



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA



Digestión Anaerobia

una aproximación
a la tecnología



INSTITUTO
DE
BIOTECNOLOGÍA

MARÍA CONSUELO DÍAZ-BÁEZ

SANDRA ELIANA ESPITIA VARGAS

FRANCISCO MOLINA PÉREZ

Digestión Anaerobia

una aproximación
a la tecnología

Digestión Anaerobia

una aproximación
a la tecnología

MARÍA CONSUELO DÍAZ-BÁEZ

SANDRA ELIANA ESPITIA VARGAS

FRANCISCO MOLINA PÉREZ



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Instituto de Biotecnología

Bogotá, junio de 2002

Este libro fue posible gracias al apoyo del siguiente grupo de trabajo:

Engie Carolina Plazas	Bacterióloga Asistente de Investigación Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia
Maria Elena González	Bacterióloga Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia
Carolina García	Microbióloga Posgrado Interfacultades de Microbiología Universidad Nacional de Colombia
Carlos Julio Collazos	Ingeniero Sanitario M.Sc. Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Colombia

DIGESTIÓN ANAEROBIA
UNA APROXIMACIÓN A LA TECNOLOGÍA
© UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MARIA CONSUELO DIAZ-BAEZ
Biólogo, M.Sc.
Ingeniería Ambiental
Universidad Nacional de Colombia

SANDRA ELIANA ESPITIA VARGAS
Bacterióloga, M.Sc.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

FRANCISCO MOLINA PÉREZ
Ingeniero Sanitario, M.Sc.
Facultad de Ingeniería
Universidad de Antioquia

Primera edición 2002
ISBN 958-701-196-1

Esta Publicación ha sido posible gracias al patrocinio del
Instituto Colombiano para el Fomento de la Ciencia y la Tecnología
"Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS

Diseño y diagramación
ALEJANDRO MEDINA

Corrección de estilo
CAMILO BAQUERO C.

Preparación editorial e impresión
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
UNIBIBLOS
unibiblo@dnic.unal.edu.co

AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos dar un reconocimiento especial al profesor Didier Alazard, Microbiólogo Ph.D de la ORSTOM, quien ha sido uno de los pioneros en la enseñanza y el estudio de la microbiología anaerobia en Colombia.

Además, los autores quieren expresar sus agradecimientos a:

- Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
- Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia
- Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia

Finalmente, nuestros agradecimientos a Colciencias, Programa de Biotecnología, por el apoyo financiero brindado a los dos grupos de trabajo, el cual nos permitió explorar este campo, así como contar con la infraestructura necesaria para continuar en el estudio e investigación de la digestión anaerobia.

CONTENIDO

PRÓLOGO [9]

CAPÍTULO 1

RECURSOS HÍDRICOS Y TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES [11]

Recursos hídricos [13]

Opciones tecnológicas de tratamiento [15]

Experiencias con digestión anaerobia en Colombia y América Latina [17]

Problemas asociados con la digestión anaerobia [20]

CAPÍTULO 2

HISTORIA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA [25]

Microbiología [27]

Desarrollo y aplicación de la digestión anaerobia al tratamiento de residuos [30]

CAPÍTULO 3

MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA [39]

Interacciones microbianas [41]

Degradación anaerobia de la materia orgánica [43]

Bacterias involucradas en el proceso de digestión anaerobia [45]

Metanogénesis [60]

Bacterias sulfato-reductoras (BSR) [63]

CAPÍTULO 4

PUESTA EN MARCHA Y OPERACIÓN DE REACTORES ANAEROBIOS [75]

Reactores anaerobios: ¿Caja negra o ecosistema microbiano? [77]

Etapas de puesta en marcha o arranque del reactor [80]

Etapas de operación [84]

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN DE LODOS ANAEROBIOS Y AGUAS RESIDUALES [101]

Lodos anaerobios [103]

Aguas residuales [132]

ANEXOS [149]

PRÓLOGO

AUNQUE COLOMBIA CUENTA CON GRAN CANTIDAD DE RECURSOS HÍDRICOS E HIDROBIOLÓGICOS CONTINENTALES (MÁS DE 2.6 MILLONES DE HECTÁREAS DE LAGOS, LAGUNAS, EMBALSES, CIÉNAGAS Y PANTANOS, Y 720.000 CAUCES), FENÓMENOS COMO LA EROSIÓN, LA DESTRUCCIÓN DE FORMACIONES VEGETALES Y LA CONTAMINACIÓN DE DIVERSOS ORIGENES, HAN LLEVADO AL GRAVE DETERIORO DE TALES RECURSOS QUE VEMOS EN LA ACTUALIDAD.

En términos generales, la contaminación de los recursos hídricos se debe a la descarga de aguas residuales domésticas e industriales sin ningún tratamiento, los derrames de hidrocarburos, la actividad agropecuaria y la minería. Es por ello, que gran parte de los esfuerzos de las entidades gubernamentales encargadas de la protección de estos recursos, está orientada tanto a la aplicación de la normatividad existente en lo relativo al control de la calidad de los efluentes vertidos, así como a la rehabilitación y recuperación de la base natural de los ecosistemas afectados. Como resultado de estas medidas, en la actualidad muchas industrias cuentan con variados sistemas de tratamiento y a nivel municipal, algunos centros urbanos han abordado el problema de tratamiento de sus aguas residuales.

Aunque el tratamiento de aguas residuales domésticas es un proceso conocido y bien estudiado, la aplicación de los mismos sistemas al tratamiento de residuos industriales y a la recuperación y rehabilitación de suelos, no siempre ha tenido resultados exitosos. En muchos casos ha sido necesario, no solo conocer en forma detallada los fenómenos que se llevan a cabo, sino que además para la definición y análisis del problema, ha sido indispensable el trabajo coordinado e interdisciplinario de diferentes áreas del conocimiento como la biología, la química y la ingeniería. Un ejemplo de la necesidad de este trabajo coordinado, es el tratamiento anaerobio de aguas residuales utilizado exitosamente en diferentes países (Europa, Japón, China, Brasil, México, etc.), mientras en otros, problemas como la carencia de inóculos, la puesta en marcha de los reactores, y la estabilidad del proceso, han generado gran desconfianza de esta tecnología cuando, en muchos de estos casos podrían haberse solucionado si se hubieran abordado con la colaboración de varias disciplinas.

