brumeler et al., 1985, pero menores a las de Sam-Soon et al., 1988 (en un 22% para el reactor 1). Aparentemente, nuestros resultados parecen apoyar la hipótesis de Sam-Soon et al. (1988).

Por otro lado, cuando se comparan los números mas probables presentes en el volumen total del reactor (NMPT) en el inóculo y al término del experimento se llega a la Tabla 4.1.6 donde se incluyen los valores de Y.

Tabla 4.1.6  
COMPARACION ENTRE LOS VALORES DE Y y NMPT

REACTOR	TRH	Y $\frac{\text{kg SSV}}{\text{kg DQO rem}}$	NMPT (bacterias/reactor) (NMP X gSSV)
Inoculo			Bac.A 5.5 X 10 <sup>9</sup> Bac.H 3.4 X 10 <sup>11</sup> Bac.Op 6.2 X 10 <sup>9</sup>
1	6	0.28	Bac.A 1.5 X 10 <sup>11</sup> Bac. H 2.4 X 10 <sup>12</sup> Bac. Op 2.4 X 10 <sup>11</sup> Bac. Ob 3.4 X 10 <sup>11</sup>
2	12	0.14	Bac. A 8.4 X 10 <sup>11</sup> Bac. H 1.2 X 10 <sup>12</sup> Bac. Op 1.1 X 10 <sup>11</sup> Bac. Ob 1.1 X 10 <sup>11</sup>
3	24	0.17	Bac. A 2.6 X 10 <sup>11</sup> Bac. H 4.9 X 10 <sup>11</sup> Bac. Op 6.9 X 10 <sup>11</sup> Bac. Ob 2.0 X 10 <sup>11</sup>

La Tabla anterior permite determinar cualitativamente que el incremento en la Y del reactor 1 no se debió a un aumento en la síntesis de bacterias metanogénicas y OHPA; si así fuera, el NMPT en este reactor hubiera sido significativamente mayor al de los reactores 2 y 3, hecho que no se observa. Por lo tanto, el alto rendimiento en biomasa del reactor 1 puede atribuirse a otros factores: i) incremento en la tasa de rendimiento de las bacterias fermentativas acidogénicas (grupo bacteriano no cuantificado en este estudio), ii) síntesis de polipeptidos dada la alta disponibilidad de nitrógeno amoniacal y ausencia de cisteína, de acuerdo con la hipótesis de San-Soon et al. (1988), o iii) ambos fenómenos.

Evolucion de la moda a lo largo del tiempo

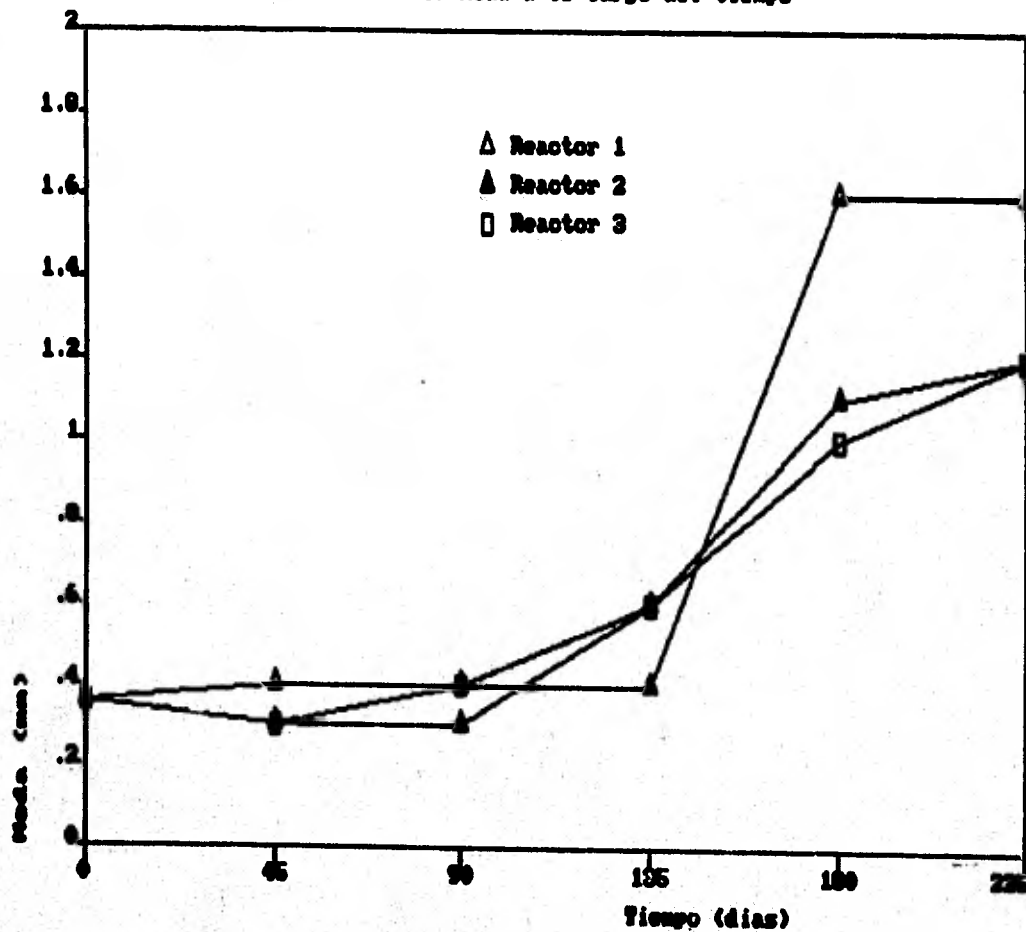


Fig. 4.1.3 Evolución de la moda en el diámetro de los lodos reactores 1, 2 y 3.



En lo que se refiere al tamaño de grano alcanzado en los reactores, si se considera la evolución de la moda a lo largo del tiempo se encuentra que el reactor 2 y 3 aumentan de diámetro a partir de los 45 días, en tanto el reactor 1 mantiene constante su diámetro (0.4 mm) hasta los 135 días después del cual se tiene un incremento súbito (1.6 mm) para mantenerse constante nuevamente a partir del día 180 hasta el final del estudio. El comportamiento de los reactores 2 y 3 es muy semejante durante todo el experimento, alcanzando los lodos del reactor 2 un diámetro de 1.3 mm y los del reactor 3 de 1.2mm (Fig 4.1.3). Si se considera el diámetro promedio (Fig.4.1.4) de los granos se encuentra también un incremento marcado a los 135 días en los 3 reactores, pero al finalizar el experimento los diámetros promedio alcanzados son mayores  $R_1 = 2.0 \text{ mm}$ ,  $s = 0.4$ ;  $R_2 = 1.7 \text{ mm}$ ,  $s = 0.5$ ;  $R_3 = 1.5 \text{ mm}$ ,  $s = 0.3$  Tabla 4.1.1.

Dado que a partir del día 135 es cuando se tiene un claro crecimiento en el diámetro de los granos en los tres reactores (4.1.4) se aplicó un análisis de varianza en el que se encontró un valor de  $F = 0.0239$ , por lo cual a un nivel de 0.5 de probabilidad se tienen diferencias significativas únicamente entre los reactores 1 y 2, lo cual demuestra que sometidos a diferentes tiempos de retención (6 hrs y 12 hrs) si influyen en el tamaño de grano en esta etapa del experimento no obstante no se presentan diferencias significativas entre los diámetros alcanzados en los reactores 1 y 3 a día 135. Al aplicar esta misma prueba de SNK (STUDENT NEWMAN KUELS) al finalizar el experimento (día 225) se encontraron diferencias significativas entre los tres reactores con respecto al tamaño de grano. De esta manera se observa que los resultados encontrados hasta el tercer muestreo sean probablemente debidas a los tiempos de arranque (Tabla 4.1.2).

Se ha visto que la formación de granos se favorece en reactores alimentados con carbohidratos, los valores de los diámetros encontrados por Harada et al (1988), fueron de 0.5 a

Tabla 4.1.2 Velocidad de Formación de los Lodos

Reactor	TRH (h)	Tiempo de Arranque (días)	Tiempo de Estabilización de los lodos (días)	Pendiente del IVL entre los días 45 y 90
1	6	85	90	-1.12
2	12	75	90	-0.75
3	24	145	180	-0.60

# GRANULOMETRIA

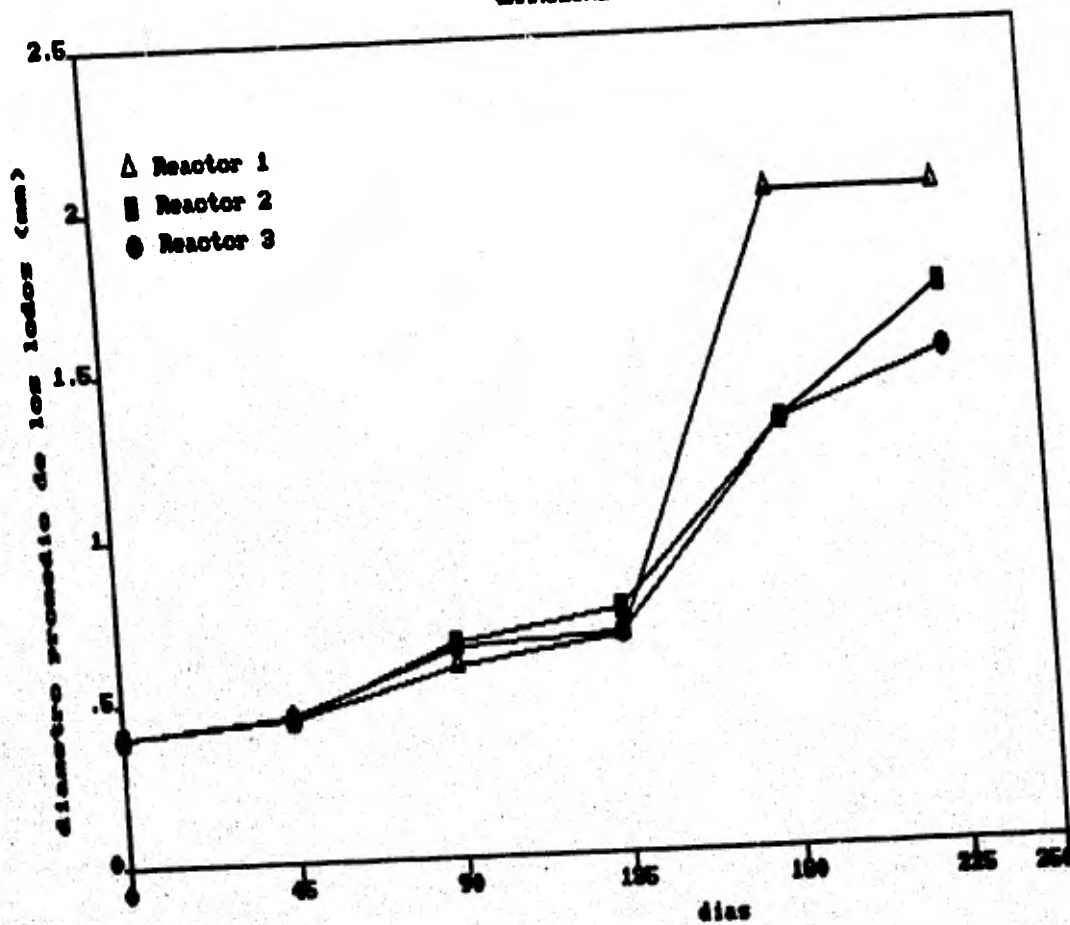


Fig. 4.1.4 Evolución del diámetro promedio del grano en los reactores 1, 2 y 3.

4.0 mm, con un valor promedio de 1.2 mm. Lo que se relaciona con los resultados encontrados en nuestro estudio, sin embargo según este mismo se da a conocer que la fuerza ligada a la velocidad ascensional juega un papel sobre la selección de la biomasa por efectos de lavado pero no sobre el diámetro de los granos.

Por otro lado podemos notar que las formas de las curvas de la Fig. 4.1.4 se parecen a aquellas del crecimiento bacterial, relacionando el incremento en el diámetros de los granos con el crecimiento bacterial, así como a la producción de exopolímeros de polipeptidos (Sam Soon et al., 1988). En esta misma Fig. 4.1.4 se muestra también como el reactor 1 (6h TRH) presenta el mayor diámetro (1.6 mm) después de 180 días de operación, y considerando que se mantuvo la misma carga orgánica en los 3 reactores, se puede pensar que con bajos TRH hay una mejor distribución del efluente combinado con una mejor difusibilidad del sustrato dentro del lodo granular, sin olvidar tomar en cuenta que se tuvieron diferencias también en las concentraciones de nitrógeno y que ya ha sido ampliamente comentado anteriormente.

Asimismo, al comparar las gráficas de la Fig. 4.1.4 con las de la Fig. 4.1.1 podemos observar dos fases principales en el fenómeno de granulación.

#### Fase 1. (0 a 135 días)

En esta fase se nota un decremento muy notable del IVL de los lodos, mientras que el diámetro promedio de los granos aumenta lentamente.

En un inició por tratarse de lodo flocular se encuentran estos con características pobres de sedimentación. Durante esta fase, los microorganismos tienen la oportunidad de colonizar los espacios vacíos dentro de la estructura de los lodos aumentando su densidad e incrementando ligeramente su tamaño. De la misma manera los esfuerzos cortantes generados por el flujo ascendente del

líquido y el gas producido provocan erosión en las capas externas de los lodos, favoreciendo su compactación.

#### Fase 2 (135 a 225 días)

En esta etapa se observa en forma indirecta que la gravedad específica de los granos no varía notablemente, ya que el IVL parece estabilizado (Fig. 4.1.1). En este tiempo, los espacios ya han sido llenados y la biomasa bacteriana crece hacia la superficie de los granos, lo cual trae como resultado el incremento en su diámetro, el cual se distribuye tal como lo hemos comentado anteriormente ( $R =$  reactor).  $\phi$  lodos  $R_1 > \phi$  lodos  $R_2 > \phi$  lodos  $R_3$  y del IVL final siga este orden:  $IVL$  lodos  $R_1 < IVL$  lodos  $R_2 < IVL$  lodos  $R_3$ . Por otra parte el más corto TRH y el mayor contenido de nitrógeno en la alimentación fueron determinantes para producir un aumento marcado en el diámetro de los granos del  $R_1$ . Asimismo, se presenta una cierta concordancia entre los coeficientes de rendimiento ( $Y$ ) y el tamaño de grano alcanzado por cada uno de los reactores (Tabla 4.1.5 y Tabla 4.1.1). Finalmente se observa una tendencia hacia la estabilización de diámetro. Es claro que la disminución del IVL no se relaciona directamente con la evolución del tamaño de grano.

#### 4.1.1.2 EVOLUCION DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS (Reactores 1, 2 y 3)

En la Tabla 4.1.7, se presentan los números de bacterias por gramo de sólidos suspendidos volátiles encontrados para los 3 reactores durante el experimento.

El contenido de bacterias metanogénicas acetoclásticas en el inóculo fue  $8 \times 10^8$  bacterias/g SSV y  $5.0 \times 10^{10}$  bacterias/gSSV para las hidrogenofílicas, así también se encontraron  $9 \times 10^8$  bacterias/gSSV para las bacterias consumidoras de propionato.

Al final del experimento se observa que hay un aumento de en el número de bacterias acetoclásticas metanogénicas en los 3 reactores, ya que los valores encontrados fueron  $3 \times 10^9$ ,  $5.6 \times 10^{10}$  y  $2.6 \times 10^9$  células/g SSV para los reactores 1, 2 y 3 respectivamente.

En la Fig. 4.1.5 se observa como inicialmente se presentó una disminución de bacterias acetoclásticas metanogénicas, para luego incrementarse a partir del día 90 y alcanzar sus valores máximos alrededor del día 180, con los siguientes valores en los reactores 1, 2, 3 respectivamente:  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{12}$  y  $1 \times 10^{12}$  bacterias/gSSV. Por su lado, las bacterias hidrogenofílicas (Fig. 4.1.6) se mantuvieron en el mismo rango del inóculo al final del estudio ( $5 \times 10^{10}$ ). En forma paralela cuando las bacterias acetoclásticas llegan a tener sus valores más altos, también lo alcanzan las bacterias hidrogenofílicas (días 135-180), encontrándose (bacterias/g SSV)  $5 \times 10^{11}$  en el reactor 1,  $7 \times 10^{12}$  para el reactor 2 y finalmente  $1 \times 10^{12}$  en el reactor 3.

La población de bacterias que utilizan el propionato se incrementó al final del estudio en los 3 reactores, encontrándose  $5 \times 10^9$  en el reactor 1,  $2 \times 10^{10}$  en el reactor 2 y  $7 \times 10^{10}$  células/g SSV en el reactor número 3. (Tabla 4.1.7). Únicamente se valoró el contenido de bacterias que degradan el butirato al final del estudio, encontrándose:  $7 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^{10}$  y  $2 \times 10^{10}$

**Cuantificación de Bacterias Anaerobias Estrictas  
Microorganismos/g SSV y SSVI**

MUESTRO	INOCULO	R 1	R 2	R 3
SSV I	66			
BAC. A	8.0E+08			
BAC. H	5.0E+10			
BAC. Op	9.0E+08			
<b>(45 días)</b>				
SSV I		69	75	69
BAC. A		3.0E+08	4.0E+07	2.5E+05
BAC. H		8.0E+10	2.0E+11	2.0E+11
<b>(90 días)</b>				
SSV I		62	66	73
BAC. A		3.0E+08	7.0E+08	7.0E+07
BAC. H		4.0E+11	4.0E+11	1.0E+11
<b>(135 días)</b>				
SSV I		74	73	71
BAC. A		5.0E+10	7.0E+10	7.0E+10
BAC. H		5.0E+11	7.0E+12	7.0E+11
<b>(180 días)</b>				
SSV I		55	73	82
BAC. A		1.0E+11	2.0E+12	1.0E+12
BAC. H		2.0E+11	3.0E+11	1.0E+12
<b>(225 días)</b>				
SSV I		71	78	86
BAC. A		3.0E+09	5.6E+10	2.6E+10
BAC. H		5.0E+10	8.0E+10	5.0E+10
BAC. Op		5.0E+09	2.0E+10	7.0E+10
BAC. Ob		7.0E+09	2.0E+10	2.0E+10

células/g SSV para el reactor 1, 2 y 3 respectivamente.

