

## **Evaluación de la biomasa en el lodo granular anaerobio en reactores por carga**

**Magaly Chávez, Donaldo Mejías, Marielba Masy Rubí, Alejandro Escorihuela, Elsa Chacín y Nola Fernández**

Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA), Facultad de Ingeniería, La Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela.

E-mail: [mjchavezd@hotmail.com](mailto:mjchavezd@hotmail.com)

### **Resumen**

En el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica la biodiversidad es muy compleja, tanto, que se han reportado más de 130 especies en un digestor anaerobio. Debido a esto, es de interés establecer la identidad de los grupos fisiológicos presentes en el lodo utilizado en reactor anaerobio. En esta investigación se determinó la biomasa bacteriana como expresión de los diferentes grupos fisiológicos presentes en el lodo anaerobio, así como su relación con el incremento de la DQO utilizando reactores por carga y glucosa como única fuente de carbono. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron 1000, 2000 y 3000 mg/L de DQO, con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 24 hr y a una temperatura de 37 °C; los parámetros evaluados fueron DQO, alcalinidad, pH, SSV y producción de metano, mientras que la biomasa fue estimada mediante la concentración de proteínas. Los resultados muestran la existencia de una ecología microbiana extensa, disgregada en grupos fisiológicos que, en conjunto, forman la biomasa del lodo, la cual incrementa desde 492,53 hasta 560,2 µg/mL en la medida que aumenta la DQO bajo unos parámetros físico-químicos cuyos resultados muestran la eficiencia del sistema anaerobio. Los resultados fueron homogéneos a lo largo del proceso de degradación anaeróbica mostrando que las variaciones de los parámetros físico-químicos inherentes al mantenimiento del reactor anaerobio mesófilo, no influyeron en la biodiversidad encontrada.

**Palabras clave:** Biomasa, lodo granular, reactor por carga.

### **Evaluation of the biomass in the sludge granular anaerobic in batch reactors**

#### **Abstract**

In the process of anaerobic degradation of the organic matter the biodiversity is very complex, so much that has been reported more than 130 species in a anaerobic digester,

due to this it is of interest to establish the identity of the physiologic groups present in the sludge used in anaerobic reactor. In this investigation the bacterial biomass was determined as expression of the different physiologic groups presented in the anaerobic sludge, as well as its relationship with the increment of the COD using batch reactors and glucose like only source of carbon. The concentrations of used substrate were 1000, 2000 and 3000 mg/L of COD, with a hydraulic retention time (HRT) of 24 hr and a temperature of 37°C; the evaluated parameters were COD, alkalinity, pH, VSS and methane production, while the biomass was measurement by means of the concentration of proteins. The results showed the existence of an extensive microbial ecology, disintegrated in physiologic groups that on the whole form the biomass of the sludge that is increased among 492.53 up 560.2 µg/mL in the measure that the COD increases some parameters physical-chemical such as they showed the efficiency of the anaerobic system. The results were homogeneous along the process of anaerobic degradation showing that variations of the inherent physical-chemical parameters to the maintenance of the mesophilic anaerobic reactor, no influenced in the found biodiversity.

**Key words:** Biomass, granulated sludge, batch reactor.

Recibido: 27-09-2002. Aceptado: 03-10-2003.

## Introducción

Las investigaciones que se siguen a nivel mundial con el fin de optimizar el uso de digestores anaerobios para degradar desechos orgánicos a gran escala, han revelado la importancia de las interacciones metabólicas para entender la microbiología de la digestión anaerobia [2, 4].

La evolución del funcionamiento en los reactores anaerobios en términos de eficiencia del proceso y su estabilización son monitoreados a través de la estimación de remoción de materia orgánica, la composición del biogás producido, pH, alcalinidad y sólidos suspendidos totales y volátiles. Sin embargo, los estudios para la determinación de la biomasa en el lodo granular anaerobio son escasos [7], por lo cual el objetivo de este trabajo consistió en determinar la biomasa del lodo granular, detectar los grupos fisiológicos más frecuentes y establecer una relación entre el incremento de la demanda química de oxígeno (DQO) y la producción de la biomasa utilizando reactores por carga (tipo batch) y glucosa como única fuente de carbono, como un aporte a la interpretación de los fenómenos que ocurren durante la degradación anaerobia de la materia orgánica.