Por esta razón, los autores conscientes de las bondades de esta tecnología, así como de su potencial para el tratamiento de aguas residuales, han querido dar a los profesionales que trabajan en el área de tratamiento de aguas residuales, un libro donde desde un punto de vista interdisciplinario, se consignan los fundamentos teóricos y algunas de las experiencias prácticas logradas en el manejo y aplicación de la digestión anaerobia.

El presente documento se inicia con los conceptos básicos de microbiología del proceso, continúa con aspectos relacionados con la puesta en marcha y operación de reactores anaerobios, y finaliza con los protocolos recomendados para la medición de parámetros de control y operación. Dado que no existe en el mercado un texto donde se consignan todos estos elementos, esperamos que este texto pueda ser una guía importante para los profesionales que abordan esta tecnología, además de contribuir a una mejor aplicación de la misma en el país.

capítulo

uno

RECURSOS HÍDRICOS Y
TRATAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES

1

RECURSOS HÍDRICOS

EL AGUA ES UNA MOLÉCULA ESENCIAL E INDISPENSABLE PARA LA VIDA; CUANTITATIVAMENTE, REPRESENTA EL CONSTITUYENTE INORGÁNICO MÁS ABUNDANTE EN LA MATERIA VIVA. CERCA DE TRES CUARTAS PARTES DE LA SUPERFICIE TERRESTRE ESTÁN CUBIERTAS POR LA HIDROSFERA; DE ÉSTA, LOS OCÉANOS REPRESENTAN EL 97% DE LA MASA TOTAL DE AGUA PRESENTE Y SÓLO UN 3% CORRESPONDE A AGUA DULCE. EL 79% DE ESTA ÚLTIMA FRACCIÓN SE LOCALIZA EN LOS CASQUETES POLARES Y EN LOS GLACIARES, EL 20% CONFORMA LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS Y ÚNICAMENTE EL 1% REPRESENTA AGUA DULCE SUPERFICIAL FÁCILMENTE ACCESIBLE.

Por su localización geográfica, su historia geológica y la presencia de los Andes, en Colombia se propició la formación de seis grandes unidades o regiones naturales: Andina, Caribe, Orinoquía, Amazonía, los valles Interandinos y del Pacífico, las cuales dan lugar a un país privilegiado en recursos hídricos, cuyo rendimiento por km² es aproximadamente seis veces el planetario y tres veces el suramericano (Tabla 1.1). A la retención que ocurre en la biosfera, producto de la diferencia entre la precipitación y la evaporación, se le conoce como 'rendimiento hídrico'.

Tabla 1.1. Precipitación y rendimientos hídricos

Región	Precipitación anual media (mm)	Rendimiento(l/s/km ²)
Planeta Tierra	900	10
Sur América	1.600	21
Colombia	3.000	58

Fuente: Ministerio del Medio Ambiente, 1996

A pesar que el recurso hídrico en Colombia es abundante, su distribución no es uniforme; por ejemplo, en la cuenca Magdalena-Cauca –donde se concentra el 70 % de la población–, sólo se cuenta con el 10 % de la oferta hídrica. El 30% de la población restante, se localiza en las cuencas del Orinoco, Amazonas, Pacífico, Sinú, Catatumbo y Sierra Nevada donde se encuentra el 90 % restante de la oferta hídrica superficial.

En la actualidad, del total de la oferta hídrica superficial, solamente se utiliza entre el 5 y 6% en actividades relacionadas con: agricultura (63%), generación de energía (31%), consumo humano (5%), y actividades industriales (1%). Algunas estimaciones indican que para un funcionamiento adecuado de los ecosistemas naturales y el sostenimiento de la capacidad de autorregulación natural de estos cuerpos de agua, será necesario reservar 80% de la oferta superficial, por lo que sólo un 20% de la oferta hídrica total podrá utilizarse (Ministerio del Medio Ambiente, 1996).

Sumado al problema de la distribución desigual, en las últimas décadas se ha observado un creciente deterioro de la calidad de este recurso. La contaminación de las aguas continentales y oceánicas es un problema vigente, y aun cuando los mecanismos y efectos de esta contaminación figuran entre los más conocidos de todos los problemas ambientales, la búsqueda de soluciones eficaces muchas veces ha sido complicada y no siempre ha conducido a soluciones técnicas y económicas exitosas.

En informes gubernamentales se establece que las principales causas de este deterioro estriban en la modificación de la cobertura vegetal y en las explotaciones mineras, impactos ambientales que generan gran cantidad de sedimentos, y el vertimiento de aguas residuales y residuos sólidos sin ningún tratamiento a las corrientes y cuerpos de agua. En 1996, el Ministerio del Medio Ambiente reportó una descarga diaria de materia orgánica de origen doméstico a los ríos colombianos de 1.800 toneladas, y una carga orgánica de 500 toneladas de origen industrial (Mondragón, 1996). Por la misma época, sólo el 2% de la población urbana realizaba algún tratamiento de sus aguas residuales (Ministerio del Medio Ambiente, 1996 y Mondragón, 1996).

Dos años más tarde, en el Inventario Nacional del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico, realizado por el Ministerio de Desarrollo Económico (1998), se reportó que de los 1.068 municipios colombianos, solamente 154 (14%) realizaban algún tipo de tratamiento de sus aguas residuales domésticas. De éstos, 133 correspondían a áreas urbanas con menos de 100.000 habitantes, y los restantes 21 municipios tenían poblaciones mayores a 100.000 habitantes.

De forma similar, para la disposición de residuos sólidos sólo el 40% de la población contaba con sistemas adecuados de disposición final, generalmente

rellenos sanitarios (Mondragón, 1996). De los 1.068 municipios existentes en 1996, solamente 940 contaban con servicio de aseo, 42 de ellos llevaban a cabo la disposición final de las basuras directamente en los cuerpos de agua y 538 las disponían en botaderos o mediante quema a cielo abierto (Ministerio de Desarrollo Económico, 1998).