El método del NMP da una revisión de los diversos grupos tróficos y proporciona una identificación presuntiva de los grupos de bacterias presentes en el lodo granular (Dubourguier et al., 1988; Guyot, 1988). Por otro lado Novaes (1986), menciona que los resultados obtenidos mediante este método deben ser interpretados cuidadosamente considerando las características y las condiciones bajo las cuales se trabaja, ya que pueden influenciar el número y el tipo de bacterias encontradas.

En los reactores alimentados con glucosa, por ser este un sustrato fácilmente degradable, la etapa limitante en el proceso de digestión anaerobia no va a ser la fermentación sino la metanogénesis, es por esta razón que la cuantificación de bacterias se realizó en este estudio principalmente para las bacterias acetoclásticas e hidrogenofílicas.

Como se observa en la Fig 4.1.5, la cantidad de bacterias acetoclásticas en un inicio disminuye en relación a las encontradas en el inóculo, lo cual podría ser un reflejo de la sensibilidad de éstas a las condiciones ambientales encontradas durante el arranque como son las fluctuaciones en el pH; en el reactor 3 se observa un descenso mayor, el cual corresponde a los niveles más bajos encontrados de este parámetro. Se ha observado que las bacterias metanogénicas tienen un rango limitado alrededor de la neutralidad, y una de las especies más abundantes Methanotrix soehngenii, tiene su pH óptimo entre 7.4 y 7.8, y es inactiva abajo de 6.8. (Huser et al., 1982). Se conoce que la metanogénesis a partir de acetato en algunas bacterias del tipo Methanosarcina es inhibida por el hidrógeno (Ferguson y Mah, 1983). Por otra parte, Attal et al. (1988) señalan que las poblaciones acetoclásticas y acetogénicas son progresivamente inhibidas con decrementos en el pH cuando los ácidos grasos volátiles no ionizados actúan como agentes desacoplantes por destruir el gradiente de pH y modificar el potencial de membrana.



Bacterias Acetoclásticas

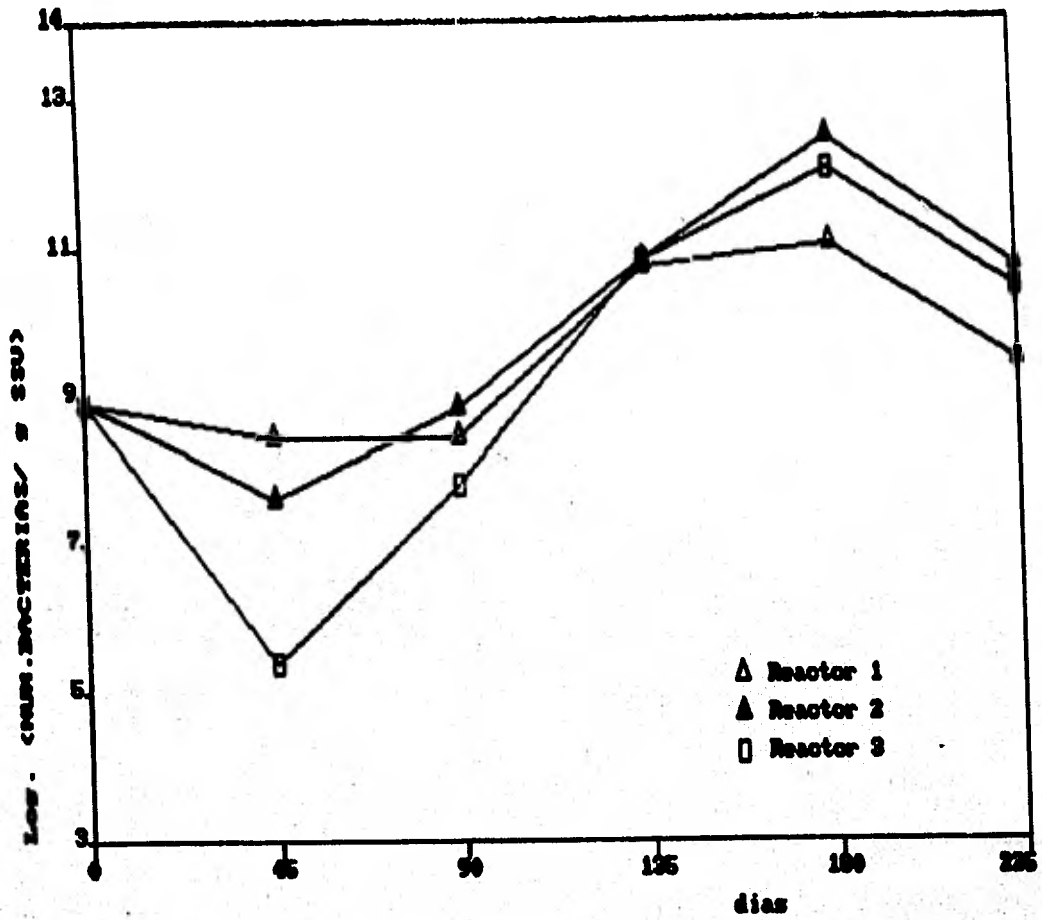


Fig. 4.1.5 Evolución de las poblaciones metanogénicas acetoclásticas en los reactores 1, 2 y 3.

En lo que respecta al número de bacterias hidrogenofílicas, estas no sufrieron un descenso en el arranque y se encontraron generalmente en mayor número que las acetoclásticas, de manera que las bacterias hidrogenofílicas al parecer son más resistentes a las variaciones al pH que las bacterias acetoclásticas. Esto puede ser explicado si se consideran nuevamente las investigaciones realizadas por Attal y Colaboradores (1988), quienes consideran que el hidrógeno no tiene propiedades desacoplantes. Así las metanogénas hidrogenofílicas pueden mantener su máxima actividad a pH de 5.4, por lo que se sugiere que esto se explica mediante un sistema de extrusión de protones que puede mantener un suficiente alto pH interno.

El que sea mayor la población hidrogenofílica que la acetoclástica es un hecho comúnmente observado, ya que se considera que la población hidrogenofílica es mayor para proteger a las bacterias metanogénicas acetoclásticas y las OHPA en caso de un incremento en la concentración de hidrógeno y de formato en el ambiente (Kaspar y Wuhrman, 1978; Guyot y Ramírez, 1989). En este sentido Guyot y Ramírez (1989) consideran que es necesario conocer la relación Methanosarcina / Methanothrix en el lodo para prever su capacidad a inhibiciones tanto del formato como del hidrógeno a nivel de la reacción acetoclástica, considerando que Methanothrix tiene una alta afinidad para concentraciones bajas de acetato y potencial de resistencia a la inhibición de hidrógeno y formato.

Los conteos encontrados en este trabajo tienen un nivel más alto que los reportados por Guyot *et al.* (1988), en lodos granulares obtenidos a partir de un digestor UASB alimentado con una mezcla de acetato y propionato, los cuales tienen los siguientes valores:

	$10^8$	bact. hidrogenofílicas/ g SSV
3.5	$10^8$	bact. acetoclásticas/ g SSV
2.0	$10^8$	bact. utilizadoras de propionato/ g SSV

Por otra parte la Tabla 4.1.8 compara los conteos bacteriales encontrados por Dubourguier *et al.* (1988) en reactores UASB

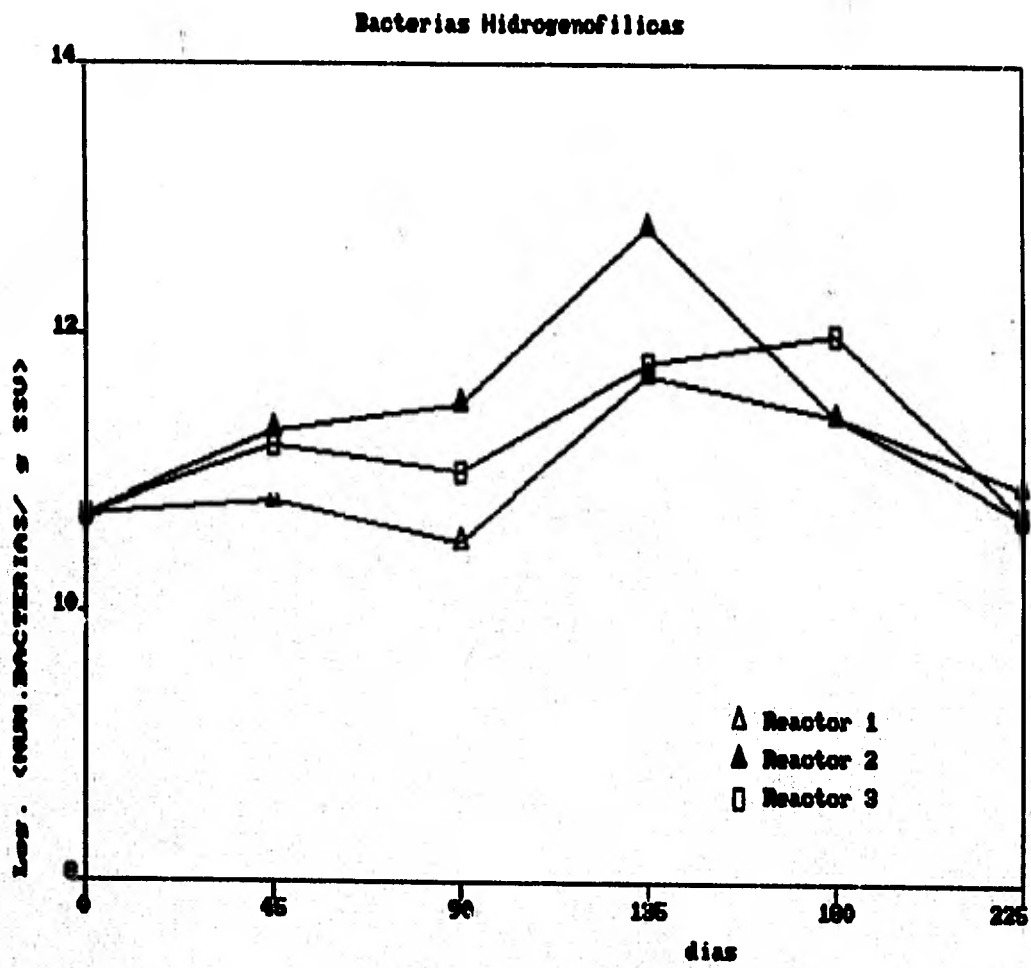


Fig. 4.1.6 Evolución de las poblaciones metanogénicas hidrogenofílicas en los reactores 1, 2 y 3.

alimentados con aguas de desecho de la industria del almidón (I y II), y con desechos líquidos de la industria azucarera Dolfing et al. (1985) (III).

TABLA 4.1.8  
CUANTIFICACIONES BACTERIANAS EN DIFERENTES ESTUDIOS

Grupo metabólico	Sustrato	No. de organismos/ml		
		I	II	III
Metanogénicas	H <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub>	2.2 X 10 <sup>6</sup>	2.5 X 10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
	Acetato	1.5 X 10 <sup>6</sup>	2.5 X 10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
Sintróficas	Propionato	3.0 X 10 <sup>6</sup>	2.5 X 10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
	Butirato	1.1 X 10 <sup>6</sup>	1.1 X 10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>

Aquí se reporta el número de bacterias por mililitro a diferencia de los calculados en este estudio (# bact/g SSV). Guyot et al. (1989) consideran que para conocer la composición de los granos, es más apropiado dar el número de bacterias por gramo de SSV, ya que de otra manera es difícil interpretar y comparar los resultados: la cantidad de SST que pueden ser tomados del mismo reactor entre dos muestras diferentes puede variar marcadamente, debido a que es difícil controlar el volumen del líquido que se extrae al mismo tiempo que los lodos. Más aún, la concentración de SSV en la cama de lodos puede variar ampliamente entre los reactores impidiendo sus comparaciones. El hecho de reportar el # de bact/ ml no permite hacer un análisis con respecto a nuestros resultados, ya que los autores no dan la concentración de SSV en la muestra.

Finalmente, las diferencias que se tienen en el contenido de bacterias entre el R<sub>1</sub> y el R<sub>2</sub> son: el primero tiene el 10% de acetoclásticas del reactor 2, y en general tiene la mitad de bacterias que los otros dos reactores, con excepción de las

1 y 2 presentaban actividades más bajas, 0.25 y 0.33 mmol/g SSV/h respectivamente, lo que equivale a cerca de un 30% y un 40% de la primera. Para el final del estudio, el reactor 2 redujo su actividad, pero siguió teniendo la mejor actividad de los 3 reactores (0.4 mmol/g SSV/h). Por otro lado, los valores obtenidos en los reactores 1 y 3 se mantuvieron bajos (0.20 y 0.30 mmol/g SSV/h) y también menores a los del día 135. (Tabla 4.1.9).

A los 225 días se encontró que la actividad de degradación para el propionato y butirato en el R<sub>2</sub> era prácticamente nula, en virtud de que estos resultados se obtuvieron cuando ocurrieron problemas con el cromatógrafo se deben considerar con cierta reserva. En tanto la actividad para el butirato en los reactores 1 y 3 fueron mayores (1.3 y 1.6 mmol/g SSV/h) que para el propionato (0.28 y 0.29 mmol/g SSV/h) respectivamente.

De acuerdo a lo encontrado por Gujer y Zehnder (1983), el 70 % de metano producido en el digestor procede de la descarboxilación del acetato, cuya reacción es la siguiente:



Dada la importancia de este sustrato, los estudios de actividad en los lodos anaerobios se enfocan principalmente hacia la reacción acetoclástica y a los principales sustratos acetogénicos que son los ácidos grasos volátiles.

La cinética de degradación del acetato puede medirse bien sea siguiendo su consumo o la producción resultante de metano; en este caso se utilizó la primera y se encontró que alrededor del día 135 los lodos en los 3 reactores eran metabólicamente más activos que cuando habían transcurrido 225 días. Al comparar estos resultados con el número de bacterias registradas en los reactores en las mismas fechas, se ve que existe una correspondencia entre las mejores cinéticas y los valores más altos de números de microorganismos hidrogenofílicos a los 135 días; a los 225 días no hay diferencias en el número de bacterias hidrogenofílicas entre

hidrogenofílicas. Sin embargo, dada la poca precisión del método del NMP, estas diferencias entre los conteos dentro de un mismo grupo para los diferentes reactores, no son significativos y aparentemente, el mismo nivel de bacterias se establece en los reactores, independientemente de las condiciones de operaciones (a una misma carga orgánica). No obstante el  $R_s$  parece diferenciarse lo no se presenta entre el reactor 2 y 3, aquí podría considerarse el papel de los exopolímeros en los SSV.

#### 4.1.1.3 EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES METABOLICAS

La cinética de degradación del acetato para los 3 reactores en los días 135 y 225 se presentan en la Tabla 4.1.9 así como también la cinética de degradación de los AGV (propionato y butirato), en el día 225.

Inicialmente se determinó la actividad de degradación del acetato en los lodos adaptados utilizados en la inoculación de los 3 reactores, pero durante el tiempo en que se realizó la prueba (6 horas) no se registró degradación alguna. Este mismo comportamiento ha sido encontrado por Fajardo *et al.* (1989) al estudiar la transición del lodo activado a inóculo adaptado para digestores anaerobios, señalando que es difícil entender como las bacterias metanogénicas y acetogénicas pueden estar presentes en los lodos activados aerobios. Se propone su existencia debido a algunos núcleos anaerobios en los flóculos de lodos activados, en los cuales se alcanzan potenciales redox de -200 y -300 mV, permitiendo que algunas anaerobias estrictas pueden crecer (Wu, 1987). Es de suponerse que tiempos de adaptación y condiciones apropiadas, les permitirían crecer y transformar un lodo activado a un inóculo anaerobio, el cual aparentemente todavía tiene que tomar un tiempo de adaptación durante el arranque de los reactores inoculados para alcanzar las actividades necesarias (Fajardo *et al.*, 1989).

Se observó una mayor actividad acetoclástica a los 135 días en el reactor 2, con un valor de 0.83 mmol/g SSV/h, mientras el reactor

TABLA 4.1.9 PARAMETROS CINETICOS DE METAMOGENESIS POR LODOS GRANULARES

	So (mM)	SST (g/l)	SSVT (g)	SSV (%)	Vmax (mmol/l/h)	Asp (mmol/gSSV/h)	AspT (mmol/h)	Vmax/qSST
<b>ACETATO:</b>								
R 1 (3erN)	13.2	34.11		74	1.28	0.25		0.03
(5o.N)	9.75	48.87	48.75	71	1.4	0.20	9.75	0.03
R 2 (3erN)	23.0	25.13		73	3.04	0.83		0.12
(5o.N)	10.1	28.56	15.03	78	1.8	0.40	6.01	0.06
R 3 (3erN)	9.75	25.59		71	1.2	0.33		0.05
(5o.N)	7.5	29.22	9.88	86	1.5	0.30	3.0	0.05
<b>BUTIRICO:</b>								
R 1 (5o.N)	14.5	9.8	48.75	71	9.5	1.3	63.37	0.97
R 3 (5o.N)	11.7	5.85	9.88	86	8.1	1.62	16.00	1.33
<b>PROPIONICO:</b>								
R 1 (5o.N)	10.4	9.8	48.75	71	2.0	0.28	13.65	0.20
R 3 (5o.N)	14.5	5.8	9.88	86	1.7	0.29	2.86	0.34

el R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>. En cuanto a las bacterias acetoclásticas, a los 135 días no se tiene ninguna diferencia entre los conteos de los 3 reactores (Fig. 4.1.5), en cambio al día 225 los conteos siguen el orden: R<sub>2</sub> > R<sub>3</sub> > R<sub>1</sub> y las actividades son: R<sub>2</sub> (0.4) > R<sub>3</sub> (0.3) > R<sub>1</sub> (0.2).