## Metodología

La metodología utilizada consistió en el montaje de un reactor por carga a escala de laboratorio, el cual fue inoculado con lodo granular mesófilo (37°C) proveniente de un reactor UASB de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera de la región. El arranque del reactor se inició con la fase de aclimatación (1000 mg/L de DQO) y posteriormente se incrementó la concentración del sustrato a 2000 y 3000 mg/L de DQO y tiempo de retención hidráulico de 24 hr y una temperatura de operación de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Los siguientes grupos fisiológicos bacterianos fueron detectados, de acuerdo con la metodología convencional: bacterias fermentadoras de glucosa (BF) [6]; bacterias nitrato reductoras (BNR) [1, 6]; bacterias sulfato reductoras (BSR) [5] y microorganismos metanogénicos (MM) [2]. La identificación de los géneros bacterianos más frecuentes dentro del reactor anaerobio, durante el proceso de degradación de la materia orgánica, se realizó de acuerdo con Edward y Edwin [8] y Luengo [10]. El estudio de los microorganismos no metanogénicos se realizó mediante la suspensión de una muestra de lodo anaerobio en buffer fosfato y utilizando tioglicolato de sodio como agente reductor.

Los parámetros físico-químicos: demanda química de oxígeno (DQO), alcalinidad total, pH, sólidos suspendidos volátiles (SSV), producción de metano, fueron evaluados siguiendo la metodología referenciada en Estándar Métodos [1]. La biomasa es representada como el contenido de proteína para estimar las poblaciones bacterianas presentes en el lodo y fue determinada mediante el sonicado de un volumen de lodo, según la técnica modificada de Guiot et al. [9] y Quarmby y Forster [12]; luego se tomó 1 mL de lodo granular sonicado y se adicionó 4 mL de ácido tricloroacético (6,28%). La mezcla se centrifugó durante 30 min a 200 rpm. Con diferentes diluciones del precipitado se determinó la concentración de proteínas de acuerdo con el método de Lowry, utilizando albúmina como patrón, tal como lo reportaron Brito et al. [3], Guiot et al. [9], Mizuno et al. [11], Quarmby y Forster [12].

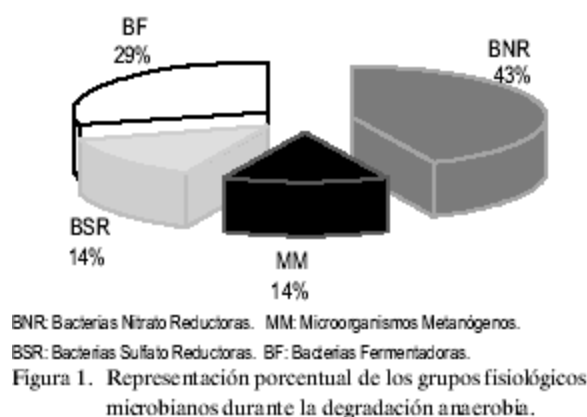
Se aplicó el método estadístico de correlación de Pearson, incorporado en Excel – Microsoft XP, basados en los datos de las muestras, las cuales fueron realizadas por triplicados.

## Resultados y Discusión

La caracterización del lodo granular anaerobio mostró la existencia de una ecología bacteriana diversa, donde los grupos fisiológicos no se encuentran en un mismo nivel, desde el punto de vista de los potenciales de óxido-reducción. La distribución bacteriana sugiere un orden de capas sucesivas, que van desde una superficial a la más profunda

donde se encuentran los anaerobios estrictos [12].