A pesar de este grave panorama, las regulaciones y las actividades de control de las agencias gubernamentales encargadas, así como los principios de responsabilidad integral asumidos por la industria, han llevado a que en algunos sectores agroindustriales e industriales se realicen esfuerzos en el tratamiento de aguas residuales. No obstante estas iniciativas, la continua descarga de importantes volúmenes de aguas residuales hace que ríos como el Bogotá, el Medellín, el Cauca, el Chicamocha y el Magdalena, presenten altos índices de contaminación, y por lo tanto, deberán someterse prioritariamente a planes de saneamiento y recuperación.

OPCIONES TECNOLÓGICAS DE TRATAMIENTO

En términos generales, las opciones tecnológicas de tratamiento de aguas residuales se pueden clasificar en dos clases: el tratamiento fisicoquímico y el tratamiento biológico. Dadas las características de la gran mayoría de las aguas residuales, los sistemas de tratamiento involucran una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales se llevan a cabo en una secuencia de etapas conocidas como tratamiento preliminar, tratamiento primario, tratamiento secundario o biológico y tratamiento terciario o avanzado (Figura 1.1).

Los tratamientos preliminares sirven para aumentar la efectividad de los tratamientos subsiguientes; su papel se relaciona principalmente con la remoción de sólidos de gran tamaño. Los tratamientos preliminares más usuales son: las rejillas, los tamicos, los desarenadores, los tanques de homogenización o neutralización.

Los tratamientos primarios tienen como objetivo principal la remoción de materiales que pueden sedimentar (llamados 'sólidos sedimentables') o flotar

(llamados 'sólidos suspendidos'). Los tratamientos más utilizados son: la sedimentación primaria, la precipitación química y la flotación.

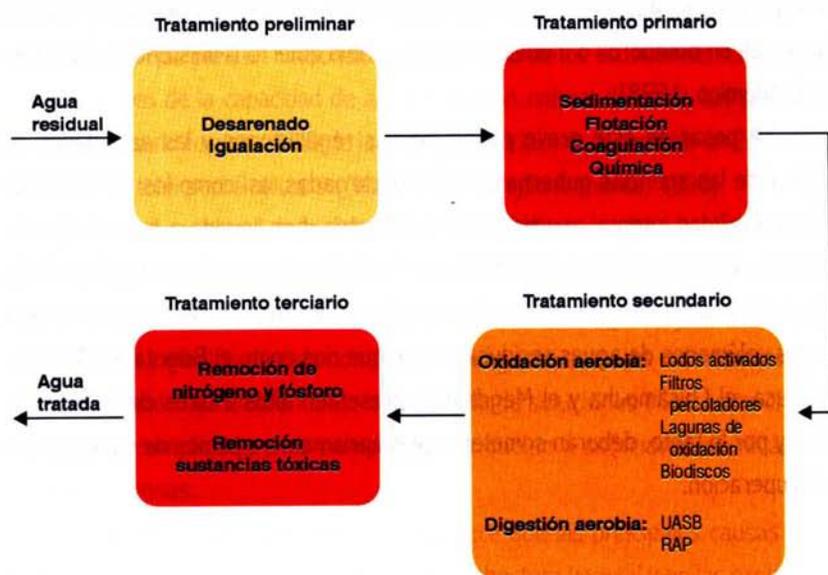


Figura 1.1 Niveles de tratamiento de las aguas residuales.

El objetivo principal de los tratamientos secundarios es la remoción de la materia orgánica soluble. Se llevan a cabo mediante procesos biológicos en los cuales, los microorganismos utilizan aeróbica o anaeróbicamente el material orgánico presente en el agua residual. Los tratamientos más comunes son: los lodos activados, los filtros percoladores, las lagunas de estabilización, las zanjas de oxidación, los biodiscos y la digestión anaerobia. Esta última puede considerarse, en algunos casos, como un tratamiento intermedio entre los primarios y los secundarios.

Los tratamientos terciarios están orientados a la remoción de elementos como el nitrógeno, el fósforo, los metales pesados y/o algunos materiales tóxicos. Los tratamientos avanzados que más se utilizan, son: la nitrificación-desnitrificación, la adsorción en carbón activado, la oxidación química, el intercambio iónico y la cloración.

EXPERIENCIAS CON DIGESTIÓN ANAEROBIA EN COLOMBIA Y AMÉRICA LATINA

La remoción de materia orgánica soluble puede llevarse a cabo a través de procesos biológicos aerobios o anaerobios. En ambos casos, los microorganismos utilizan la materia orgánica como fuente de energía y carbono, y generan nueva biomasa, además de productos de oxidación: CO_2 y H_2O , para los aerobios ó CH_4 y CO_2 , para los anaerobios.

En Colombia, el 97% de las aguas residuales se vierten en los ríos sin ningún tipo de tratamiento, razón por la cual la contaminación por esta vía constituye uno de los problemas ambientales de mayor impacto para la sociedad colombiana. El sector agroindustrial origina (sin incluir la caña de azúcar y el beneficio de café) una carga de 4.000 toneladas $\text{DBO}_5/\text{día}$; le siguen los sectores pecuario, doméstico (1.200 toneladas $\text{DBO}_5/\text{día}$) e industrial (520 toneladas $\text{DBO}_5/\text{día}$).

Aunque en la mayoría de los países latinoamericanos solamente el 10% de las aguas residuales domésticas son tratadas (Oficina de Análisis Económico, Ministerio del Medio Ambiente, 1997), esta tendencia ha venido cambiando en los últimos años. La utilización de reactores anaerobios para el tratamiento de aguas residuales ha crecido desde 1982 orientándose principalmente al tratamiento de aguas residuales agroindustriales. La importancia económica de este sector, la susceptibilidad de estos efluentes al tratamiento anaerobio y las condiciones de temperatura de los países del trópico han favorecido la operación de este tipo de reactores (Borzacconi *et al.*, 1996). En la Figura 1.2 se presenta el número de reactores instalados entre 1982 y 1993 en América Latina; de ellos, 82% corresponde a reactores tipo UASB, 14% a filtros anaerobios y los señalados como 'otros' representan generalmente sistemas híbridos.