Como se observa, las actividades encontradas al día 225 siguen el mismo orden en relación al número de bacterias hidrogenofílicas y en las bacterias acetoclásticas el R<sub>1</sub> tiene menos del 10% de bacterias que el R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>. Sobre esto hay que considerar que en ambas pruebas se dan condiciones óptimas para su crecimiento, pero en el método del NMP se maceran los lodos, de tal forma que posiblemente se pierdan las interacciones que se presentan en los granos, y algunas bacterias se vean más desfavorecidas que otras. En particular se considera que la técnica del conteo por el NMP favorece más el crecimiento de las Methanosarcinas que el de las Methanotrix.

La Tabla 4.1.9 presenta también las actividades totales en relación al contenido total de sólidos suspendidos volátiles (SSV<sub>T</sub>) en cada uno de los reactores. en el caso del acetato se observa como el reactor 1 con menor TRH es el que presenta la mayor actividad seguido del reactor 2 y 3. Las diferencias encontradas entre ellos son fundamentalmente debidas al contenido de SSV<sub>T</sub> (Tabla 4.1.9); lo mismo sucede para el reactor 1 y 3 para el propionato y butirato.

A continuación se presenta en la Tabla 4.1.10 los logaritmos de los números de bacterias contenidas en los SSV<sub>T</sub> al final del experimento (225 días).



Tabla 4.1.10  
Log NMP en la totalidad del reactor

Reactor	Bact. A	Bact. H	Bact. Op	Bact. Ob
1	11.2	12.4	11.4	11.5
2	11.9	12.0	11.0	11.0
3	11.4	11.7	11.8	11.3
Inóculo	9.7	11.5	9.8	nd

Comparando estos resultados, se tiene que el número de bacterias en el contenido total de lodos en el reactor (NMP) aumenta en los 3 reactores en los 3 grupos bacteriales; el cuarto grupo (Ob) no se cuantificó en el inóculo, pero es de suponerse un incremento similar; además, con excepción de las bacterias hidrogenofílicas del Rs, se tiene el mismo orden de magnitud entre las poblaciones totales de los 3 reactores.

Por otro lado al comparar las actividades específicas de degradación se encuentra que es mas alta para el ácido butírico que para el acético y propiónico en el último muestreo (225 días) (Tabla 4.1.9). En el reactor 2 no se pudo observar la degradación tanto del propionato como del butirato, a pesar de presentar la mejor cinética de degradación por el acetato de los 3 reactores.

En estudios realizados por Dubourguier y colaboradores (1988b) comparando las actividades metanogénicas potenciales en lodos alimentados con propionato y butirato encuentran que las tasas de degradación fueron más reducidas (23-64%) que las tasas de degradación del butirato (7.6-32%). Además este mismo autor reporta (1988a) relaciones entre metanogenas/Syntrophobacter de 2.46 y de 0.71 entre metanogenas/Syntrophomonas las primeras degradando propionato y las segundas butirato de manera que el que se encuentren estas relaciones podrían explicar la menor actividad para el propionato además de que su degradación es más

afectada por la presencia de hidrógeno (McInerney y Bryant, 1981).

Las actividades específicas encontradas por Dolfing (1985) para el propionato en lodos procedentes del tratamiento de la industria azucarera fueron en el rango de 0.36 a 0.42 mmol/g SSV/h, por lo que son mayores a las registradas en este estudio (Tabla 4.1.9).

Las actividades específicas observadas para el acetato en este trabajo, coinciden en el límite bajo con las observadas por Dolfing (1985), el cual reporta un intervalo de 0.3 a 1.14 mmol/g SSV/h.

Hay que hacer notar que dicho autor calculó las actividades de degradación a partir de las curvas de producción de metano, y encontré que existe una correlación entre el diámetro del grano y el  $K_m$  aparente. De esta manera señala que a bajas concentraciones de sustrato y en biopelículas gruesas (diámetros mayores a 2 mm), la resistencia a la transferencia de masa es significativa. En casos de baja actividad hay un balance entre consumo y la difusión.

Como se puede observar, en los lodos de los 3 reactores los diámetros promedios encontrados no sobrepasan los 2 mm, y al tener también una baja actividad específica acetoclástica, (excepto en el caso del Reactor 2), no se tienen problemas de resistencia a la transferencia de masa, inclusive en la cinética de degradación para el propionato y butirato, cuyos lodos parecen ser más activos. Por otro lado Guyot *et al* (1988) mencionan que es necesario considerar la difusión del gas a partir del interior del grano de lodo y su trayecto a través del lecho de lodos hacia la atmósfera, y señalan que la tasa de consumo en lodos granulares, por lo que es necesario una medición directa de la desaparición del sustrato en la fase líquida, que es el procedimiento que se siguió en este trabajo.

Tratando de comparar las actividades específicas acetoclásticas en los lodos y las actividades específicas calculadas a partir de los

reactores se llega a la Tabla 4.1.11

Tabla 4.1.11			
Comparación de las actividades específicas en pequeños reactores batch y en los reactores UASB.			
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
batch			
(Kg DQO/Kg SSV d)	0.31	0.61	0.46
UASB			
(Kg DQO/Kg SSV d)	0.10	0.33	0.52

Las actividades específicas realizadas de manera directa con los lodos granulares en pequeños reactores batch, resultan ser mas altas (excepto en el reactor 3) que las calculadas a partir de los datos reales de operación de los reactores, lo cual es de esperarse dadas las condiciones óptimas que se proporcionan en los reactores batch, indicando la potencialidad de actividad metanogénica de estos lodos. Asimismo, se puede observar que la actividad global de los reactores es mayor conforme aumenta el tiempo de retención hidráulica (Tabla 4.1.9), lo que podría hacer pensar que un mayor tiempo de contacto permitió una mayor actividad. Por otro lado tomando en cuenta que la concentración de sustrato en el medio se encontraba en el siguiente orden  $R_2 > R_3 > R_1$  y que las actividades totales siguen un orden inverso (Tabla 4.9)  $R_1 > R_2 > R_3$  podrían explicar el que no se presenten diferencias significativas en las eficiencias de remoción de la DQO en los 3 reactores ya que son alrededor del 80% ( $R_1$  78.50;  $R_2$  82.70% y  $R_3$  81.00%).

#### 4.1.2 EFECTO DE LA CARGA ORGANICA (Reactores 2,4 y 5)

Para determinar la influencia de la carga orgánica en el proceso de granulación, se operaron los R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> con 1, 0.5 y 5 Kg DQO/Kg SSV .d respectivamente, manteniéndose constantes los demás parámetros operacionales como TRH (12 hrs), velocidad ascensional (0.02 m/h), y el mismo sustrato (glucosa), Tabla 2.1

El estudio del reactor 5 no fue posible seguirlo debido a las malas condiciones de operación que se presentaron como consecuencia de la alta concentración de glucosa suministrada (8256 mg/l), la cual ocasionó una acumulación excesiva de AGV trayendo como resultado la caída del pH (5.2) e inhibiendo el desarrollo de la población metanogénica.

##### 4.1.2.1 Índice volumétrico y producción de biomasa.

Las diferencias encontradas en las características físicas de los lodos se resumen en la Tabla 4.1.11 Como puede observarse, el índice volumétrico (IVL) en los dos reactores disminuyó con respecto al del inóculo (86.8 ml/g), alcanzando los valores más bajos alrededor del día 180, el R<sub>2</sub> con 22.7 y el R<sub>4</sub> con 26.8 ml/g . Al finalizar el estudio se registra el mismo IVL para ambos reactores (28.9 ml/g). En relación al diámetro promedio del grano, éste se incremento de 0.40 mm a 1.7 mm para el R<sub>2</sub> y a 1.4 para el R<sub>4</sub>.

En los primeros días de funcionamiento de los reactores se observa (Fig. 4.1.7) que hay un mejor IVL en el R<sub>4</sub> (60.2) que en el R<sub>2</sub> (66.2), sin embargo conforme transcurre el tiempo, ésta situación se invierte, para finalmente alcanzar idénticos valores (28.9 ml/g), los cuales son cercanos a los encontrados por Harada et al., (1988) en lodos granulares alimentados con sacarosa (20.9 ml/g), con cargas orgánicas cinco veces mayor a la del reactor 2. De acuerdo a estos resultados, parece que la carga orgánica no determina diferencias en cuanto a la

TABLA 4. CARACTERISTICAS FISICAS

			Inoculo	Reactor 2	Reactor 4
Tiempo (0 dias)	IVL	(ml/g)	86.8		
	SSV	(%)	66.0		
	GRANH	(mg)	0.40		
	s		0.20		
Primer Muestreo (45 dias)	IVL	(ml/g)		66.2	60.2
	SSV	(%)		75.0	68.0
	GRANH	(mg)		0.44	0.37
	s			0.20	0.26
Segundo Muestreo (90 dias)	IVL	(ml/g)		32.3	45.7
	SSV	(%)		65.0	62.0
	GRANH	(mg)		0.66	0.48
	s			0.40	0.29
Tercer Muestreo (135 dias)	IVL	(ml/g)		38.8	37.1
	SSV	(%)		73.0	69.0
	GRANH	(mg)		0.75	0.73
	s			0.30	0.29
Cuarto Muestreo (180 dias)	IVL	(ml/g)		22.7	26.8
	SSV	(%)		73.0	70.0
	GRANH	(mg)		1.3	1.6
	s			0.39	0.54
Quinto Muestreo (225 dias)	IVL	(ml/g)		28.9	
	SSV	(%)		78.0	67.0
	GRANH	(mg)		1.7	1.4
	s			0.50	0.51

EVOLUCION DEL INDICE VOLUMETRICO DE LODOS (IUL)

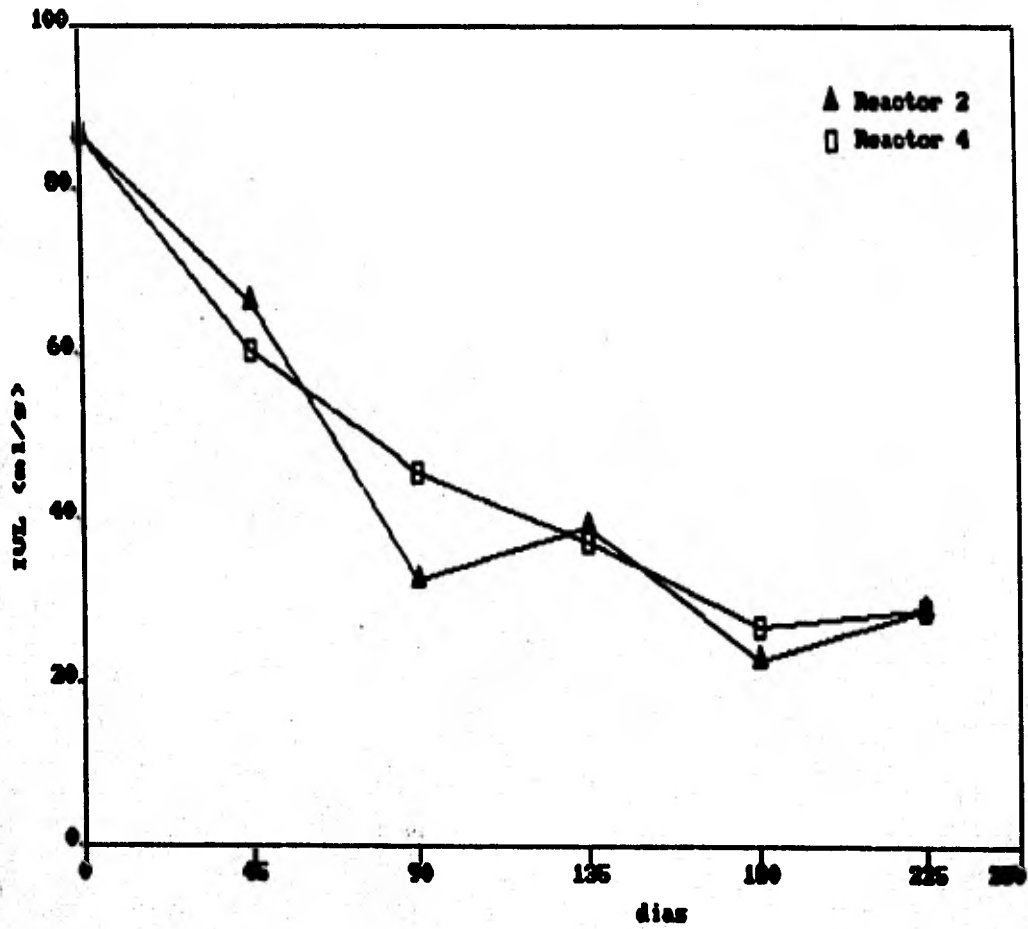


Fig. 4.1.7 Evolución del índice volumétrico de lodos en los reactores 2 y 4.

sedimentabilidad. Por otra parte al comparar el contenido de SSV (%) en muestras tomadas de la parte baja del reactor y en muestras homogéneas para el último muestreo (225 días) se obtuvieron los datos de la Tabla 4.1.12.

**Tabla 4.1.12.**  
**PORCENTAJES DE SSV EN 2 MUESTRAS DIFERENTES DE LODOS**

Reactor	SSV (parte baja de la cana) %	SSV (homogenizado) %
2	78	77
4	67	70

Prácticamente no hay diferencias entre los dos tipos de muestreo, pero sí entre los dos reactores, ya que es mayor el contenido de SSV para el reactor 2 con mayor carga orgánica. Por otra parte, al relacionar la biomasa producida entre estos dos reactores al final del experimento (Tabla 4.1.2.3), se observa que

**Tabla 4.1.13**  
**COMPARACION ENTRE EL BIOMASA FINAL Y EL RENDIMIENTO DE BIOMASA (Y).**

Reactor	C.O (Kg DQO/g SSV)	biomasa final (g)	Y Kg_SSV_ Kg DQO rem	incremento biomasa (%)
2	1	15.00	0.14	118.3
4	0.5	8.70	0.12	26.6
Inoculo		6.87g		

es notable la diferencia en cuanto a la biomasa producida (205.6%) para el final experimento en el reactor 2 cuya

carga orgánica aplicada en el arranque fue el doble en relación al reactor 1, por lo que presenta menor producción de biomasa. Para tratar de establecer si dicha diferencia se confirma con un mayor contenido de bacterias, se determinaron los log de los NMP totales para este mismo muestreo (225 días) y se relacionó con los encontrados en el inóculo (Tabla 4.1.14).

TABLA 4.1.14  
COMPARACION ENTRE LOS VALORES DE NMP (TOTALES)

	INOCULO	REACTOR 2	REACTOR 4
BAC A	9.7	11.9	11.2
BAC H	11.5	12.0	11.4
BAC Op	9.8	11.0	10.9
BAC Ob		11.0	11.2

Como se puede observar hay incremento en el número de bacterias acetoclásticas y las que utilizan el propionato para ambos reactores, sin embargo, el número de bacterias hidrogenofílicas se mantiene casi en el mismo nivel del inóculo en el reactor 4, en tanto en el reactor 2 si aumentó. Por otro lado al comparar el NMP entre el reactor 2 y 4, efectivamente se encuentra mayor número de bacterias en el reactor 2 que en el reactor 4 (excepto las del Grupo que utilizan el butirato). Sin embargo, esta diferencia no es tan marcada como para explicar las diferencias entre los contenidos de biomasa, por lo que habría que considerar la presencia de las bacterias fermentativas dando este incremento de materia orgánica.

En relación a la tasa de conversión a biomasa  $Y$  (Kg SSV/Kg DQO rem) esta fue ligeramente mayor en el  $R_2$  (0.14) que en el  $R_4$  (0.12) por lo que se puede observar que a una carga orgánica de 1 Kg DQO/Kg SSV d) favoreció ligeramente el crecimiento celular. Por otro lado en lo que respecta al diámetro de los granos, se



GRANULOMETRIA

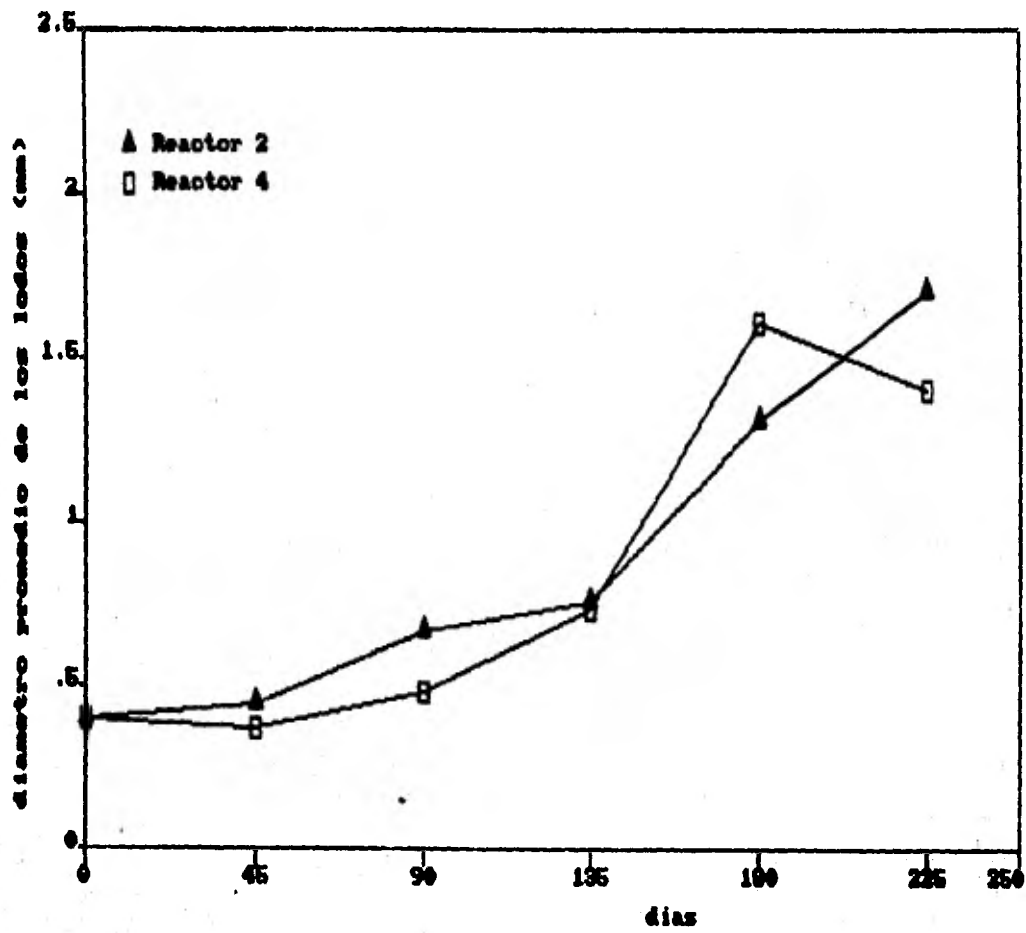


Fig. 4.1.8 Evolución del diámetro promedio del grano en los reactores 2 y 4.

tiene que en ambos reactores aumentaron sus tamaños conforme transcurría el tiempo, hasta hacerse muy similares alrededor de los 135 días (Fig. 4.1.8), para después incrementarse marcadamente. Tal evolución es contraria a la del IVL, que se va haciendo asíntota al eje de las X, lo cual se explica por la mayor densidad que logran los granos como consecuencia del crecimiento bacteriano y compactación. Los tamaños promedio alcanzados a los 225 días, para el R<sub>4</sub> fue 1.7 mm y una moda de 1.3 mm, en tanto para el R<sub>2</sub> el diámetro fue 1.4 mm y con una moda de 1.2 mm (Tabla 4.1.11). Al aplicar la prueba de "Student" entre los diámetros promedio de los lodos se encontró un valor de 5.46, que con un intervalo de confianza del 95% y presenta diferencia significativa entre las muestras lo cual indica que la carga orgánica determinó diferencias entre el tamaño de grano alcanzado entre estos dos reactores. Estos valores son similares a los encontrados por Harada et al., (1988) en lodos granulares alimentados con sacarosa con cargas orgánicas cinco veces mayores a las empleadas en el reactor 2, encontrando tamaños promedio menores (1.2 mm) a los presentados en el reactor 4 (1.4 mm), y en el reactor 2 (1.7 mm).