Los grupos fisiológicos detectados en el lodo anaerobio mesofílico: fermentadores de glucosa, nitrato reductores, sulfato reductores y metanógenos, se relacionaron con la producción de biomasa y concentraciones de glucosa (mg/L de DQO) en los reactores anaerobios. En la FIG. 1, se muestra la distribución porcentual de los principales grupos fisiológicos presentes en el lodo granular anaerobio, se observa que el mayor porcentaje se obtuvo para las bacterias nitrato reductoras, alcanzando un 43%, probablemente debido a que el nitrógeno suministrado a los reactores fue reducido desasimilativamente al nitrógeno y óxido nítrico, una vez consumidos los niveles de amoníaco, la vía asimilativa es activada generando el crecimiento microbiano de este grupo como lo reportó Brock y Madigan [4].



Con el medio de cultivo utilizado para la identificación de las bacterias sulfato reductoras [5], la reacción indicadora fue la formación de sulfuro de hierro, que mostró la presencia de bacterias capaces de producir sulfuro de hidrógeno usando sulfato como aceptor final de electrones y lactato de sodio como fuente de carbono, el porcentaje de distribución para este grupo bacteriano representó el 14%. La autofluorescencia verde azulada reveló un crecimiento de microorganismos metanogénicos y, a través de la microscopía de fluorescencia, sarcinas como el tipo morfológico particular predominante. La prueba definitiva la constituyó un análisis de cromatografía de gases para la cuantificación del metano generado, el cual se alcanzó un 2%. El porcentaje de distribución para este grupo de bacterias fue de 14%; mientras que para las bacterias fermentadoras de glucosa, el porcentaje de distribución constituyó el 29%.

Al aumentar la concentración del sustrato, de 1000 a 3000 mg/L de DQO, se favoreció el crecimiento de los microorganismos en el lodo granular anaerobio, aumentando los niveles de biomasa, desde 492,53 hasta 560,25  $\mu\text{g/mL}$ , conduciendo al incremento de la

remoción de la materia orgánica aplicada (65,7% – 85,3%) como puede apreciarse en la Tabla 1.

Por otro lado, la identificación de las cepas morfológicamente diferentes y correspondientes a los grupos fisiológicos fermentadores de glucosa y reductores de nitrato mostró, que los géneros con mayor frecuencia en estos sistemas de degradación anaerobia fueron *Stafilococcus* sp., *Klebsiella* sp. y *Clostridium* sp, así como la especie *Escherichia coli*.

Tabla 1. Relación entre la remoción de la materia orgánica y la biomasa producida durante la degradación anaerobia de la glucosa.

| DQO (mg /L) | Remoción de materia orgánica (%) | Biomasa ( $\mu$ g /mL) |
|-------------|----------------------------------|------------------------|
| 1000        | 65,7                             | 492,53                 |
| 2000        | 77,3                             | 540,20                 |
| 3000        | 85,3                             | 560,25                 |

El control de algunos parámetros fisicoquímicos permitió el buen funcionamiento del bioreactor, la alcalinidad total se mantuvo entre 1900 y 3000 mgCaCO<sub>3</sub>/L, favorecida por la adición del bicarbonato de sodio. El comportamiento del pH durante el tiempo de experimentación puede ser observado en la Tabla 2, en estos ecosistemas el pH puede o no estimular las relaciones de competencia entre los microorganismos metanogénicos y bacterias sulfatoreductoras, las cuales son esenciales para mantener la eficiencia del reactor [4].

Tabla 2. Comportamiento de los parámetros operacionales evaluados durante la degradación anaerobia de la glucosa.

| DQO (mg/L) | pH        | Alcalinidad total (mgCaCO <sub>3</sub> /L) | SSV (mg/L) |
|------------|-----------|--------------------------------------------|------------|
| 1000       | 7,4 – 7,6 | 1100 – 1250                                | 54 – 60    |
| 2000       | 6,3 – 7,0 | 1800 – 2300                                | 58 – 110   |
| 3000       | 6,9 – 7,2 | 2300 – 3100                                | 60 – 150   |

La producción obtenida de metano durante la degradación anaerobia de la glucosa varió en función de las concentraciones de este sustrato aplicadas al sistema de reactores, las cuales fueron 1000, 2000 y 3000 mg/L de DQO, como se aprecia en la FIG. 2.