En 1994 existían en América Latina aproximadamente 396 reactores anaerobios los cuales trataban un volumen aproximado de 394.421m^3 . El 43% (182.286m^3) eran utilizados en el tratamiento de aguas residuales industriales y

agroindustriales, y el 57% restante, para domésticas, o se utilizaban en la digestión final de lodos provenientes de plantas de tratamiento aerobias. La mayoría de los reactores que trataban efluentes agroindustriales (115), se localizan en Brasil, y en menor proporción en México (22) y Colombia (10) y el resto en otros países. Básicamente, los efluentes tratados provenían de la industria cervecera (40%), malterías (21%), destilerías de caña de azúcar (5%) y el 34% de la industria de levaduras (Borzacconi *et al.*, 1996).

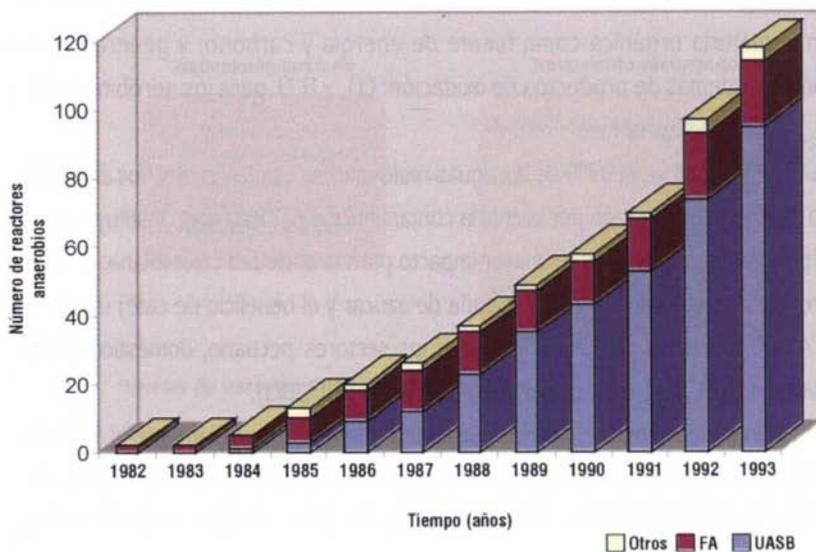


Figura 1.2. Reactores anaerobios utilizados en el tratamiento de efluentes agroindustriales en América Latina (1982-1993).

Se calcula que en Colombia existen más de 80 reactores anaerobios los cuales tratan un caudal aproximado de 855 l/seg. Estas instalaciones se utilizan para el tratamiento de efluentes de procesos industriales, agroindustriales y aguas residuales domésticas. En la Figura 1.3 se presenta la distribución porcentual por volumen y caudal tratado. Los biorreactores tratan efluentes de las industrias cervecera, de levaduras, de gaseosas y refrescos, papeleras y de lavado de lana, con eficiencias que oscilan entre 40 y 70% (Duque, 1996).

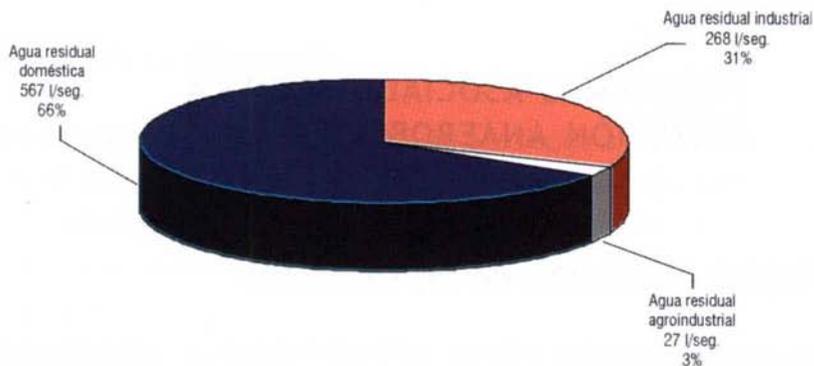


Figura 1.3. Distribución porcentual del volumen y el caudal que tratan los reactores anaerobios instalados en Colombia (Duque, 1996).

Para las aguas residuales domésticas, de los 154 municipios Colombianos donde se reporta tratamiento de aguas servidas, las lagunas de estabilización constituyen el mayor número, seguidas por sistemas de aireación extendida y reactores anaerobios tipo UASB (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Sistemas de tratamiento de aguas residuales en los municipios colombianos en 1996

Tipo de planta de tratamiento	No. de Municipios
Plantas compactas aerobias	6
Lodos activados	17
Filtros percoladores	6
Lagunas de estabilización	96
Filtros biológicos	18
Aireación extendida	26
Reactores anaerobios UASB	17
Otros	16

Número de Municipios que tratan sus aguas servidas: 154 / Total de Municipios: 1068

Fuente: Ministerio de Desarrollo, 1998.

PROBLEMAS ASOCIADOS CON LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Puesta en marcha de los reactores

Una característica particular de los microorganismos anaerobios es su baja tasa de crecimiento; por lo tanto, al iniciar el proceso se requiere un período de tiempo que puede oscilar entre 30 y 180 días dependiendo de la calidad y cantidad del inóculo utilizado (Weiland y Rozzi, 1991). Sin embargo, en los casos en los que no se cuenta con inóculos adecuados esta etapa se puede prolongar, incluso hasta condiciones críticas en las que nunca se alcanza la estabilidad. Por ello la optimización de la puesta en marcha requiere contar con las herramientas apropiadas para la evaluación de los inóculos; además, en muchos casos es necesario desarrollar costosos procesos para la obtención de semillas o inóculos más eficientes.

Postratamiento

Por lo general, con la digestión anaerobia no se logra la misma remoción de materia orgánica que con los procesos aerobios. La presencia de concentraciones importantes de sólidos suspendidos, nutrientes y organismos patógenos en el efluente de los sistemas, hace necesario complementar el proceso con postratamiento. Los recursos tecnológicos más utilizados incluyen procesos biológicos como los filtros percoladores, las lagunas de oxidación, los humedales y estanques con plantas acuáticas; también se usan procesos físicos, químicos o fisicoquímicos como la filtración en arena, la desinfección con cloro o la floculación y coagulación (Van Haandel y Lettinga, 1994).