Por otro lado Hulshoff Pol et al. (1983) consideran que cargas orgánicas mayores a 0.6 Kg DQO/ Kg SSV .d se requieren antes de que proceda la granulación; dicho valor es muy cercano al aplicado en el R<sub>4</sub>, en tanto en el R<sub>2</sub> se utilizó una mayor carga orgánica.

#### 4.1.2.2 EVOLUCION DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS

En relación al número de bacterias encontradas, la Tabla 4.1.15 muestra los valores obtenidos en las cuantificaciones realizadas en los 2 reactores; asimismo, se presentan en las Fig. 4.1.9 y 4.1.10 su evolución con respecto al tiempo.

En ambos reactores el número de bacterias acetoclásticas se incrementa, para alcanzar un valor máximo de  $7 \times 10^{10}$  microorganismos/g SSV a los 135 días en el R<sub>4</sub> y  $2.0 \times 10^{10}$

**Quantificación de Bacterias Anaerobias Estrictas  
Microorganismos/g SSV y SSVI**

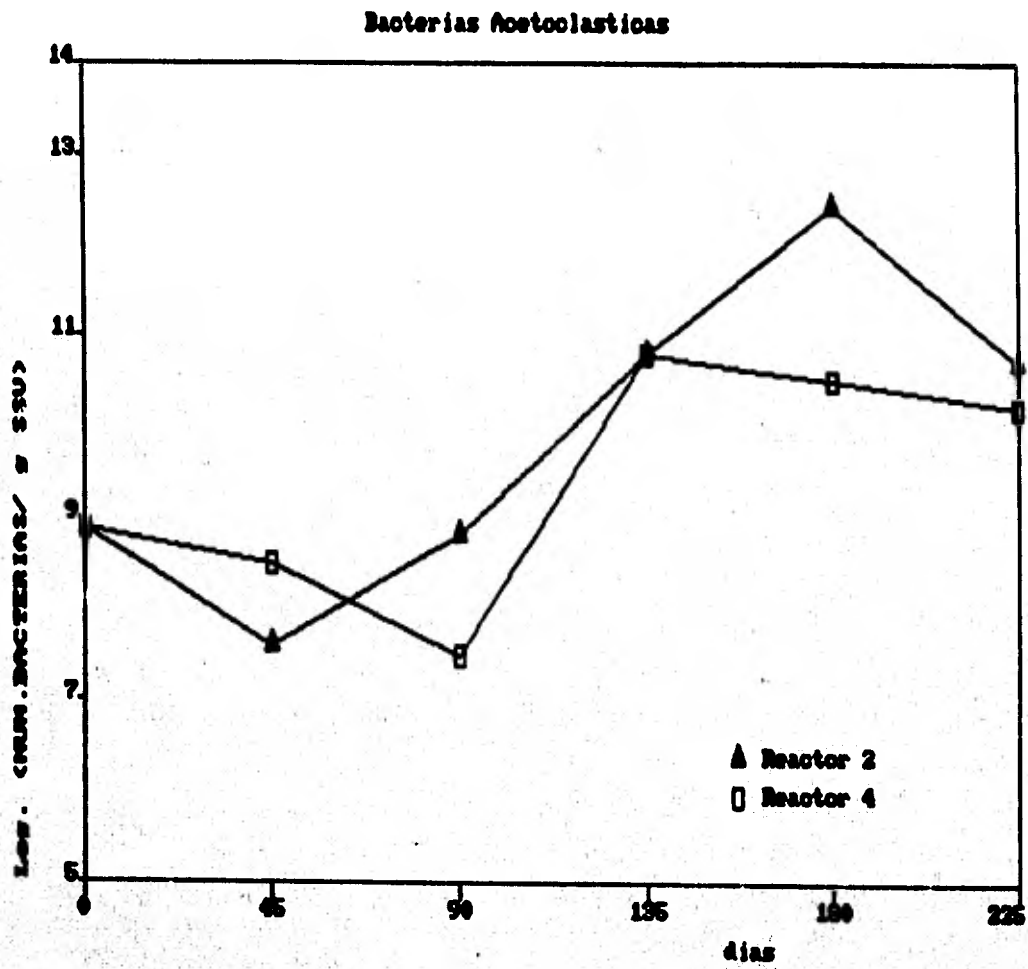
<b>NUESTRO</b>	<b>INOCULO</b>	<b>R 2</b>	<b>R 4</b>
SSV †	66		
BAC. A	8.0E+08		
BAC. H	5.0E+10		
BAC. Op	9.0E+08		
<b>(45 días)</b>			
SSV †		75	68
BAC. A		4.0E+07	3.0E+08
BAC. H		2.0E+11	2.0E+11
<b>(90 días)</b>			
SSV †		66	62
BAC. A		7.0E+08	3.0E+07
BAC. H		4.0E+11	3.0E+11
<b>(135 días)</b>			
SSV †		73	69
BAC. A		7.0E+10	7.0E+10
BAC. H		7.0E+12	1.0E+12
<b>(180 días)</b>			
SSV †		73	79
BAC. A		2.0E+12	4.0E+10
BAC. H		3.0E+11	7.0E+10
<b>(225 días)</b>			
SSV †		78	67
BAC. A		5.6E+10	2.0E+10
BAC. H		8.0E+10	3.0E+10
BAC. Op		2.0E+10	1.0E+10
BAC. Ob		2.0E+10	2.0E+10

**SSV: sólidos suspendidos volátiles; Bac. A: bacterias acetoclasticas; Bac. H: bacterias hidrogenofilicas; Bac. Op: bacterias OMPA que utilizan el propionato; Bac. Ob: bacterias OMPA que utilizan el butirato.**

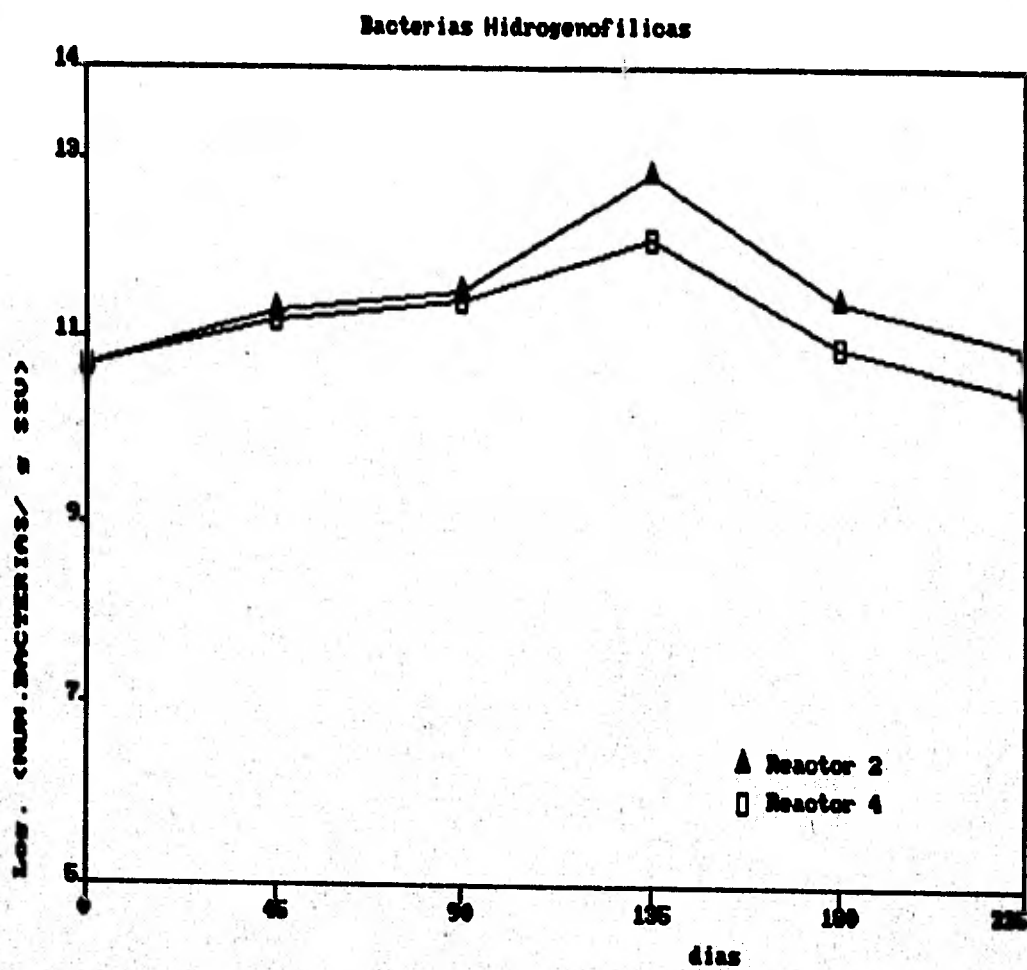
microorganismos/g SSV a los 180 días en el R<sub>2</sub>. En la fase terminal del experimento se observa que dicho número de bacterias se hace similar. Únicamente en el arranque se observa que el R<sub>4</sub> presenta mayor número de bacterias acetoclásticas que el R<sub>2</sub>. Por otro lado, las bacterias hidrogenofílicas también aumentan, presentándose los valores más altos de los 2 reactores a los 135 días, R<sub>4</sub>  $1.0 \times 10^{12}$  y R<sub>2</sub>  $7.0 \times 10^{12}$  microorg/g SSV. Finalmente se obtienen valores en el mismo rango que el registrado en el inóculo ( $10^{10}$ ) estas bacterias se mantienen a lo largo del estudio en mayor cantidad en el R<sub>2</sub>. De la misma manera se encuentra un aumento en el número de bacterias que utilizan el propionato de  $9.0 \times 10^8$  a  $1.0 \times 10^{10}$  y  $2.0 \times 10^{10}$  microorg/g SSV para el reactor 4 y 2 respectivamente, mientras los valores para las bacterias que utilizan el butirato son iguales  $2.0 \times 10^{10}$  microorg/g SSV.

En el primer muestreo se encontró que el reactor 4 con menor carga orgánica se encontraba una mayor cantidad de bacterias acetoclástica (Tabla 4.1.15 y Fig. 4.1.9). Esto podría contribuir a explicar el arranque más rápido de dicho reactor (42 días) con respecto al reactor 2 (75 días), considerando que se partió del mismo inóculo. Dicho inóculo contenía suficientes bacterias pero al parecer estaban inactivas de acuerdo a los resultados obtenidos al aplicar la prueba de actividad específica metanogénica. Al ser alimentada con cargas orgánicas de 0.5 Kg DQO/Kg SSV. d se favoreció un arranque rápido, ya que la baja tasa de producción de AGV permitió la adaptación y el crecimiento del consorcio microbiano; en cambio, en el R<sub>2</sub> la carga orgánica inicial fue de 1 Kg DQO/Kg SSV. d la cual produjo mayor cantidad de AGV que no pudieron ser degradados rápidamente, afectando por lo tanto a la población metanogénica y ocasionando un retraso en el arranque.

Es importante hacer notar que el número de bacterias hidrogenofílicas se mantuvo siempre en valores más altos que las acetoclásticas. De acuerdo con Dolfing y colaboradores (1975) y Kaspar y Wuhrman (1978) la mayor población de bacterias hidrogenofílicas funciona como protección a posibles cambios en



**Fig. 4.1.9** Evolución de las poblaciones metanogénicas acetoclásticas en los reactores 2 y 4.



**Fig. 4.1.10** Evolución de las poblaciones metanogénicas hidrogenofílicas en los reactores 2 y 4.

la presión parcial de hidrógeno en el ambiente.

Al finalizar el estudio se encuentra que hay un nivel equivalente bacterias metanogénicas y acetogénicas, lo cual permite notar que la proporción de bacterias hidrogenofílicas por unidad de masa no varió, mientras que las acetoclásticas se incrementaron, lo mismo con las Op.

#### 4.1.2.3 ACTIVIDAD METANOGENICA

Para conocer las actividades metanogénicas de los lodos se realizaron cinéticas de degradación para el acetato en el día 135, (3er muestreo) encontrándose una mayor actividad específica en los lodos del R<sub>2</sub> (0.83 mmol/g SSV/h) que la presentada en el R<sub>4</sub> (0.24 mmol/g SSV/h), repitiéndose este comportamiento al final del estudio (5o. muestreo), aunque con valores mas bajos para ambos casos: 0.40 y 0.15 mmol/g SSV/h para el reactor 2 y 4 respectivamente (Tabla 4.1.16). También se observan diferencias en el contenido de SSV de las muestras de lodos al término del experimento, lo que va a acentuarán mas las diferencias cuando se analiza la actividades referida al volumen total de los reactores: reactor 2 (6.01 mmol/h) y reactor 4 (1.3 mmol/h) Tabla 4.1.2.6.

La actividad específica es una prueba que da una estimación del grado de actividad de biomasa relacionada con un grupo metabólico (bact. acetoclásticas) cuando se agrega un sustrato específico bajo condiciones de saturación. Las actividades encontradas en el R<sub>2</sub> tanto a los 135 días como a los 225, se encuentran dentro del rango de los resultados reportados por Dolfing (1985) para granos alimentados con acetato procedentes de un reactor UASB industrial, alimentado con aguas residuales de la industria productora de azúcar a partir de remolacha (0.3 a 1.14 mmol/g SSV/h), en tanto los valores registrados en el R<sub>4</sub> son más bajos. El trabajo de Dolfing se enfocó a estudiar la influencia de la resistencia a la transferencia de masa en las cinéticas de

Tabla 4.115 PARAMETROS CINETICOS DE METANOGENESIS POR LODOS GRANULARES

	$S_0$ (mM)	SST (g/l)	SSVT (g)	SSV (%)	$V_{max}$ (mmol/l/h)	Asp (mmol/gSSV/h)	AspT (mmol/h)	$V_{max}/gSST$
ACETATO:								
R 2 (3erH)	23.0	5.0		73	3.04	0.83		0.6
(3er.H)	10.1	5.7	15.03	78	1.8	0.40	6.01	0.3
R 4 (3erH)	8.4	5.4		69	0.9	0.24		0.16
(3er.H)	8.8	12.8	8.70	67	1.3	0.15	1.3	0.10



formación de metano, y encontró que esta depende de la actividad específica máxima y del grosor de las biopelículas, señalando que en granos con tamaños pequeños ( $\approx 2$  mm) y con actividades metanogénicas relativamente bajas para el acetato, no se detectan limitaciones en la transferencia de masa. Por lo que en los granos correspondientes tanto al  $R_3$  como en el  $R_4$  al parecer no se tuvo este problema, ya que los tamaños promedio del grano no son mayores a 2 mm y la actividad es baja para el reactor 4, aunque intermedia para el reactor 2.

Por otra parte, Pette y colaboradores (1980) reportan actividades metanogénicas de 1.3 g DQO/g SSV d en lodos alimentados con efluentes de la industria azucarera. Convirtiendo unidades, este valor es cercano al encontrado en este estudio para el  $R_3$  (1.27 g DQO/g SSV d) a los 135 días. De acuerdo con lo encontrado por Brummeler *et al* (1985) la actividad específica en granos cuyo diámetro variaba de 1 a 5 mm fue 1.92 g DQO/g SSV d, y considerando que se produjeron granos entre este diámetro se puede decir que las actividades son muy cercanas. De acuerdo a lo descrito anteriormente, se puede considerar que las diferencias en la carga orgánica aplicada, van a determinar una mayor actividad específica metanogénica.

#### 4.2. REACTORES ALIMENTADOS CON DIFERENTE TIPO DE SUSTRATO (GLUCOSA, ALBUMINA, AGV Y AGV + $\text{FeSO}_4$ ).

Se presentan en la tabla 4.2.1 los valores del IVL, diámetro promedio del grano y contenido de SSV para los 4 reactores alimentados con diferentes sustratos y bajo las condiciones de operación establecidas en la Tabla 2.1.