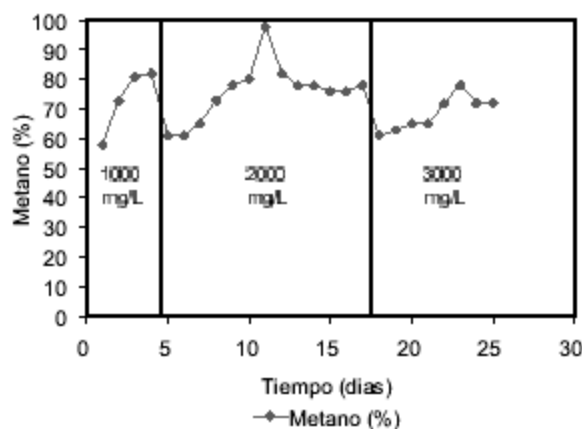


Figura 2. Producción de metano durante la degradación anaerobia de la glucosa.

Durante la fase inicial de la digestión se aplicó una concentración de 1000 mg/L durante un tiempo de cuatro días, este periodo corresponde a la etapa de aclimatación o de arranque, en la cual los microorganismos presentes en el lodo anaerobio comienzan su adaptación a las condiciones de diseño del sistema de reactores [3]; se observó una producción de metano que se incrementó con respecto al tiempo, desde 58 hasta 82%. Esta etapa es considerada por diversos autores [3, 9] de importancia para el mantenimiento de la estabilidad de los procesos anaerobios utilizados como una herramienta en el tratamiento biológico de las aguas residuales. Los valores registrados indican un rápido aprovechamiento del sustrato (glucosa) por parte de los microorganismos.

Con la aplicación de 2000 mg/L de glucosa, se observó una disminución en la producción de metano, derivada del ajuste que requieren los microorganismos ante una concentración de sustrato más elevada, este hecho ocurre comúnmente en los reactores anaerobios por carga debido probablemente a que con el aumento de la concentración de la glucosa se requiere una cantidad mayor de enzimas para la degradación anaerobia. Así mismo, se observó un valor máximo de producción de metano (98%) en el día 11 y luego una tendencia a la estabilización del sistema, con valores de 82 a 78% de metano. Posteriormente, se aplicó una concentración de 3000 mg/L de glucosa observándose una tendencia similar a la ocurrida con la concentración de 2000 mg/L, alcanzando valores de 61- 65% para los días 18 a 21, posteriormente se observó un incremento en la producción de metano máxima de 78%, con una estabilización de 72% al final de la experimentación, registrándose así una alta eficiencia del proceso de degradación anaerobia puesto que los valores elevados del metano producido indican la alta degradabilidad del sustrato aplicado al sistema de reactores anaerobios por carga.

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se registraron entre 54 - 60 mg/L para la

concentración de 1000 mg/L de DQO, mientras que para 2000 mg/L de DQO, se reportaron entre 58 y 110 mg/L y con 3000 mg/L se obtuvieron concentraciones de 60 - 150 mg/L, como se observa en la Tabla 2. Estos resultados indican en forma indirecta que la biomasa permanece dentro de los reactores como lo refieren Brito et al. [3], Dwayne et al. [7] y Quarmby et al. [12] resaltando que el lodo granular arroja valores bajos de SSV debido a la arquitectura granular con la cual se asegura un mayor tiempo de contacto entre los microorganismos y el sustrato.