Producción de olores

Uno de los mayores problemas asociados con la tecnología anaerobia es la liberación de malos olores atribuida a la producción de compuestos azufrados como el ácido sulfhídrico (H_2S) en el biogás. Estos compuestos tienen un olor muy ofensivo que se ha convertido en la principal causa de conflictos con las comunidades aledañas a las plantas de tratamiento de aguas residuales. Un caso muy conocido es el de la planta El Vivero Municipal de Cali, la cual tuvo que cerrarse entre 1991 y 1994 por este problema (Mora, 1996; Sterling y Mora, 1998). En este campo, existen múltiples necesidades de investigación, por lo que diferentes grupos están desarrollando varios proyectos orientados a la remoción de estos gases (Gómez y Figueroa, 1998; Martínez *et al.*, 1998; Sterling y Mora, 1998) en el país.

BIBLIOGRAFÍA

- BORZACCONI, L., López, I. y Viñas, M. (1995). "Application of Anaerobic Digestion to the Treatment of Agricultural Effluents in Latin America". *Water Science Technology*, 32: 105-111.
- DUQUE, A. (1996). "Desarrollo de reactores anaeróbicos en Colombia". En: Cuarto seminario taller latinoamericano sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales. Red Colombiana de Biotecnología Ambiental y Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga (Colombia).
- GÓMEZ, G. y Figueroa, C. (1998). "Eliminación de contaminantes del aire y gases por procesos biotecnológicos". En: Segundo simposio colombiano sobre biotecnología ambiental. Red Colombiana de Biotecnología Ambiental y Fundación Universitaria de Boyacá. Tunja (Colombia).
- LETTINGA, G. (1995). "Anaerobic Digestion and Wastewater Treatment System". *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66: 271-294.
- MARTÍNEZ, A., Támara, W., Vela, G. y Vargas, C. (1998). "Diseño y construcción de un biofiltro a escala piloto para el tratamiento de olores y VOC's". En: Segundo simposio colombiano sobre biotecnología ambiental. Red Colombiana de Biotecnología Ambiental y Fundación Universitaria de Boyacá. Tunja (Colombia).
- Ministerio del Medio Ambiente (1996). "Lineamientos de política para el manejo integral del agua". *Revista ACODAL* 169, 2o. trimestre: 10-30.
- Ministerio de Desarrollo Económico (1998). Inventario nacional del sector de agua potable y saneamiento. Bogotá (Colombia).
- MONDRAGÓN, L. (1996). "Políticas nacionales relacionadas con el mejoramiento de la calidad del agua". En: Conferencia internacional de mejoramiento de la calidad del agua. Universidad del Valle. Cali (Colombia).
- MORA, L. (1996). "Control de olores en la planta de tratamiento de aguas residuales UASB Vivero Municipal de EMCALI". En: Primer simposio colombiano sobre biotecnología ambiental. Red Colombiana de Biotecnología Ambiental y Universidad de Antioquia. Medellín (Colombia).

- Ministerio del Medio Ambiente, Oficina de Análisis Económico (1997). "Aguas limpias para Colombia al menor costo. Implementación de las tasas retributivas por contaminación hídrica". *Revista Palmas*, 18 (3): 69-79.
- STERLING, C. y Mora, L. (1998). "Resultados de una planta depuradora tipo UASB, El Vivero Municipal de EMCALI". En: Segundo simposio colombiano sobre biotecnología ambiental. Red Colombiana de Biotecnología Ambiental y Fundación Universitaria de Boyacá. Tunja (Colombia).
- VAN HAANDEL, A. y Lettinga, G. (1994). Tratamiento anaerobio de esgotos em regioes de clima quente. Editorial Epgraf, Campina Grande (Brasil).
- WEILAND y Rozzi. (1991). "The start up operation an monitoring of high rate anaerobic treatment systems". *Water Science Techology*, 24 (8): 257-277.

capítulo
dos

HISTORIA DE
LA DIGESTIÓN
ANAEROBIA

2

COMO SE MENCIONA EN DIFERENTES REVISIONES (BARKER, 1956; ZEHNDER, 1978) LA PRIMERA DESCRIPCIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO EN LA NATURALEZA FUE HECHA POR VOLTA EN 1776, quien lo definió como el 'gas de los pantanos'. Un siglo después, se demostró la producción de este gas en el intestino grueso de los reos recién ejecutados, así como en el estómago de los rumiantes. En 1868, Béchamp realiza experimentos en los que observa la producción de metano al inocular un medio de etanol con heces de conejo; este resultado permite confirmar las observaciones realizadas por Reiset en 1858 en las pilas de estiércol almacenadas (McCarty, 1982).

MICROBIOLOGÍA

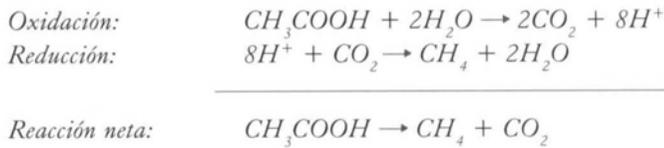
A finales del siglo XIX, Popoff, Van Senuy y Omelianski realizan estudios detallados sobre la producción microbiológica de metano (McCarty, 1982). Estos investigadores establecen que la *metanogénesis* es un proceso derivado del rompimiento de materiales poliméricos como la celulosa, dependiente de la temperatura. Sin embargo, hasta ese momento no era claro si las bacterias productoras de metano eran capaces de utilizar los polímeros directamente, o si la generación de este gas era el producto de la utilización de moléculas más simples producidas por el rompimiento de los polímeros por otros microorganismos. En sus estudios, Omelianski demostró que durante la fermentación metánica de la celulosa se produce hidrógeno, ácido acético y ácido butírico, para finalmente formar metano de acuerdo con la siguiente reacción:



Las observaciones de Béchamp, y los resultados obtenidos por Omelianski, permiten a Sohngen llevar a cabo una serie de experimentos en los cuales

estudió la producción de metano a partir de sustratos puros como el formato, el acetato, el butirato, el etanol y una mezcla de H_2/CO_2 , similar a la obtenida durante la descomposición anaerobia de la celulosa (McCarty, 1982). Los resultados permitieron concluir que estos sustratos son compuestos intermediarios generados durante la fermentación metánica de la celulosa. Aunque se hicieron observaciones microscópicas de algunas especies de microorganismos que actualmente se reconocen como metanogénicas, los investigadores nunca lograron aislarlas y cultivarlas en forma pura en el laboratorio.