De manera general, se observa en la Fig. 4.2.1 que el IVL en todos ellos mejoró a lo largo del tiempo (excepto en el reactor # 6 a partir del día 135 que fue cuando se rompió, razón por la cual cambiaron sus propiedades de sedimentación además de otras características las cuales se detallarán más adelante). Los IVL fueron de 86.8 ml/g en el inóculo hasta 14 ml/g para el reactor # 6 en el tercer muestreo (135 días), dicho valor fue el más bajo registrado entre los 4 reactores. Es importante señalar que en el caso del reactor 8, el IVL que presenta a lo largo del estudio resulta ser engañoso ya que de acuerdo con los resultados se consideraría que presentó buenos IVL; sin embargo, esto no sucedió ya que en realidad los lodos que se formaron en este reactor resultaron ser sumamente finos y al parecer con gran cantidad de precipitados de  $\text{FeS}$ . De esta manera, los resultados más bajos obtenidos (12.5 ml/g) se deben en gran parte al alto contenido de cenizas, ya que éstas últimas representaban alrededor del 64% de los SST. En seguida se encuentra el reactor # 2 cuyos índices más bajos estuvieron entre los 180 días y los 225 días con valores de 22.7 y 28.9 ml/g respectivamente. Por último, el IVL más alto se registra en el reactor # 7 y así se mantiene hasta el final del experimento alcanzando 41.4 ml/g.

Por lo antes expuesto se puede decir que el sustrato que favoreció un mejor IVL fue la albúmina de huevo (sin tomar en cuenta los resultados posteriores a su ruptura) seguido de la glucosa y finalmente los AGV.

De acuerdo con Dubourguier et al. (1988) la formación de

-Tabla 4.2 1

CARACTERISITICAS FISICAS - SUSTRATO

		Inoculo	Reactor 2	Reactor 6	Reactor 7	Reactor 8
Tiempo (0 dias)	IVL (ml/g)	86.8				
	SSV (%)	66.0				
	GRAMI (mg)	0.40				
	s	0.20				
Primer Muestreo (45 dias)	IVL (ml/g)	66.2	43.8	44.5	34.5	
	SSV (%)	75	79	63	29	
	GRAMI (mg)	0.44	0.60	0.38	0.30	
	s	0.20	0.29	0.21	0.10	
Segundo Muestreo (90 dias)	IVL (ml/g)	32.3	29.3	53.8	44.5	
	SSV (%)	66	78	62	45	
	GRAMI (mg)	0.66	0.80	0.47	0.46	
	s	0.40	0.28	0.28	0.23	
Tercer Muestreo (135 dias)	IVL (ml/g)	38.8	14	50.7	21.2	
	SSV (%)	73	86	62	37	
	GRAMI (mg)	0.75	1.18	0.65	0.63	
	s	0.30	0.42	0.35	0.27	
Cuarto Muestreo (180 dias)	IVL (ml/g)	22.7	27.1	46.0	16.8	
	SSV (%)	73	89	65	31	
	GRAMI (mg)	1.3	1.8	0.62	0.5	
	s	0.39	0.34	0.25	0.33	
Quinto Muestreo (225 dias)	IVL (ml/g)	28.9	50.8	41.4	12.5	
	SSV (%)	78	85	67	33	
	GRAMI (mg)	1.7	1.7	0.6	0.7	
	s	0.50	0.34	0.16	0.25	

EVOLUCION DEL INDICE VOLUMETRICO DE LODOS (IVL)

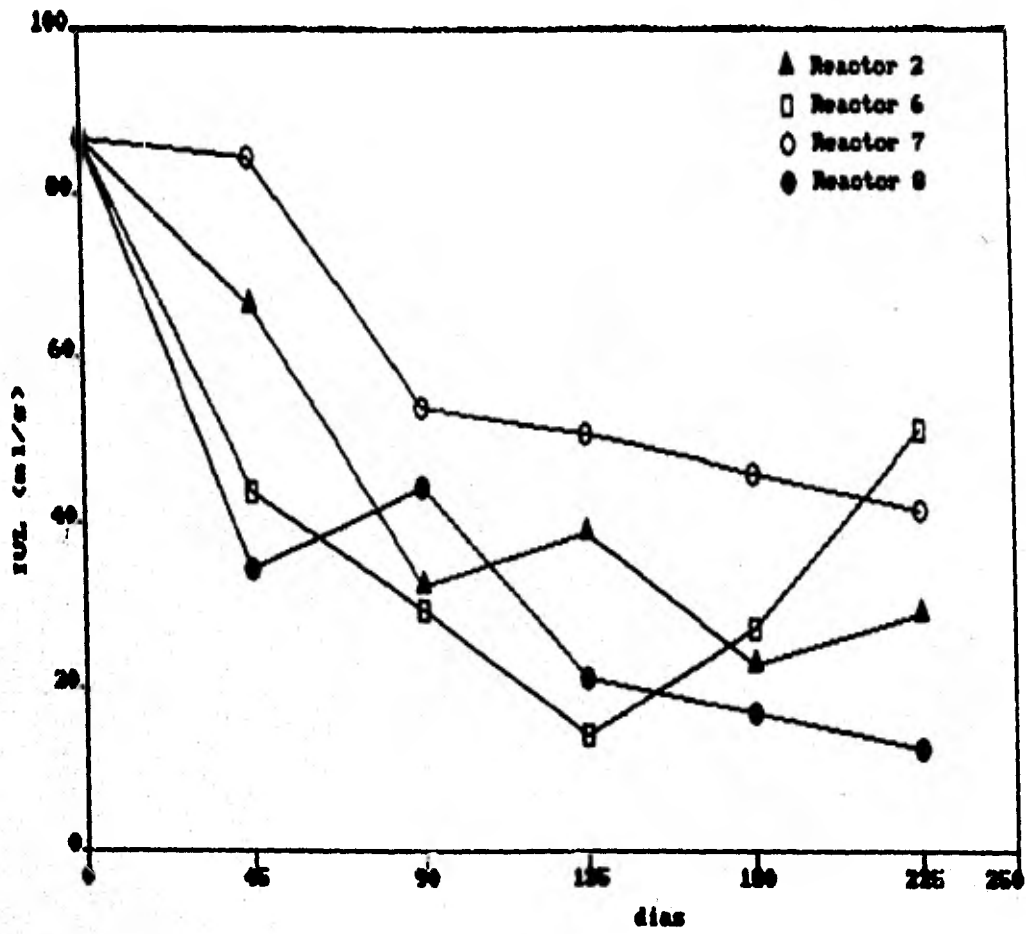


Fig. 4.2.1 Evolución del índice volumétrico de lodos en los reactores 2, 6, 7 y 8.

exopolímeros juega un papel importante en la adhesión y estabilización de los agregados. Asimismo, las proteínas pueden considerarse como polímeros extracelulares. Sumándose a los grupos negativos de los ácidos urónicos, las proteínas pueden proveer importantes sitios de unión, ya que aunque ellas puedan tener una carga neta negativa, los grupos positivos pueden formar fuertes uniones para sitios negativos. Considerando lo antes expuesto puede pensarse que en el R<sub>6</sub> se tuvo un lodo con buenas características de sedimentación debido a que los lodos ahí formados tenían densidades altas como producto del incremento en el tamaño de grano ocasionado por el crecimiento bacteriano y la producción de exopolímeros (teniendo en cuenta la teoría de Sam Soon y colaboradores, 1988) los cuales funcionaron como superficie de unión tanto para otras células como para partículas inertes.

En cuanto al reactor 2 este presentó de la misma manera valores bajos de IVL, resultado del crecimiento bacteriano que se vió favorecido por tratar un sustrato fácilmente degradable así como a la formación de exopolímeros. Sin embargo, la fracción de polisacáridos extracelulares de los granos se ha encontrado que es solo de 1 a 2% basados en el peso seco (Dolfing et al., 1985). Este valor es muy bajo comparado con la gran cantidad de material capsular producido por algunos géneros como Enterobacteria, Leunostoc o Streptococci. Este material extracelular contiene 13% de ácido urónico.

Por otra parte Lettinga et al., (1980) consideran a los lodos con IVL de 15 a 20 ml/g como lodos con alta sedimentabilidad y los cuales son cercanos a los encontrados tanto para el R<sub>2</sub> y más aún para el R<sub>6</sub>.

En cuanto al diámetro promedio del grano (Tabla 4.2.1 y Fig. 4.2.2) se encuentra que en el reactor 6 se incrementa desde el primer muestreo (45 días), lo cual coincide con su rápido arranque, alcanzando 1.18 mm a los 135 días (antes de su ruptura). Después de esta fecha, sigue en aumento el tamaño de grano (1.8

mm) manteniéndose alrededor de este valor hasta el final del experimento (pero ahora presenta una película blanquesina que lo cubre dándole una consistencia menos compacta). Asimismo, el reactor # 2 aumenta el tamaño del grano pero de manera más lenta, hasta el día 135 en donde se hace notorio el crecimiento alcanzando 1.7 mm a los 225 días.

Se describe que la formación de pellets biológicos es única en sistemas de fermentación metanogénica de flujo ascendente y su formación se ve favorecida al tratar aguas de desecho que contengan carbohidratos Lettinga et al., 1980; Ross, 1984; Sam Soon et al., 1987. Un hecho importante es que Ross (1984) encuentra que una gran fracción de los granos desarrollados en una mezcla de glucosa-almidón como sustrato fue de origen proteico, y las fotografías al microscopio electrónico indicaban el crecimiento de muy finos filamentos a partir de las paredes celulares de los microorganismos.

Por otra parte, el tamaño alcanzado en los granos del reactor 6 podrían deberse a la presencia de organismos del tipo de M. Strain AZ, (bacteria metanogénica que utiliza el hidrógeno y cuya hipótesis ha sido ampliamente explicada en el Capítulo 4.1.1) ya que en general las proteínas son hidrolizadas a péptidos y aminoácidos los cuales son fermentados a ácidos grasos volátiles,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ , y  $\text{S}^-$ . Además a sus características como proteína funcionando como exopolímero, explicadas arriba.

Aunque el tamaño de grano mejoró en el reactor 7 sólo llegó a 0.6 mm al final del estudio. Este resultado coincide con lo propuesto por Sam Soon et al., 1988, indicando que no se logra la granulación o ésta resulta ser pobre con sustratos que no producen hidrógeno (como por ejemplo el acetato) o que requieran para su rompimiento de presiones parciales bajas de  $\text{H}_2$  (como en el caso del propionato, butirato y lípidos). Por otra parte, de Zeeuw y Lettinga (1980) encuentran un grado limitado de pelletización en reactores alimentados con mezclas de acetato-propionato de los datos reportados una fracción apreciable

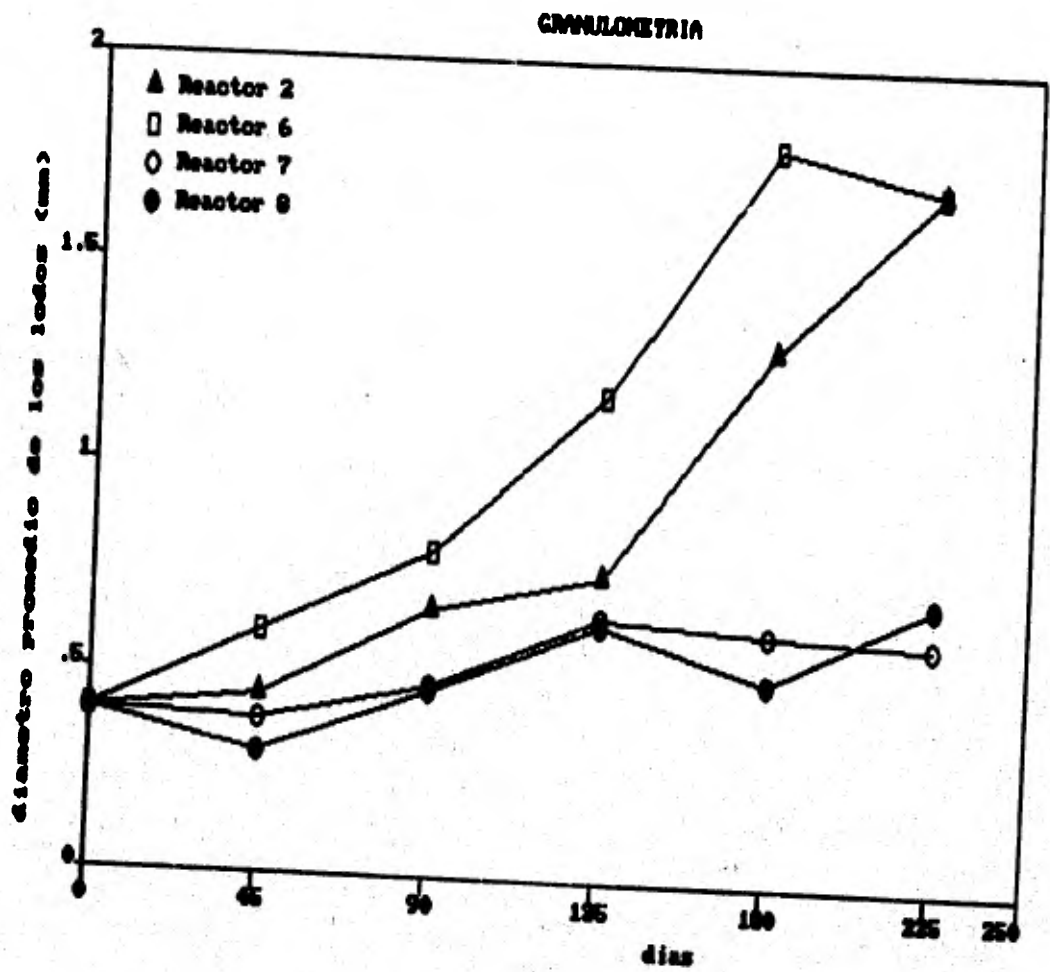


Fig. 4.2.2 Evolución del diámetro promedio del grano en los reactores 2, 6, 7 y 8.

( $\pm$  10%) de la DQO del influente es aportado como extracto de levadura la cual contiene una glucoproteína que de acuerdo con Sam Soon et al. (1988) es la que permite se alcance alguna formación de pellet. Otro punto de apoyo son los resultados obtenidos por Boari et al., (1984) quienes no observaron la formación de granos durante el tratamiento de aguas de desecho del procesamiento del aceite de olivo, ya que de acuerdo con Mc Inerney et al. (1979), los lípidos no pueden ser convertidos a ácidos grasos excepto bajo condiciones de presiones de H<sub>2</sub> bajas.

Por otra lado, los lodos del reactor 8 alcanzaron tamaños (0.7 mm) similares a los del reactor 7 ya que ambos fueron alimentados con una mezcla de AGV. Sin embargo la consistencia fue diferente, probablemente como consecuencia de la adición de 100 mg/l glucosa en el R<sub>7</sub> pero sobre todo a la clara influencia del sulfato ferroso mediante la presencia de precipitados de FeS en el R<sub>8</sub> que dió a los lodos una consistencia fina. A este respecto, también menciona Sam Soon et al. (1988) que se ha conseguido una granulación limitada en sistemas UASB tratando aguas de desecho de la industria papelera cuyo influente consistía de 50% de carbohidratos, 50% de AGV, con una DQO de aproximadamente 5000 mg/l y sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) de 300 mg/l. Como es sabido, los organismos sulfato reductores tienen una mayor afinidad por el hidrógeno que los organismos metanogénicos (Kristjansson, Shönheit y Thauer, 1982; Kristjansson y Shönheit, 1983), por lo tanto el hidrógeno generado será utilizado inmediatamente para reducir los iones sulfato a sulfuro en la base del reactor. Como consecuencia, se limita, la disponibilidad de hidrógeno para la granulación (Sam Soon et al., 1988). Este comportamiento también es apoyado por Russo (1987), quién observa que al disminuir la concentración de sulfato incrementa la formación de granos.

De lo anterior resulta claro que el tipo de sustrato es un factor determinante en la formación de granos. Cabe mencionar que se considera en la bibliografía que para que se lleve a cabo el proceso de granulación es también indispensable la existencia



de regiones de alta y baja presión parcial de  $H_2$  ligeramente separadas, las cuales son exclusivas de sistemas de flujo ascendente o semiascendente, en cuyo primer grupo entraría el reactor UASB. (Sam Soon *et al.*, 1988).

Por otra parte al comparar el contenido de SSV al final del experimento entre una muestra de lodos tomada de la parte baja del reactor y una muestra homogénea se llega a la Tabla 4.2.2.

REACTOR	2	6	7	8
PARTE BAJA SSV (%)	78	86	67	33
HOMOGENEA SSV (%)	77	85	65	41

De manera que son muy similares los valores encontrados entre ambas muestras, excepto en el reactor 8, pero cuya explicación se debe posiblemente a una mayor mineralización en la parte baja del reactor como consecuencia de la precipitación del sulfuro ferroso. Por otro lado, se observa que en ambas muestras el reactor 6 presenta el mayor contenido de SSV seguido del reactor 2 y 7 y por último el R 8.

Por otra parte la Tabla 4.2.3 compara el lodo producido por estos reactores al final del estudio en relación al inóculo.

TABLA 4.2.3  
COMPARACION ENTRE LA BIOMASA TOTAL (SSV Total) EN  
LOS REACTORES. Cantidad total de inóculo al tiempo cero  
6.87 g.

Reactor	Sustrato	biomasa (g)	Incremento en biomasa %
2	glucosa	15.0	118.3
6	albúmina	7.7 <sup>**</sup>	12.0
		10.7 <sup>*</sup>	55.7
7	AGV	4.4	-36.0
8	AGV + FeSO <sub>4</sub>	28.9	320.0

\* Hasta el día 135; \*\* Después de su ruptura.

Se ha considerado la producción de lodos para el reactor 6 a los 135 días (antes de que se rompiera) y al final del experimento. En el reactor 6 (135 días) y en el 2 se nota que hay una producción alta de lodos en comparación con el reactor 7 en donde hubo pérdida. En el caso del reactor 8 el mayor contenido de lodos se debe seguramente a la caída de lodos del reactor 6 en el momento del accidente ya que se encontraba colocado en la parte inferior de éste y cuyo volumen no se pudo determinar. Por otra parte al finalizar el experimento se encontró que este lodo estaba muy mineralizado, ya que se determinó solo 41% de SSV de los SST.

Al comparar las tasas de producción de biomasa se tiene la Tabla 4.2.4.