De acuerdo con los resultados obtenidos con la correlación de Pearson y presentados en la Tabla 3, todos los parámetros evaluados tienen una correlación positiva alta con la concentración de glucosa aplicada al sistema, esto se explica por cuanto a mayor concentración de sustrato ocurren cambios en el pH y alcalinidad para lograr el control y estabilización del sistema anaerobio y mantener un buen rendimiento del proceso de degradación anaerobia lo cual conduce a niveles elevados de metano (%), remoción de DQO (%) y biomasa ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Tabla 3. Resultados de la correlación de Pearson sobre los parámetros evaluados durante la degradación anaerobia de la glucosa.

| Parámetros a correlacionar | Metano | Remoción de DQO | pH     | SSV    | Biomasa | Alcalinidad total |
|----------------------------|--------|-----------------|--------|--------|---------|-------------------|
| Concentración de glucosa   | 0.9755 | 0.9236          | 0.9660 | 0.9001 | 0.9272  | 0.9070            |

## Conclusiones

Los registros de biomasa reportados en esta investigación, indican la eficiencia del sistema anaeróbico de acuerdo con los porcentajes alcanzados en la remoción de la materia orgánica en base a glucosa, observándose los grupos fisiológicos típicos del lodo granular anaerobio, las bacterias fermentadoras de glucosa, nitrato reductoras, sulfatoreductoras y microorganismos metanogénicos. La sucesión de algún grupo fisiológico en particular no siguió un patrón atribuible a las variaciones fisicoquímicas mantenidas dentro de los rangos de estabilidad para el proceso de la degradación anaeróbica, usando glucosa como única fuente de carbono.

## Referencias Bibliográficas

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION / AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION / WATER ENVIRONMENT FEDERATION (1998). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20 th ed. Washington DC, USA.
2. BOONE, D.; JOHNSON, R.; LIU, Y. (1989). Diffusion of the interspecies electron

- carriers  $H_2$  and formate methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of km for  $H_2O$  formate uptake. **Appl. Environ. Microbiol** 55: 1735 – 1741.
3. BRITO, A.; RODRIGUEZ, A.; MELO, L. (1997). Granulation during the start-up of a UASB reactor used in the treatment of low strength wastewater. **Biotechnology Letters** 19:363 – 367.
  4. BROCK, T.; MADIGAN, M. (1991). **Microbiología**. Sexta edición. Hall Hispanoamericana S.A. México. pp.879.
  5. CHING, G.; SHING, Y. (1994). Modeling of anaerobic corrosion influenced by sulfate reducing bacteria. J.K. Park. pp. 123 – 125.
  6. DOWELL, V.; LOMBARD, G.; THOMPSON, F.; ARMFIELD, A. (1977). Media for isolation characterization and identification of obligate anaerobic bacteria. Center for disease control. USA. **CDC Laboratory Manual**, Pp. 156.
  7. DWAYNE, E.; LEE, K.; TANNER, R.; SUFLITA, J. (1999). Estimation of methanogen biomass by quantitation of coenzyme M. **Appl and Environm Microbiol** 65(12): 5541 – 5545.
  8. EDWARD, P.; EDWIN, W. (1972). Identification of Enterobacteriaceae. Three Editions. **Enteric Bacteriology Laboratories**, Center for disease control. Burgess Publishing Company. USA. pp.172.
  9. GUIOT, S.; ROCHELEAU, S.; HAWARI, J.; SAMSON, R. (1992). Induction of granulation by sulphonated – lignin and calcium in an upflow anaerobic sludge bed reactor. **J of Chemistry Technol and Biotech** 53: 45 – 56.
  10. LUENGO, E. (1989). **Manual de microbiología básica**. La Universidad del Zulia. Venezuela. pp. 290.
  11. MIZUNO, O.; LI, L.; NOIKE, T. (1998). The behavior of sulfate – reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. **Water Res** 32(5): 1626 – 1634.
  12. QUARMBY, J.; FORSTER, C. (1995). An examination of the structure of UASB granules. **Water Res** 29(11): 2449 -2454.