En 1936, Barker anuncia el primer aislamiento en cultivo puro de un metanógeno al que denomina *Methanobacillus omelianskii*, y muestra los resultados de los primeros estudios bioquímicos con este microorganismo. Señala la capacidad de esta bacteria para oxidar el etanol a acetato, y basado en la teoría de la reducción del dióxido de carbono desarrollada por Van Niel en 1934 (Barker, 1956), plantea que los electrones generados durante la oxidación son utilizados para reducir los iones bicarbonato los cuales actúan como aceptores finales de electrones de la siguiente forma:



Posteriormente en 1948, Buswell y Sollo, utilizando C^{14} como trazador, demostraron que la formación de metano a partir de acetato no ocurre por reducción del dióxido de carbono, sino por la descarboxilación de este compuesto. Este hecho posteriormente es verificado por Stadman y Barker (1949), y Pine y Barker (1956), confirmando la hipótesis formulada por Sohngen.

Con el desarrollo de nuevos procedimientos para el cultivo de microorganismos anaerobios estrictos (Hungate, 1969) se inicia una nueva era en las investigaciones sobre metanogénesis. La introducción de la técnica del tubo rodado (*roll tube*), así como el uso de las nuevas cámaras de anaerobiosis, permite el aislamiento de numerosas especies metanogénicas en cultivo puro. Mediante el uso de estos nuevos procedimientos, Bryant *et al.* (1967) inician el estudio sobre la metabolización

del etanol por un cultivo de *M. omelianskii*, los investigadores encontraron que para poder llevar a cabo la fermentación metánica, este microorganismo (denominado posteriormente como *Methanobacterium bryantii*), requería de la asociación con otro microorganismo que los autores denominaron "Organismo No Metanogénico S". De esta forma, para lograr el proceso metanogénico completo, era necesario contar con un Organismo No Metanogénico S el cual oxida el etanol a acetato e hidrógeno, mientras que el *M. bryantii* cepa MoH reduce el bicarbonato presente en el medio con el hidrógeno generado por el organismo S. Termodinámicamente, las reacciones fueron descritas de la siguiente forma:

<i>Microorganismos</i>	ΔG° (kJ)
Microorganismo S: $2C_2H_5OH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 4H_2 + H^+$	+ 19.2
M. bryantii: $4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.6
Reacción neta: $2C_2H_5OH + HCO_3^- \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + CH_4 + H_2O$	-116.4

La remoción del hidrógeno por el *M. bryantii* permitía mantener la presión parcial de este gas por debajo de 10^{-3} atmósferas, lo cual favorecía termodinámicamente la primera reacción y permitía el crecimiento del Organismo No Metanogénico S. Este descubrimiento mostró la importancia del hidrógeno como intermediario en los habitats anaerobios (Hungate, 1967) y permitió la formulación de una nueva relación biológica interespecífica conocida como 'asociación sintrófica' o 'transferencia interespecífica de hidrógeno', que aclara una de las relaciones más importantes en la ecología microbiana de los ambientes metanogénicos.

La subsecuente caracterización de las vías metabólicas típicas de las bacterias metanogénicas, así como la de los cofactores involucrados en el

proceso de generación de metano, llevó al cuestionamiento de las relaciones filogenéticas con otras bacterias, al igual que su papel en la evolución de la vida sobre el planeta. Mediante el examen de los patrones de secuencia de los oligonucleótidos de la fracción ribosomal 16S, fue posible demostrar que este grupo es filogenéticamente diferente de otros procariótidos y de las células eucariótidas (Figura 2.1). Como también se observó, una alta diversidad dentro del grupo sugirió la existencia de una divergencia evolutiva que pudo haber dado lugar a la aparición de las tres líneas ancestrales que originaron los reinos actualmente conocidos como Eucariota, Eubacteria y Archaeobacteria (Balch *et al.*, 1977).

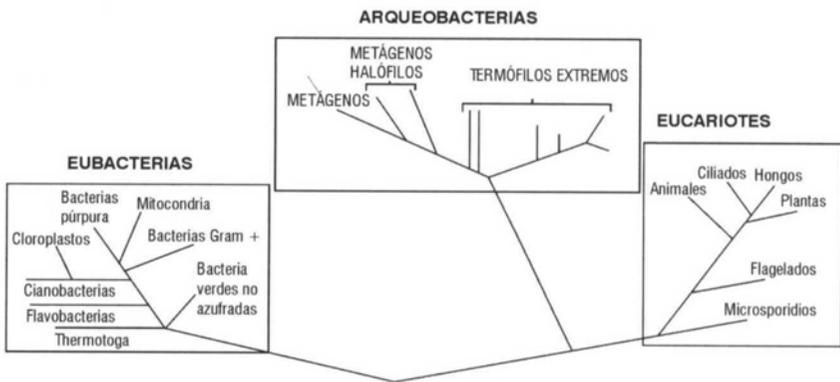


Figura 2.1. Árbol filogenético universal.

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA AL TRATAMIENTO DE RESIDUOS

La primera aplicación documentada del tratamiento anaerobio de aguas residuales domésticas fue descrita por Mouras al final del siglo XIX en Francia. El tratamiento se llevaba a cabo en una cámara cerrada herméticamente, en la cual los sólidos sedimentados se degradaban anaeróbicamente (McCarty, 1982).