TABLA 4.2.4  
COMPARACION ENTRE EL RENDIMIENTO DE BIOMASA (Y) EN  
REACTORES ALIMENTADOS CON DIFERENTES SUSTRATOS.

Reactor	Sustrato	Y -----Kg SSV----- Kg DQO removida
2	glucosa	0.14
6	albúmina	0.20*
7	AGV	0.28
8	AGV + SO <sub>4</sub>	0.094

\* Hasta el día 135.

Los valores encontrados por los reactores 2 y 6 van en el sentido de incrementos en el contenido de lodos ya que en ellos hay una alta producción; sin embargo, los datos no son claros para el reactor 7 en donde se esperaría valores muy bajos dado que no hubo producción de lodos. Este resultado se debe tomar con reserva ya que son valores calculados en un reactor que no alcanzó la estabilidad en su operación. Por otra parte la Y alcanzada en el reactor 8 es muy baja si se considera que las Y reportadas para las bacterias metanogénicas es de alrededor de 0.05 Kg/ Kg DQO removido (Henze y Harremoës, 1981) y de las sulfato reductoras es 0.16 Kg SSV/ Kg DQO (Barton *et al.*, 1983) sin considerar también de las bacterias que utilizan el propionato y butirato.

Para poder interpretar mejor estos resultados se pueden considerar los NMP totales al final del experimento (225 días) presentados en la Tabla 4.2.5.

**TABLA 4.2.5**  
**COMPARACION ENTRE LOS NMP<sub>T</sub>**

REACTOR	2	6	7	8
<b>NMP (log)</b>				
<b>Bact. A</b>	11.9	11.4 11.7 (135 días)	10.7	10.8
<b>Bact. H</b>	12.0	11.2 12.6 (135 días)	10.8	12.0
<b>Bact. Op</b>	10.9	10.4	10.5	11.7
<b>Bact. Ob</b>	11.2	11.2	10.5	10.3

Es necesario aclarar que se incluyen los datos encontrados en el reactor 6 a los 135 días ( para las bacterias acetoclásticas e hidrogenofílicas) que fue antes de que se rompiera y al final del experimento cuando ya sus características tanto físicas (IVL) como morfológicas eran diferentes debidas probablemente a contaminación por algún otro tipo de bacterias el cual no fue determinado. Como sería de esperar, el mayor número de bacterias se encuentra en los reactores con el mayor contenido de SSV (reactor 2 Y 6) excepto las que utilizan el propionato.

En relación a los reactores 7 y 8, en ellos es menor el contenido de SSV y el número de bacterias (excepto en el 8 el número de bacterias hidrogenofílicas y las que utilizan el propionato) ya que ambas fueron alimentadas con el mismo sustrato aunque a mayor carga orgánica (3.2 Kg DQO/Kg SSV d) que los otros 2 reactores (2 y 6), pero esta alta concentración de ácidos al parecer no favoreció el crecimiento de la flora metanogénica. Sin embargo en el reactor 8 tendría que considerarse también el papel que estan jugando las bacterias sulfatoreductoras ya que ellas estarían consumiendo el hidrógeno y manteniendo el potencial redox a niveles favorables para el desarrollo de las bacterias

**consumidoras de propionato.**

#### 4.2.2 EVOLUCION DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS

En la tabla 4.2.6. se presentan los números de bacterias por gramo de sólidos suspendidos volátiles encontrados tanto en el inóculo como en los 4 reactores alimentados con diferente sustrato y de acuerdo a las condiciones de operación establecidas en la Tabla 2.1.

Como se puede observar al final del experimento se encontró un aumento en el número de bacterias acetoclásticas en todos los reactores con respecto al del inóculo ( $8.0 \times 10^8$  bact/g SSV) siendo de  $5.6 \times 10^{10}$  para el reactor 2,  $3.3 \times 10^{10}$  para el reactor 6,  $1.1 \times 10^{10}$  en el reactor 7 y  $2.0 \times 10^9$  bact/g SSV en el reactor 8.

En la Fig. 4.2.3 se observa que en todos los reactores hay una disminución en el número de bacterias acetoclásticas en los primeros días, pero conforme transcurre el tiempo se recuperan para alcanzar sus valores máximos alrededor del día 180, encontrándose  $2.0 \times 10^{12}$  en el reactor 2,  $3.0 \times 10^{11}$  en el reactor 6,  $9.5 \times 10^{10}$  en el reactor 7 y en el caso del reactor 8 este mantiene su valor ( $3.1 \times 10^{10}$ ) en esta fecha muy cercano al valor máximo encontrado a los 135 días con  $3.7 \times 10^{10}$  bact/ g SSV.

En cuanto a las bacterias hidrogenofílicas estas se encontraron al finalizar el estudio en el mismo orden de magnitud que en el inóculo ( $10^{10}$ ) (Tabla 4.2.6). El número más alto de estas bacterias se presentan en el reactor 2 y 8 a los 135 días con  $7.0 \times 10^{12}$  y  $1.9 \times 10^{11}$  bact/g SSV, en cambio para los reactores 6 y 7 los máximos se observan a los 180 días con  $4.2 \times 10^{11}$  y  $2.0 \times 10^{11}$  bact/g SSV respectivamente.

En relación a las población bacteriana que utiliza el propionato, ésta se incrementó en todos los reactores al comparar el número

161. 9.8.2 **Quantificación de Bacterias Anaerobias Estrictas**  
**Microorganismos/g SSV y SSVt**

MUESTRO	INOCULO	R 2	R 6	R 7	R 8
SSV t	66				
BAC. A	8.0E+08				
BAC. B	5.0E+10				
BAC. Op	9.0E+08				
<b>(45 días)</b>					
SSV t		75	79	63	30
BAC. A		4.0E+07	4.1E+08	1.4E+08	1.0E+08
BAC. B		2.0E+11	1.0E+11	5.3E+09	7.0E+09
<b>(90 días)</b>					
SSV t		66	78	62	45
BAC. A		7.0E+08	1.3E+07	9.6E+06	4.3E+07
BAC. B		4.0E+11	1.9E+11	5.3E+09	2.9E+09
<b>(135 días)</b>					
SSV t		73	86	62	38
BAC. A		7.0E+10	4.0E+10	4.3E+10	3.7E+10
BAC. B		7.0E+12	4.1E+11	7.6E+10	1.9E+11
<b>(180 días)</b>					
SSV t		73	89	82	31
BAC. A		2.0E+12	3.0E+11	9.5E+10	3.1E+10
BAC. B		3.0E+11	4.2E+11	2.0E+11	1.0E+11
<b>(225 días)</b>					
SSV t		78	86	67	33
BAC. A		5.6E+10	3.3E+10	1.0E+10	2.0E+09
BAC. B		8.0E+10	2.1E+10	1.5E+10	3.4E+10
BAC. Op		2.0E+10	3.4E+09	7.7E+09	1.7E+10
BAC. Ob		2.0E+10	2.1E+10	7.7E+09	6.9E+08

Bacterias Acetoclásticas

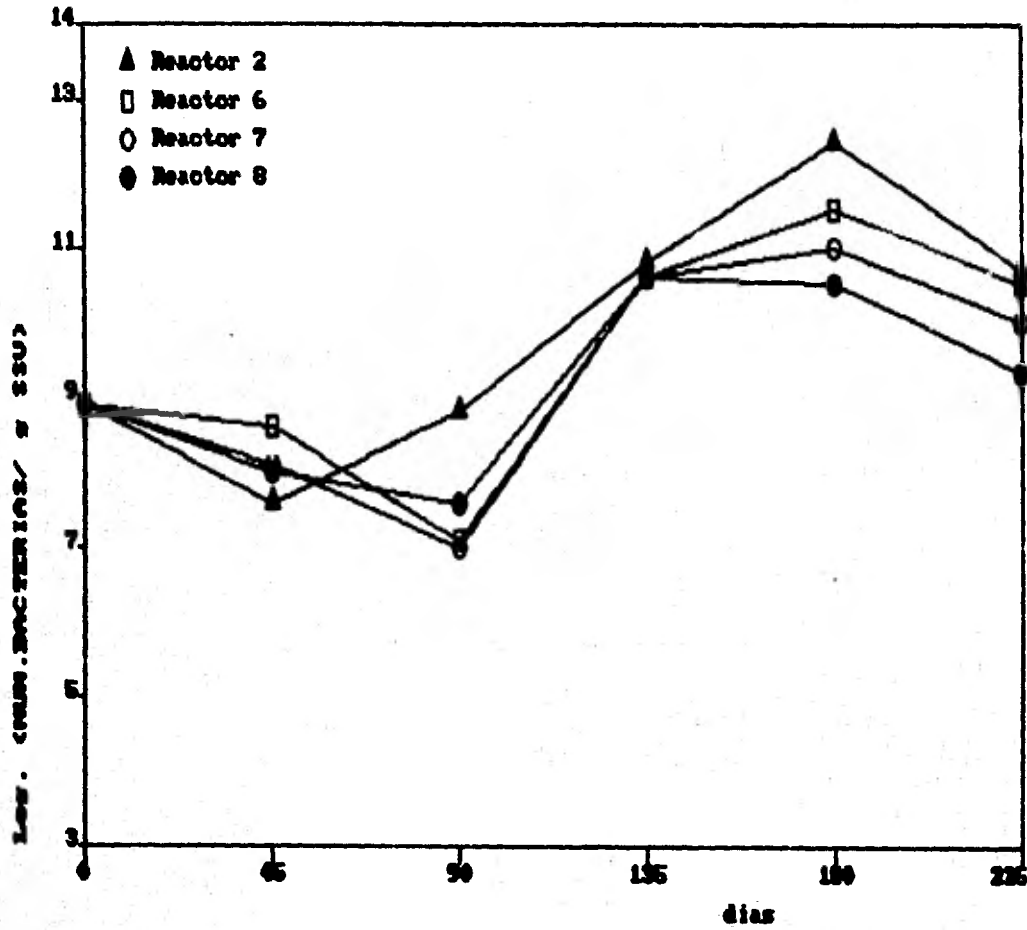


Fig. 4.2.3 Evolución de las poblaciones metanogénicas acetoclásticas en los reactores 2, 6, 7 y 8.



encontrado en el inóculo ( $9.0 \times 10^9$ ) con los observados al finalizar el experimento. Así, se tienen  $2.0 \times 10^{10}$  bact/g SSV en el reactor 2,  $1.7 \times 10^{10}$  en el reactor 8,  $7.7 \times 10^9$  para el reactor 7 y finalmente  $3.4 \times 10^9$  bact/g SSV en el reactor 6. Por otra parte, al analizarse la población de bacterias que utilizan el butirato, al terminó del estudio se encontró un mayor número en los reactores 2 ( $2.0 \times 10^{10}$  bact/g SSV) y 6 ( $2.1 \times 10^{10}$ ) que en los reactores 7 ( $7.7 \times 10^9$ ) y 8 ( $6.9 \times 10^9$  bact/g SSV).

Como se puede observar en la fig. 4.2.3 durante los primeros días el número de bacterias acetoclásticas encontradas en los reactores disminuyó con respecto al del inóculo. En el caso del reactor 2 es muy posible que se deba a los bajos valores registrados en el pH durante estos días, ya que la glucosa al fermentarse produjo grandes cantidades de ácidos; una vez que se resolvió este problema agregando bicarbonato de sodio, se dieron las condiciones apropiadas para el crecimiento de dichas bacterias. De cualquier forma, y con excepción del punto anterior en este reactor se observó el mayor contenido de bacterias acetoclásticas que los otros 3 reactores a lo largo del estudio.

Por otra parte el reactor 6 no presentó este descenso tan marcado en el número de bacterias acetoclásticas en los primeros días de funcionamiento del reactor. Ello puede explicarse considerando la naturaleza de este sustrato. Los grupos  $-NH_2$  y  $-COOH$  libres de las uniones peptídicas cuando se hidrolizan las proteínas pueden contribuir a la capacidad del sistema a resistir cambios en el pH. Cuando la mayoría de los grupos ionizables en las proteínas o sus constituyentes aminoácidos en aguas de desecho muestran valores de pK cercanos a la neutralidad, el sistema puede exhibir capacidad buffer para mantener un pH neutro sin la necesidad de agregar ácidos o bases para su control (Gaudy & Gaudy, 1981), factor determinante e indispensable para el crecimiento de las bacterias metanogénicas. Sin embargo, alrededor de los 90 días el número de bacterias metanogénicas disminuye sin ninguna razón aparente para nuevamente incrementarse hacia los 135 días (3er

muestreo), independientemente de haber sufrido el accidente causado por la ruptura del reactor después de este muestreo. El número de bacterias acetoclásticas encontrado siguió en aumento a pesar de ser evidentes las diferencias en las características morfológicas (color y textura) así como de sedimentación en los lodos recuperados; sin embargo, al finalizar el experimento sí se observa una disminución en el número de bacterias (tendencia general).

En lo que respecta al número de bacterias acetoclásticas encontradas en los reactores 7 y 8 este es muy parecido hasta el 3er. muestreo (135 días). En el 4o. muestreo, el reactor 7 presenta un número ligeramente mayor que el del reactor 8, (el cual se mantiene prácticamente con la misma cantidad de bacterias acetoclásticas. Aquí cabe señalar que esta diferencia pudo ser ocasionada por el suministro de glucosa (0.1 g/l) que se proporcionó al reactor 7 el día 101 de operación. El objetivo de agregar glucosa fue para que al degradar este sustrato las bacterias anaerobias facultativas consumieran el oxígeno disuelto en el medio y así abatir el potencial redox. Al finalizar el estudio se observa que nuevamente disminuye la cantidad de bacterias acetoclásticas a niveles un poco menores a las encontradas anteriormente (otra vez tendencia general). Sobre todo el efecto temporal de la glucosa se ve en los parámetros entrada/salida. Por otra parte también se encuentra una disminución de bacterias acetoclásticas en el reactor 8 a los 225 días, pero esta es más acentuada que la observada en el reactor 7. El haber agregado en el reactor 8 sulfato ferroso (0.5 g/l) en forma continua durante 6 meses, ocasionó posiblemente una acumulación excesiva de sulfuro ferroso en la cama aumentando el contenido de material mineral y disminuyendo la actividad metanogénica de los lodos; asimismo se observó una caída del pH en esta última etapa del estudio, lo que parece indicar la inhibición de las bacterias metanogénicas en esta fecha.

Otro hecho importante de mencionar es que probablemente la mayor carga orgánica con la que se arrancaron los reactores 7 y 8 y

además en este último la presencia de sulfato ferroso no propiciaron un buen desarrollo de las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas comparando los números encontrados en estos dos reactores con respecto a los presentados en los reactores 2 y 6 (Fig. 4.2.4).

De Zeeuw (1988) analizó los tipos de lodos formados en reactores UASB alimentados con AGV y los relacionó con su arranque, clasificando los granos en 3 tipos. Los granos de tipo A que son aquellos de forma esférica compacta compuestos principalmente de bacterias en forma parecidas a Methanothrix soengenii; el tipo B son granos más o menos esféricos constituidos de bacterias filamentosas difusamente entretejidas adheridas a partículas inertes, en donde también se observan frecuentemente bacterias parecidas a Methanothrix soengenii. Los granos de tipo C, de forma esférica compacta, compuestos predominantemente por bacterias del tipo de Methanosarcina.

Durante el arranque, cuando se selecciona los flóculos con mejores características de sedimentación, Methanothrix se adhiere a partículas acarreadoras presentes en los lodos de siembra, desarrollándose granos de tipo B, o bien formándose granos densos (granos tipo A). Por otro lado Methanosarcina no se conoce que se adhiera fácilmente a superficies, aunque se sabe bien su capacidad de formar agregados (Zhilina, 1976). De tal manera que su retención dentro del reactor dependerá de que los granos hayan crecido lo suficientemente para sedimentar, en tanto las células solas y los pequeños conglomerados de esta bacteria serán lavados del reactor. La tasa de crecimiento reportada para este organismo en concentraciones de 1 % de acetato es de  $1.0 \text{ d}^{-1}$  (Mah, 1980); se ha calculado (de Zeeuw, 1988) que en una concentración promedio de acetato ( $1.0 \text{ kg/m}^3$ ) se desarrollará un grano macroscópico en alrededor de un mes cuando se parte de una sola célula. En cambio la tasa de crecimiento en cultivos puros de Methanothrix a  $30^\circ \text{ C}$  es de  $0.14 \text{ d}^{-1}$  (Huser et al., 1982); siendo de alrededor de un séptimo de la de Methanosarcina; esto llevaría aproximadamente a 180 días el formar un grano macroscópico a

partir de una célula. Sin embargo, se han observado granos macroscópicos compactos formados principalmente de Methanothrix después de 30 o 45 días del arranque. Esto puede implicar que la tasa de crecimiento de Methanothrix soengenii en cultivos mixtos sea más alta que en cultivos puros, o que especies diferentes estén involucradas o bien que granos microscópicos (que consistan de más de 500.000 bacterias) estén ya presentes en el lodo de siembra (de Zeeuw, 1988).

Considerando lo expuesto, se puede pensar que dada la carga orgánica con la que se arrancaron los reactores 7 y 8, la concentración de acetato fue alta, dándose así condiciones favorables para el crecimiento de Methanosarcina y quedando fuera de competencia Methanothrix. Esta hipótesis puede ser apoyada por el hecho de que durante la operación del reactor 7 no se alcanzó su estado estable y de acuerdo con Wiegant (1988) se seleccionará la formación de granos de Methanosarcina cuando la concentración de acetato sea alta lo cual llevará eventualmente a procesos de operación inferiores, además, en el caso del reactor 7 es importante considerar que debido al tipo de sustrato con el que fue alimentado (mezcla AGV) no se alcanzaron las condiciones de oxidación-reducción de acuerdo a los resultados encontrados al finalizar el experimento (+11 mV), por lo cual no se logró el desarrollo adecuado de la población metanogénica.

Por otra parte, la diferencia entre las estabilidades de operación entre el reactor 7 y 8 muestra que el papel del sulfato ferroso fue decisivo, hecho que se detallará más adelante. Sin embargo este compuesto pudo influir en las diferencias encontradas al final del experimento entre los NMP de las bacterias acetoclásticas.