En la última década del siglo XIX y comienzos del siglo XX, en Inglaterra, Alemania, India y Estados Unidos se desarrollaron varios sistemas muy conocidos: el tanque séptico inventado en Inglaterra por Cameron y el tanque Imhoff en Alemania. En ambos casos los sólidos presentes decantan para ser degradados aneróticamente en el fondo del reactor. Este tratamiento primario de los sólidos fue ampliamente aplicado entre las dos guerras mundiales; en Alemania se utilizó el tanque Imhoff para una población de doce millones de habitantes (Van Haandel y Lettinga, 1994).

Debido a la baja remoción de materia orgánica, así como a los largos períodos de tiempo que requieren los sistemas anaerobios, a partir de 1945 empieza la utilización masiva de sistemas aerobios especialmente, lodos activados y filtros percoladores. La alta eficiencia de estos sistemas en cuanto la remoción de la materia orgánica expresada en términos de DBO (90-95%), comparada con la obtenida con los procesos anaerobios (30-50%) hacían a estos últimos poco competitivos. En la actualidad, se reconoce que la baja eficiencia de estos sistemas se relaciona con un pobre contacto entre la masa bacteriana presente y el material suspendido y disuelto del agua residual (Van Haandel y Lettinga, 1994). Por esa razón, gran parte del material disuelto o hidrolizado no podía ser utilizado y era descargado en el efluente del sistema.

A partir de la década de los años 70 fue plenamente reconocida la importancia del contacto entre el lodo y el sustrato, lo cual permitió el desarrollo de nuevas configuraciones de reactores y demostró que estos procesos pueden alcanzar eficiencias de remoción de materia orgánica comparables con las de los procesos de depuración aerobios.

En términos generales, se registran tres generaciones de reactores anaerobios, las cuales se caracterizan porque en cada generación se reduce el tiempo de retención hidráulico y mejora el contacto entre el lodo y el sustrato, lo cual significa menores volúmenes de reactor, costos más bajos, sistemas más estables y de más fácil operación.

Aunque podría pensarse que en la actualidad los reactores de la primera generación han dejado de utilizarse, en muchos países se continúan usando, especialmente en dos campos:

- En la digestión de los sólidos sedimentados en reactores tipos tanque séptico o tanque Imhoff y en lagunas anaerobias. En estos casos, los lodos sedimentados en el fondo del reactor son degradados por procesos anaerobios.
- En la digestión anaerobia de los lodos resultantes del tratamiento aerobio (lodos activados, filtros percoladores), para lo cual se utilizan reactores donde el tiempo de retención celular es igual al tiempo de retención hidráulico, por lo que se trabaja con tiempos de retención hidráulicos muy altos (mayores de 30 días).

Como se mencionó anteriormente, los largos tiempos de retención requeridos, así como un contacto inadecuado entre la biomasa y el material orgánico, hacían que estos reactores fueran poco competitivos, en especial para el tratamiento de grandes volúmenes de aguas residuales. Con el fin de resolver estos problemas, algunos grupos de investigadores de diferentes países abordaron el diseño de una nueva generación de reactores (segunda generación), en los cuales se independiza el tiempo de retención celular del tiempo de retención hidráulico y se incorporan elementos para mejorar el contacto entre la materia orgánica y la biomasa anaerobia presente en el reactor. A fin de evitar la pérdida de biomasa en los reactores se han probado varias estrategias (Lettinga *et al.* 1999; Van Den Berg, L., 1984):

- Aumentar la concentración de biomasa en el reactor mediante la recirculación de los lodos separados en el sedimentador secundario. Este proceso que dio origen a un sistema denominado 'reactor de contacto anaerobio' que es similar a los lodos activados (Figura 2.2A) pero bajo condiciones anaerobias. Ha sido utilizado en Suiza, Francia, Canadá y Estados Unidos principalmente para tratar aguas residuales con materia orgánica fácilmente degradable, como el almidón. Sin embargo, la adherencia de las burbujas de gas a los lodos genera problemas en la sedimentación del lodo y la clarificación del agua residual tratada. Para mejorar la separación del lodo se han utilizado diversos métodos como la adición de polímeros orgánicos y floculantes inorgánicos, la gasificación y la centrifugación, pero sus resultados no han sido satisfactorios.
- Con base en la estrategia de fijar la biomasa a un soporte de material inerte, se desarrollaron los filtros anaerobios de flujo ascendente, similares conceptualmente a los filtros percoladores (Figura 2.2B) Estos reactores fueron propuestos por Young y McCarthy (1969), y en ellos se utiliza un

medio de soporte (carbón, grava, plástico, etc.) con una gran área superficial para el desarrollo de una biopelícula anaerobia. Se han utilizado en el tratamiento de aguas residuales con bajas cargas orgánicas y material suspendido fácilmente biodegradable. Sin embargo, el principal inconveniente de este sistema ha sido el frecuente taponamiento de los reactores, ya sea por los sólidos presentes en el agua residual o por materiales como el carbonato de calcio o la biomasa no adherida al soporte.

- Desarrollar un gránulo cuyas características de sedimentación y actividad metanogénica, permitieran el desarrollo de todos los grupos bacterianos involucrados en el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica. Lodos con estas características facilitarían la segregación de las fases gaseosa, sólida y líquida, y evitarían la pérdida de la biomasa del reactor. Como producto de esta estrategia se presentó el reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente, comúnmente conocido como reactor *Up Flow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) (Figura 2.2C), sistema desarrollado en Holanda por el grupo de Lettinga *et al.* (1980). En la actualidad, existen más de 1.000 reactores que tratan exitosamente diferentes tipos de aguas residuales agroindustriales, domésticas e industriales en Holanda, Bélgica, Estados Unidos, Brasil y Cuba.