En lo que respecta a las bacterias hidrogenofílicas, estas se encontraron generalmente en mayor cantidad que las bacterias acetoclásticas a lo largo del experimento en todos los reactores y se presentan en mayor cantidad alrededor de los 135 días es decir antes de los crecimientos máximos de las bacterias

### Bacterias Hidrogenofilicas

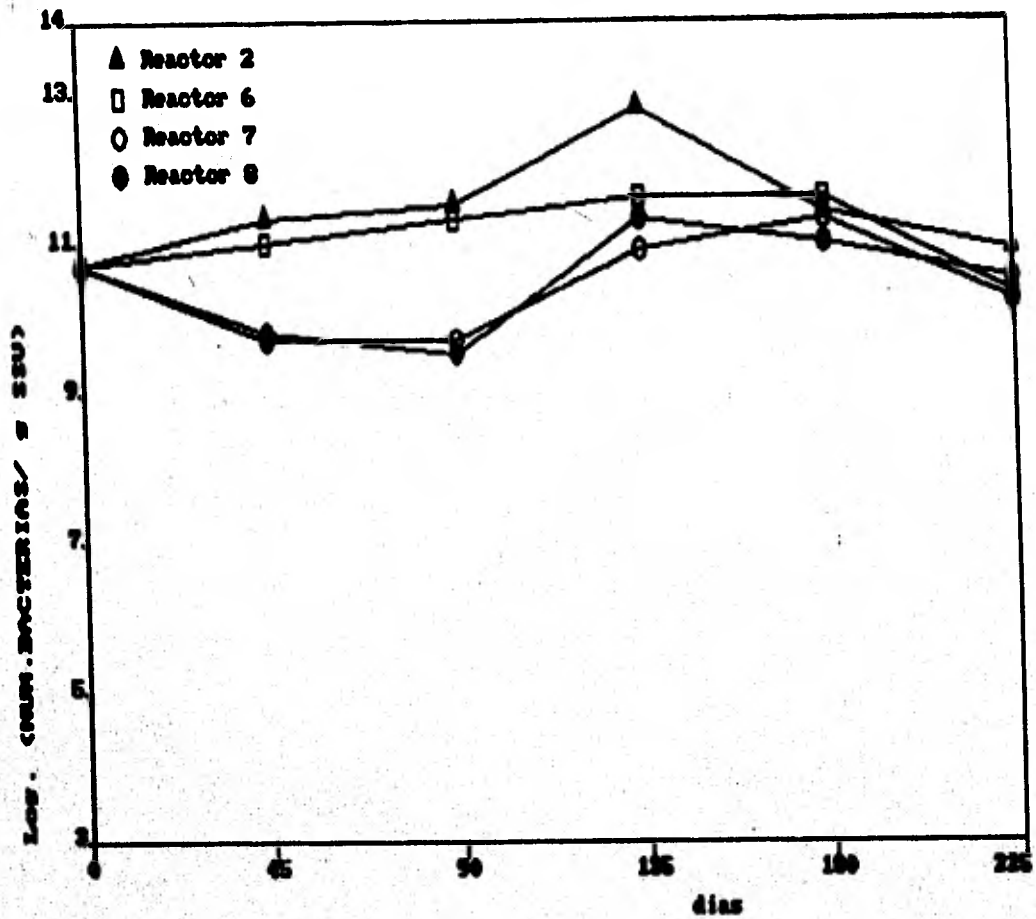


Fig. 4.2.4 Evolución de las poblaciones metanogénicas hidrogenofilicas en los reactores 2, 6, 7 y 8.

acetoclásticas (135 días).

En el reactor 2 y 6 se encuentran los mayores números de bacterias hidrogenofílicas, seguidas del reactor 8 y por último el reactor 7, esto al parecer va en relación al sustrato con el que fueron alimentados los reactores, ya que tanto la fermentación de la glucosa como de proteínas forman grandes cantidades de hidrógeno, y este a su vez tendrá que ser removido por la población metanogénica autotrófica para que sea posible la degradación de los ac. propiónico y butírico y proceda la metanogénesis a partir del acetato que representa la mayor parte del proceso (73%). Por otra parte, cuando se alimentan los reactores con una mezcla de AGV, el hidrógeno formado durante su rompimiento será menor que el formado en los reactores 2 y 6.

Un hecho interesante se presenta en el reactor 8 en donde la adición de sulfato ferroso parece que favoreció el crecimiento de las bacterias hidrogenofílicas en comparación con el reactor 7, lo cual hasta cierto punto se esperaría que hubiera sido contraria por la competencia por el hidrógeno con las sulfatorreductoras, dadas las diferencias en las constantes de afinidad para el hidrógeno ( $K_m$  BSR 1  $\mu$ M;  $K_m$  BM 6  $\mu$ M).

Es necesario mencionar que al realizar la prueba de NMP se les provee de sustrato en exceso a las bacterias, de tal manera que si no existió limitación de hidrógeno y no existió fuente de azufre para las bacterias sulfatoreductoras no hubo competencia entre estas y las bacterias metanogénicas. De manera que el crecimiento de las hidrogenofílicas fue favorable.

Por otra parte, Schink y Thauer (1988) consideran que la competencia entre estas bacterias, tanto para el hidrógeno como para el acetato, interpretadas como simplemente una consecuencia de diferencias en las constantes de afinidad al sustrato (Kristjansson *et al.*, 1982; Shönheit *et al.*, 1982; Kristjansson y Shönheit, 1983) deben ser revisadas para dar importancia a la estructura de los granos. En efecto, la eficiencia en la

transferencia de metabolitos entre diferentes grupos tróficos en una comunidad microbial mixta dependerá en alto grado de la distancia difusional entre los organismos asociados. Es así que, una alta heterogeneidad de la microestructura influenciaría el resultado de la competencia en una comunidad más que las diferencias en las afinidades al sustrato.

Se ha encontrado un efecto estimulante sobre la metanogénesis en digestores alimentados con acetato (van der Berg et al., 1980) cuando interactúan el sulfato y el hierro en concentraciones superiores a 0.6 mM y 0.5 mM respectivamente, debido a la formación de precipitados de sulfuro. Se sabe en este caso que el sulfuro precipitado puede aún ser utilizado por las bacterias acetoclásticas.

Estudios realizados por Guyot y Traore (1985) en un cultivo mixto de una bacteria sulfatorreductora utilizadora de propionato con Methanosarcina barkeri, en presencia de sulfato y de propionato, demostraron que el acetato producido podía ser utilizado por M. barkeri, solo si se encontraba presente el  $Fe^{+2}$  para precipitar el sulfuro producido, evitando la inhibición por altos niveles de sulfuro solubles sobre la acetoclastia. De acuerdo con Guyot (1988) los sulfuros además de ser una fuente de azufre para la célula, mejoran las condiciones reducidas del medio, lo cual favorece a las bacterias metanogénicas ya que requieren de potenciales alrededor de - 300 mV para su desarrollo (Gujer y Zender, 1983). A este respecto se realizó al final del experimento la medición de los potenciales de oxido-reducción entre los reactores 7 y 8 y se encontraron valores de + 11 mV y - 181 mV respectivamente.

#### 4.2.3 EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES METANOGENICAS

En la Tabla 4.2.7 se presentan las cinéticas de degradación del acetato a los 135 días (3er muestreo), a los 225 días (5o. muestreo) se presentan tanto para el acetato como para el propionato y el butirato. En el inóculo se trato de seguir la cinética del acetato, pero no se observó durante 6 horas que fue el tiempo en que se realizó la prueba.

La mayor actividad encontrada para el acetato fue en el reactor 2 a los 135 días con un valor de 0.83 mmol/g SSV/h. Esta disminuyó al transcurrir el tiempo ya que a los 225 días fue de 0.4 mmol/g SSV/h. Por otra parte, la actividad acetoclástica para el reactor 7 y 8 fue de 0.33 mmol/gSSV/h a los 135 días, y descendió ligeramente en el reactor 8 al final del experimento (225 días) encontrándose 0.31 mmol/g SSV/ h; en cambio, el reactor 7 incremento su actividad a 0.40 mmol/g SSV/h. Finalmente, la cinética de degradación para el acetato en el reactor 6 fue la más baja con un valor de 0.05 mmol/g SSV/ h.

En relación a las actividades para el propionato y butirato en el reactor 2 no se lograron medir ya que se presentaron problemas con el equipo para su determinación (cromatografo de gases), en tanto estas actividades tampoco se obtuvieron en el reactor 6 ya que durante 6 horas no se observó su degradación.

En el reactor 7 se encontró mayor actividad para el butirato (0.58 mmol/g SSV/ h) que en el reactor 8 (0.18 mmol/g SSV/ h), la degradación del propionato no se observó en el reactor 7 y en el reactor 8 fue muy baja (0.01 mmol/g SSV/ h).

Al relacionar las actividades metanogénicas con los NMP ( $7 \times 10^{10}$  3er muestreo y  $5.6 \times 10^{10}$  5o. muestreo) en las mismas fechas se encuentra que a los 135 días el número de bacterias/ g SSV en el reactor 2 se encontraban en mayor cantidad que a los 225 días, no obstante esto no explicaría la diferencia tan



-tabla 4.2.3 PARAMETROS CINETICOS DE METANOGENESIS POR LODOS GRANULARES

	$S_0$ (mM)	SSV (%)	SST (g/l)	SSVT (g)	$V_{max}$ (mmol/l/h)	$k_{sp}$ (mmol/gSSV/h)	$k_{spT}$ (mmol/h)	$V_{max}/q_{SST}$
<b>ACETATO:</b>								
R 2 (3erN)	23.0	73	5.0		3.04	0.83		0.6
(5o.N)	10.1	78	5.7	15.03	1.8	0.40	6.01	0.3
R 6 (3erN)	8.0	86	7.1		0.3	0.05		0.04
(5o.N)	6.4	86	4.5	10.73	0	0	0	0
R 7 (3erN)	9.2	62	3.0		0.6	0.33		0.2
(5o.N)	8.1	67	4.8	4.41	1.3	0.40	1.8	0.27
R 8 (3erN)	8.4	38	17.9		2.2	0.33		0.12
(5o.N)	6.6	33	30.6	28.88	3.15	0.31	8.7	0.10
<b>BUTIRATO:</b>								
R 7 (5o.N)	8.8	67	4.8	4.41	1.9	0.58	2.5	0.39
R 8 (5o.N)	8.0	33	30.6	28.88	0.92	0.18	5.2	0.03
<b>PROPIONATO:</b>								
R 8 (5o.N)	7.2	33	30.6	28.88	0.13	0.01	0.29	0.0004

grande (40%) en las actividades. Nuevamente se debe considerar que en ambas pruebas se dan condiciones óptimas para el crecimiento, pero en el caso del NMP se maceran los lodos de tal manera que se pueden alterar las condiciones sintroficas entre los organismos.

En cuanto al reactor 6, también es ligeramente mayor el NMP de bacterias acetoclásticas a los 135 días ( $4.0 \times 10^{10}$  bact/g SSV) que a los 225 días ( $3.3 \times 10^{10}$  bact/g SSV) y las actividades también decrecen (considerando que cambio la población bacteriana a partir de su ruptura). Sin embargo, es en especial interesante preguntarse porque no fue posible seguir la degradación de los AGV en este reactor alimentado con albúmina. De acuerdo a Field (1987) la actividad metanogénica está relacionada con la cantidad de tiempo que el lodo tiene para adaptarse al sustrato usado. Generalmente durante la primera alimentación el lodo está adaptándose así mismo a los AGV del sustrato. Considerando que el sustrato original es la proteína cuyos aminoácidos son convertidos fácilmente en metano pero no en forma directa ya que de 10 a 20 % de los aminoácidos son aromáticos (p.e. fenilalanina y tirosina). En principio, estos compuestos son degradados lentamente, pero una vez que el lodo está adaptado serán degradados rápidamente, el período de retraso refleja el tiempo necesario para que las bacterias produzcan la enzima proteasa. Teniendo en cuenta esto entonces podríamos pensar que al cambiar las condiciones de los lodos al alimentarlos con acetato se requirió de otra etapa de adaptación, ya que parece presentarse una inhibición en la degradación de los AGV cuando no provienen de la proteína como fue en este caso al realizarse la prueba de actividad metanogénica. En relación a esto Tempest *et al.* (1970) señala que un incremento en la tasa de catabolismo resulta en cambios en el tamaño de pool de los metabolitos y coenzimas en la célula.

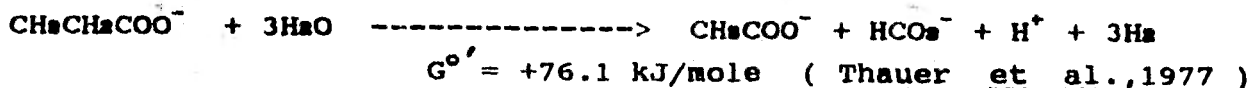
Las actividades metanogénicas para el acetato en el reactor 7 y 8 son las mismas a los 135 días (33 mmol/gSSV) y los números de bacterias son muy similares entre ambos reactores en este

tiempo ( $4.3 \times 10^{40}$  y  $3.7 \times 10^{40}$ ). Al final del experimento fue menor la actividad para el acetato en el reactor 8 que en el 7, y las poblaciones acetoclásticas siguen también este orden, lo cual hace pensar que se debiera a las condiciones favorables que se les proporciona al realizar ambas pruebas.

Las actividades encontradas con el butirato al final del experimento son mayores para el reactor 7 que en el reactor 8 así como también la población utilizadora de butirato, por otro lado no se observó actividad para el propionato en el reactor 7 y en el reactor 8 fue muy baja, y la población utilizadora fue mayor en el reactor 8.

La acumulación del propionato se puede explicar por el hecho de que su conversión anaerobia es termodinámicamente menos favorable que para el acetato o butirato (Conrad et al., 1986), a causa de las bajas tasas de crecimiento específico de la población que oxida el propionato (Zenhder & Koch, 1983) requiere de un tiempo largo para su adaptación. Lo que podría implicar que no estuvieran activas en los reactores.

Durante la degradación completa de la materia orgánica bajo condiciones anaerobias, cerca del 15% del carbono total es degradado vía propionato como un intermediario (Kaspar & Wuhrmann, 1978 ; Gujer & Zender, 1983). El propionato es oxidado a acetato, dióxido de carbono e hidrógeno de acuerdo a la siguiente reacción:



Debido a la extrema positividad  $G^{\circ'}$ , la degradación del propionato es solo posible cuando el hidrógeno es removido por las bacterias metanogénicas (Zehnder & Koch et al., 1983) Aunque alguna información esta disponible acerca de la cinética de ruptura (Kaspar y Wuhrman, 1978a; Zenhder & Koch, 1983) poco se sabe acerca de la vía bioquímica de oxidación del propionato.

## 5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten hacer las siguientes conclusiones:

- El tiempo de retención hidráulica (TRH) es un parámetro que afecta la granulación.

Con tiempos de 6 y 12 horas de TRH y velocidades ascensionales muy bajas, de 0.05 y 0.02 m/h respectivamente se obtuvieron más rápidamente (90 días) lodos con mejores IVL (30 ml/g; 32.3 ml/g) que a TRH de 24 h y velocidades ascensionales de 0.01 m/h (IVL 49.9 ml/g), debido a la selección de lodos con buenas características de sedimentación durante el arranque.

El TRH marcó diferencias en el tamaño de grano al final de la experimentación (225 días). A menor tiempo de retención hidráulica (6, 12 y 24 h) mayor diámetro alcanzado (2.0 mm,  $s = 0.45$ ; 1.7 mm,  $s = 0.50$  y 1.5 mm,  $s = 0.32$  respectivamente).

Las actividades específicas de los lodos muestran su potencialidad en los reactores encontrándose valores en el  $R_s$  de 0.31 Kg DQO/ Kg SSV.d mientras el observado en el reactor fue 0.10 Kg DQO/Kg SSV.d, en el  $R_s$  0.61 Kg DQO/ Kg SSV.d, 0.33 Kg DQO/ Kg SSV.d y finalmente en el  $R_s$  0.46 Kg DQO/Kg SSV.d, 0.52 Kg DQO/Kg SSV.d. Conforme aumenta el TRH las diferencias entre la actividad específica y la actividad real se hacen menores. Asimismo considerando la biomasa producida en cada reactor ( $R_s$  49 g,  $R_s$  15 g y  $R_s$  10 g) fue en orden inverso al TRH, por lo que el tiempo de contacto influyó en las eficiencias encontradas al final del experimento (alrededor del 80%).

- La carga orgánica influyó en el desarrollo de la población

metanogénica.

Una carga orgánica de 5.0 Kg DQO/Kg SSV. d ocasionó acumulación de AGV en el digestor afectando severamente a la población metanogénica.

Se presentó una mayor actividad específica (0.83 mmol/g SSV/h) en lodos alimentados con 1 Kg DQO/Kg SSV.d que en aquellos alimentados a 0.5 Kg DQO/Kg SSV.d (0.24 mmol/g SSV/h) a los 135 días.

El tamaño de grano se vió influenciado por la carga orgánica a 1 Kg de DQO/Kg SSV .d se alcanzó un diámetro promedio de 1.7 mm  $\pm$  0.5 en tanto a 0.5 Kg DQO/Kg SSV . d fue de 1.4 mm  $\pm$  0.31.

- El tipo de sustrato influenció fuertemente la formación de granos en los reactores.

La albúmina favoreció un mejor IVL, seguido de la glucosa y AGV, presentandose valores de 14 ml/g (día 135) para los lodos alimentados con albúmina, 28.9 ml/g para los de glucosa y 41.4 ml/g con AGV.

Se alcanzaron diámetros de grano mayores con glucosa (1.7 mm, s = 0.5) y albúmina (1.2mm, s = 0.42) en comparación con los AGV (0.6 mm, s = 0.16) y AGV más sulfato (0.7 mm , s = 0.25).

En general se presentaron mayor número de bacterias en los reactores alimentados con glucosa y albúmina. El log del número total de bacterias en los reactores fue: En el R<sub>6</sub> Acetoclásticas 11.9, Hidrogenofílicas 12, R<sub>5</sub> Acetoclásticas 11.7, Hidrogenofílicas 12.6, R<sub>7</sub> Acetoclásticas 10.7, Hidrogenofílicas 10.8, R<sub>8</sub> Acetoclásticas 10.8, Hidrogenofílicas 12.

- Los resultados encontrados apoyan la teoría de Sam Soon et al

(1988) la cual indica:

- a) La granulación en sistemas anaerobios se debe a la acción de organismos metanogénicos del tipo de Methanobacterium Strain AZ el cual utiliza el  $H_2$  como única fuente de energía, puede producir todos sus aminoácidos excepto cisteína, cuando existe deficiencia de este aminoácido y en el medio se dan condiciones de alta presión de hidrógeno, así como amonio disponible producirá polipeptidos extracelulares.
- b) La existencia de zonas de alta y baja presión de  $H_2$  como las que se presentan en los reactores de flujo ascendente y semiascendente y el tipo de sustrato del influente son factores que determinan la granulación.
- c) Con sustratos como carbohidratos y proteínas en este tipo de sistemas (UASB) la granulación se presenta debido a la separación de fases; el hidrógeno es liberado durante la fase acidogénica, a presiones parciales altas de hidrógeno pueden crearse las condiciones para la formación de polipeptidos por M.Strain AZ si el medio contiene suficiente amonio disponible.
- d) La granulación es improbable con sustratos que requieren bajas presiones de hidrógeno para su degradación.

En nuestros resultados se tiene:

- 1) Se encuentra el mayor contenido de bacterias hidrogenogénicas en los reactores alimentados con glucosa y albúmina.
- 2) Existe una mayor producción de biomasa en el reactor 1 alimentado con glucosa y con el más alto contenido de nitrógeno (relación DQO:N de 19:5).
- 3) La población acetoclástica en dicho reactor 1 es inferior en un 10% a la de los reactores alimentados con el mismo sustrato a la misma carga orgánica y diferente TRH.

4) No se favoreció la formación de granos en el reactor 7 alimentado con una mezcla de AGV, ya que se requieren presiones parciales bajas de hidrógeno para su degradación.

5) Los lodos formados en el reactor 8 tampoco alcanzaron diámetros mayores debido a la presencia de las bacterias sulfatorreductoras que mantuvieron presiones de hidrógeno bajas por la competencia con las bacteria hidrogenofilicas.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Alibhai K. R y Forster C. F. (1986) "Physicochemical and biological characteristics of sludges produced in anaerobic upflow sludge blanket reactors" Enz. Microbiol. Technol. 8: 601-606.
- APHA-AWNA-WPCF (1985). "Standard Methods for the examination of water and wastewater" 16 th. Edition.
- Archer D.B & Powell G.E.. (1985). "Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen" Arch. Microbiol. 14:133-137.
- Arias Osorio A. y Noyola Robles A. (1988) "Tratamiento de un agua residual urbana mediante el reactor anaerobio de lecho de lodos (UASB)" en Avances de Ingenieria Quimica, Leyva R., Medellin F. y Navarro J. Editores. 477-483.
- Attal A., Ehlinger F., Audic J.M. y Faup G.M. (1988) "pH inhibition mechanisms of acetogenic, acetoclastic and hydrogenophilic populations" en: Anaerobic Digestion 1988. 5th International Symposium on Anaerobic Digestion. E.R. Hall and P.N. Hobson (ed.). Bologna, Italy, 22-26 May, 1988. 71-78.
- Bachmann A., Beard V.L y McCarty P.L. (1985) "Performance Characteristics of the anaerobic baffled reactor" Water Res. 19:99-106.
- Balch W.E., and Wolfe R.S. (1976) "New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanolsulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere" Appl. Environ. Microbiol. 32:781-791.
- Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C. R and Wolfe R. S. (1979) "Methanogens: reevaluation of a unique biological granular sludge at low substrate concentrations" App. Microbiol. Biotechnol. 22:77-81.
- Boari G., Brunette A., Passino R. y Rozzi A. (1984). "Anaerobic digestion of olive oil mill wastewaters" Agricultural Wastes 10: 161-175.
- Brummeler E.ten., Hulshoff Pol L.M., Dolfing J., Lettinga G. y Zehnder A.J.B. (1985) "Methanogenesis in a USAB-reactor at pH 6.0 on an acetate plus propionate mixture" Applied and Environmental Microbiology. 49:1472-1477.
- 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. Mikrobiol. 59:20.
- Byrd J.F. (1961). Combined treatment. en: Proc 16 th Ind Waste Conf, Purdue Univ, Lafayette, Indiana. Ann Arbor Science Michigan, p 92.
- Cail, R.G. & Barford J.P. (1985) "The Development of Granulation in an Upflow Floc Digester and an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Digester Treating Cane Juice Stillage" Biothechnology Letters:7(7):493-498.
- Colleran Emer. (1988) "Report on the techological aspects of granulation" en: Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.). Pudoc Wageningen. Netherlands.



- Conrad R., Schnik B & Phelps T.J. (1986) "Thermodynamics of H<sub>2</sub>-consuming and H<sub>2</sub> producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in situ condition" FEMS Microbiol. Ecol. 38:353-360.
- Dolfing J. y Bloemen W.G.B.M. (1985) "Activity measurement as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments" J. Microbiol. Meth. 4:1-12.
- Dolfing J., Griffioen A., van Neerven A.R.W y Zevenhuizen L.P.T.M. (1985) "Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge" Can. J. Microbiol. 31:744-750.
- Dolfing J. (1985) "Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrate concentrations: The influence of mass transfer limitation" Appl. Microbiol. biotechnol. 22:77-81.
- Dubourguier, H. C., Prensier G., Samain E. & Albagnac G. (1985) "Granular methanogenic sludge" en: Palz, W., J. Coombs & D.O. Hall (ed.): Energy from biomass. Elsevier Applied Science Publishers. 542-546.
- Dubourguier H.C., Prensier G., Albagnac G. (1988) "Structure and Microbial Activities of Granular Anaerobic Sludge" en: Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.). Pudoc Wageningen. Netherlands. 18-33.
- Fajardo C., Guyot J.P., Noyola A. y Barrena C. (1989). "Study of the transition of activated sludge to an adapted anaerobic inoculum for anaerobic digester" FEMS Symposium in Microbiology and Biochemistry of strict anaerobes involved in interspecific H<sub>2</sub> transfer. Marsella-Francia.
- Field Jim. (1987) "Parámetros operativos del manto de lodos anaerobios de flujo ascendente" en Manual del curso: Arranque operacion de sistemas de flujo ascendente con manto de lodos (UASB). Universidad del Valle, Corporación Autónoma Regional del Cauca, Universidad Agrícola de Wageningen. Santiago de Cali. Noviembre 1987. 1B.
- García J.L., Guyot J.P., Olliver B., Trad M. y Paycheng C. (1982) "Ecologie de la degestion anerobie" cha. ORSTOM, ser. Biol. 45:3-15.
- García Rojas S., Silva G. y Guyot. J.P. (1988) "Selección de fuentes potenciales de inóculos naturales para digetores anaerobios" XIX Congreso Nacional de Microbiología. Monterrey, N.L.
- Gaudy A. & Gaudy E. (1981) "Microbiology for Environmental Scientists and Engineers" Mc.Graw-Hill International Book Co. Tokyo Japan. 421-424.
- Guiot, S.R., Gorur S.S., Bourque D. y Samson R. (1988) "Metal effect on microbial aggregation during upflow anaerobic sludge-bed filter (UBF) reactor start-up" en: Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.). Pudoc Wageningen. Netherlands. 187-202.
- Gujer W & Zehder A.J.B. (1983) "Conversion processes in anaerobic digestion" Water Science & Technology. 5:127-167.
- Guyot J.P. (1988). Microbiología de la Digestion Anaerobia. en: Manual del Curso Tratamiento Anaerobico de Aguas Residuales (Microbiología y Bioquímica). Febrero 22 a 26 de 1988. Medellín Colombia.

- Guyot J.P y Ramirez F. (1989) "Inhibition of the anaerobic acetate degradation by formate" Biotechnology Letters 11:365-368.
- Guyot J. P., Noyola A. y Monroy O. (1990) "Evolution of microbial activities and population in granular sludge from an UASB reactor" Biotechnology Letters. 23(2):155-160.
- Harada H., Endo G., Tohya Y. y Momonoi K. (1988) "High rate performance and its related characteristics of granulated sludges in UASB reactors treating various wastewaters" en Poster Papers: Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Edit by A. Tilche & A. Rozzi. Monduzzi Editore. Bologna, Italy, 22-26 May. 1988. 1011-1019.
- Harvey M., Forsberg C.W., Beveridge T.J., Pos J. & Ogilvie J.R. (1984) "Methanogenic Activity and Structural characteristic of the Microbial Biofilm on a Needle-Punched Polyester Support" Applied & Environmental Microbiology, 48(3):633-648.
- Henze M. y Harremoes P. (1983) "Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors (A literature review)" Water Sci. Technol. 15:1-101.
- Heyes R. H & Hall R.J. (1983) "Kinetics of two subgroups of propionate-using organisms in anaerobic digestion" Appl. Env. Microb. 46:710-715.
- Hilton M. G., Turner G. E., Powell G. E. y Archer D.B. (1983) "Methanogenic from acetate, by a mesophilic anaerobic filter" Proc. Bioch. 18:2-5.
- Hulshoff Pol, L., Dolfing Jan., de Zeeuw Willem y Lettinga Gatzke (1982) "Cultivation of well adapted pelletized muthanogenic sludge" Biotechnology Letters. 4(5):329-332.
- Hulshoff Pol, L., Zeeuw W. J., Velzeboer C. T. y Lettinga G. (1983) "Granulation in UASB-reactors" Wat. Sci. Technol. 15:291-304.
- Hulshoff Pol, L.W., van de Worp J.J.M., Lettinga G. & Beverloo W.A. (1986) "Physical characterization of anerobic treatment" A grow-up technology. Aquatich'86. Amsterdam 89-101.
- Hulshoff Pol L.W., Heynekamp K. y Lettinga G. (1988) "The selection pressure as a driving force behind the granulation of anaerobic sludge" en : Granular an anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.). Puduc Wageningen. Netherlands.
- Hungate R.E. (1969) "A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes" 117-132. en: J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed.). Methods in microbiology 3B. Academic Press. Inc. New York.
- Huser B.A., Wuhrmann K. y Zender A.J.B. (1982) "Methanothrix soehngeniigen. gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hidrogen oxidizing methanobacterium" Arch. Micribiol. 132:1-9.
- Kaspar H.F. & Wuhrmann K. (1978) "Kinetics parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge" Appl. Env. Microb. 36:1-7.
- Kristjansson J.K., Schönheit P. y Thauer R.K. (1982) "Different Ks values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing inhibition of methanogenesis by sulfate" Arch. Microbiol. 131:278-282.

- Lara Magaña Marcela. (1990) "Arranque y operación de reactores UASB a escala piloto, bajo diferentes condiciones de alimentación" Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. 177p.
- Lawrence A. L. y McCarty P. L. (1969) "Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment" J. Water. Poll. Control Fed. 41, R1-R7.
- Lettinga G., van Velsen A.F.M., Hobma S.W., Zeeuw W. de & Klapwijk A. (1980) "Use of the upflow sludge blanket (UASB) reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment" Biotechnology and Bioengineering. 29:699-734.
- Lettinga G., Hobma S.M., Hulshoff Pol L.W., Zeeuw W de., Jong P.de Grin. y Roersma R. (1985) "Desing operation and economy of anaerobic treatment. Water Science and Technology. 15:177-195.
- Mah, R.A. (1980) "Isolation and characterization of Methanococcus mazei" Current. Microbiol. 3: 321-326.
- Mc.Carty P.L. (1964) "Anaerobic wastewater treatment fundamentals. Pub. Works. 95 (9):107-112; (10):123-126; (11):91-94; (12):95-99.
- Mahoney E.M., Varangu L.K., Cairns W.L., Kosaric N., Murray W.L. (1987) "The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up" Wat. Sci. Tech. 19:249-260.
- McInerney M.J., Bryant M.P. & Pfenning N. (1979) "Anaerobic bacterium that degrades fatt y acids in syntrophic asociation with methanogens" Arch. Microbiol. 122:129-135.
- McInerney, M.J., Bryant M.P. (1980) "Review of Methane Fermentation Fundamentals" en Fuel Gas Production From Biomass Chapter 2. Ed. Plenum Press, New York.
- McInerney, M. J. y Bryant M.P. (1981) "Basic principles of bioconversion in anaerobic digestion and methanogenesis" en Biomass Covernion Processes for energy and Fuels, Sofer S.S. y Zaborsky O.R. (ed.). Plenum Publishing corp. 277-296.
- Novaes R.F.V. (1986) "Microbiology of anaerobic digestion "en: Anaerobic Treatmen in Tropical Countries. International Seminar held at CETESB. Pergamon Press (ed.). Sao Paulo, Brazil, 25-29 August 1986. 1-14.
- 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" VI Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. A.C., Querétaro, Qro. 10 a 13 de Agosto 1988.
- Noyola A., Guyot J. P y Monroy O. (1988) "Comparation experimentalde dos tipos de reactores anaerobios avanzados" Proceedings of the 1rst National Symposium on Environmental Engineering, Mexico City, Mexico. 179-197. Instituto de Ingeniería, UNAM (ed.)
- Noyola A., Moreno G., Calderon C. y González- Ugalde L. (1990) "Digestion de lodos de purga para su tratamiento y transformación en inóculo anaerobio granular. Informe Instituto de Ingeniería UNAM.
- Pette K.C., De Vlelter R., Wind E. y van Gils W. (1981) "Full-scale anaerobic treatment of beet-sugar wastewater"

- Proc. of the 35th ind. Waste Conf., Purdue Univ. 635-642.
- Prensier G., Dubourguier H.C., Thomas I., Albagnac G. y Buisson M.N. (1988) "Specific immunological probes for studying the bacterial associations in granules and biofilms" en: Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.). Pudoc Wageningen. Netherlands. 55-61.
- Rojas Chacón O. (1988) "Factores ambientales que inciden en la aplicación de los procesos anaerobios" en: Manual del curso de tratamiento anaerobios de aguas residuales. Medellín Colombia.
- Ross W.R. (1984) "The phenomenon of sludge pelletization in the anaerobic treatment of a maize processing waste. Water S A 10(4):197-204.
- Sam-Soon P.A.L.N.S., Loewenthal R.E., Dold P.L y Marais G v R. (1988) "Pelletization in upflow anaerobic sludge bed reactors" en: Anaerobic Digestion 1988. 5th International Symposium on Anaerobic Digestion. Hall E.R. y Hobson N.P.(ed.). Bologna, Italy, 22-26 May, 1988. 55-60.
- Smith, P.H., y Mah R. A. (1986) "Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion" Appl. Microbiol. 14:368-371.
- Snick B. y Thauer R.K. (1988) "Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation" en: Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.). Pudoc Wageningen. Netherlands. 1-17.
- Speece Richard E. (1983) "Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment" Environmental Science & Technology. 7:416a-427a.
- Stronach S.M., Rudd T. y Lester J.M. (1986). Anaerobic Digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1986. Germany. 59-68, 149-158.
- Switzbaum M. S y Jewell W.J. (1980) "Anaerobic attached-film expanded bed-bed reactor treatment" J. Water Poll. Control Fed. 52:1953-1965.
- Switzbaum M.S., Sheehan K. S. y Hickey R.F. (1984) "Anaerobic treatment of primary effluent" Env. Tech. Let. 5:189-200.
- Tait S.J. y Friedman A. A. (1980) "Anaerobic rotating biological contactor for carbonaceous wastewaters" J. Water Poll. Control Fed. 52:2257-2269.
- Thauer R.K., Jungermann K. & Decker K. (1977). "Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria" Bacteriol. Rev. 41: 100-180.
- Tomei F.A., Maki J.S y Michel R. (1985) "Interactions in syntrophic associations of endospore-forming, butyrate-degrading bacteria and H<sub>2</sub>-consuming bacteria" Appl. and Env. Microbiol. 50: 1244.
- Young J.C. & McCarty P.L. (1969) "The anaerobic filter for waste treatment" J. Wat. Pollut. Control Fed. 41:160-173.
- van den Berg y Lentz C.P. (1979) "Comparasion between up and down flow anaerobic fixed film reactors or varying surface-to-volume ratios for the treatment of bean blanching waste" Proc. 34th Purdue Indust. Waste Conf. 319-325.
- van den Berg L., Lentz C.P. y Armstrong D.W. (1980) "Anaerobic waste treatment efficiency comparasions between fixed film

- reactors, contact digesters and fully mixed, continuously fed digesters" en Proc. 35th Purdue Ind. Waste Conf. 788-793.
- Weigant W.M y de Man W.A. (1985) "Granulation of biomass in thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor treating acidified wastewaters" Biotechnology and Bioengineering. 28: 718- 727.
- Weigant W.M. (1988) "The spaghetti theory on anaerobic granular sludge formation, or the inevitability of granulation" en: Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.). Pudoc Wageningen. Netherlands. 146-152.
- Wu W., Hu J., Gu X., Zhao Y., Zhang H. y Gu G. (1987) "Cultivation of anaerobic granular sludge in UASB reactors with aerobic activated sludge as seed" Water Res. 21(7):789-799.
- de Zeeuw W. y Lettinga G. (1980) "Acclimation of digested sewage sludge during start-up of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. 35th Ind. Waste Conf. Purdue University.
- de Zeeuw W. (1988) "Granular sludge in UASB-reactors" en: Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. GASMAT (ed.) Pudoc Wageningen. Netherlands. 132-145.
- Zegers F. (1987) "Microbiología" en: Curso sobre Arranque y operacion de sistemas de flujo ascendente con manto de lodos UASB. Universidad del Valle, Corporación Autónoma Regional del Cauca, Universidad Agrícola de Wageningen. Santiago de Cali. Noviembre 1987. A1.
- Zehnder A.J.B. & Koch M. E. (1983) "thermodynamic and kinetic interactions of the final steps in anaerobic digestion. en : Proc. Eur. Symp. Anaerobic waste Water Treatment. Noordwijkerhout, the Netherlands. 86-96.