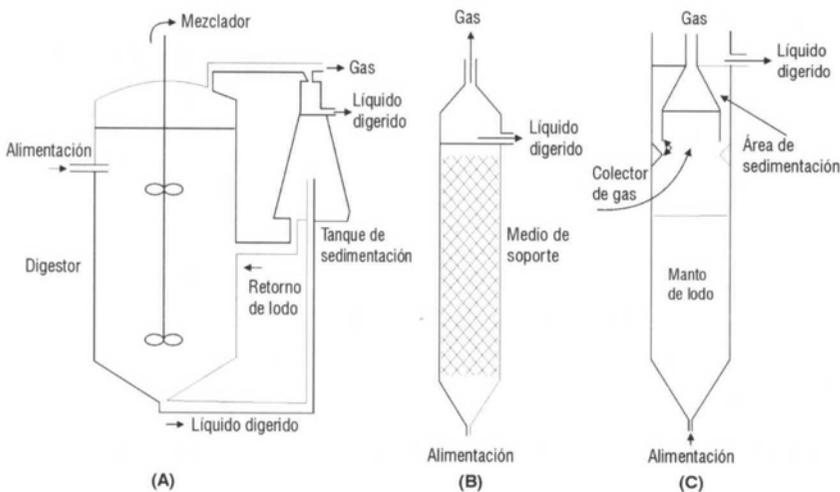


Figura 2.2 Diversos esquemas de reactores anaerobios:
(A) Contacto anaerobio, (B) Filtro anaerobio y (C) Reactor UASB.

Con aparición de la tercera generación de reactores anaerobios, se optimizaron algunas variables del proceso, las cuales que se citan a continuación:

- A fin de mejorar el contacto entre el sustrato y la biomasa, ésta se adhirió con partículas inertes de arena (diámetro: 0.1–0.3mm), alúmina o plástico, las cuales se expanden ante el flujo rápido del agua residual. Estos reactores se denominaron de ‘lecho fluidizado’ o ‘expandido’, y se han utilizado en el tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica (Figura 2.3A).
- También, para mejorar el contacto entre la biomasa y el sustrato, y evitar los problemas de taponamiento de los filtros anaerobios, se desarrolló el ‘reactor de película fija y flujo descendente’, en el cual la biomasa se adhiere a una superficie tubular (Figura 2.3B). La cantidad de biomasa dependerá del área superficial del soporte, el grosor de la película será controlado por el flujo del agua descendente y la mezcla del residuo se logra por el flujo de gas ascendente. Los sólidos suspendidos son eliminados con el efluente evitando así los problemas de taponamiento. Este sistema ha sido utilizado en el tratamiento de aguas residuales con baja y alta carga orgánica en países como Canadá y Puerto Rico.

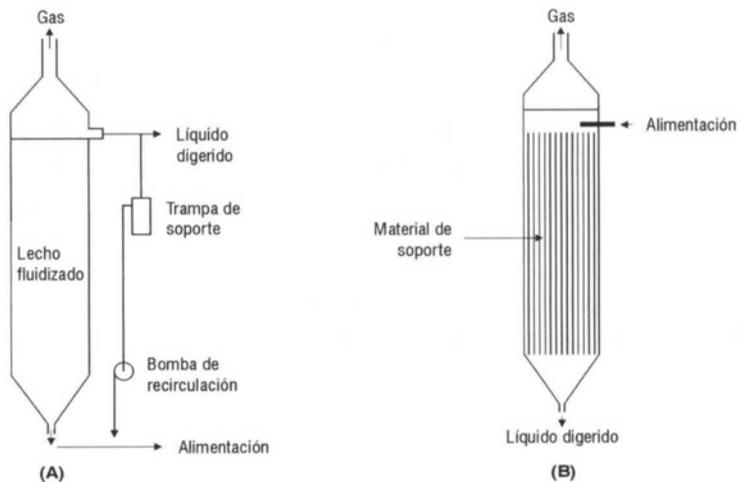


Figura 2.3 Reactores de lecho fluidizado (A) y de lecho fijo con flujo descendente (B).

- La separación de la fase metanogénica de las fases de hidrólisis y acidificación permite un manejo por aparte de los principales grupos microbianos involucrados. Este sistema se denomina 'reactor de fases separadas' y logra disminuir el tiempo de retención hidráulico, lo cual facilita la operación del sistema y confiere una mayor estabilidad al proceso (Figura 2.4). La separación ha sido exitosa principalmente con aguas residuales parcialmente acidificadas que se operan a bajas temperaturas.

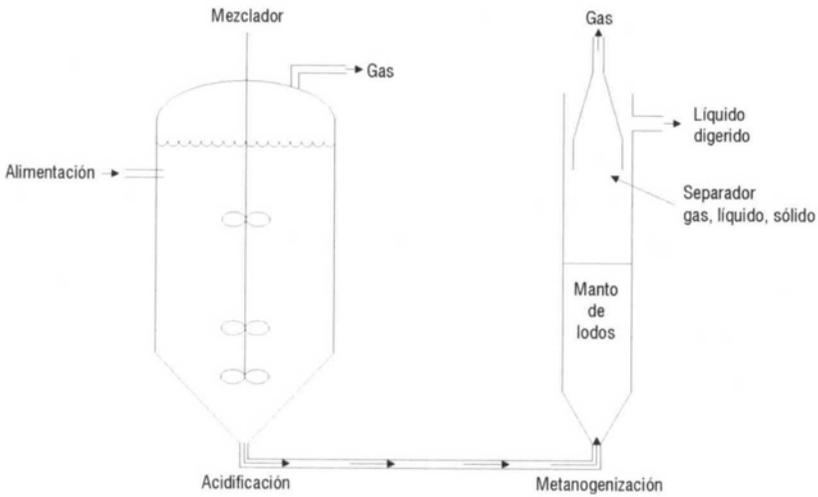


Figura 2.4 Reactores de fases separadas

BIBLIOGRAFÍA

- BALCH, W. E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. y Wolfe, R.S. (1979). "Methanogens: Reevaluation of Unique Biological Group". *Microbiological Reviews*, 43: 260-296.
- BARKER, H.A. (1936). "Studies upon the methane-producing bacteria". *Archiv für Mikrobiologie*, 7: 420-438.
- BARKER, H.A. (1956). *Bacterial Fermentations*. New York: John Wiley & Sons, p. 1-27.
- BRYANT, M.P., Wolin, E.A. y Wolfe, R.S. (1967). "*Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria". *Archiv für Mikrobiologie*, 59: 20-31.
- BUSWEL, A.N. y Sollo, F.W. (1948). "The mechanism of the methane fermentation". *American Chemical Society Journal*, 70: 1778.
- HUNGATE, R.E. (1967). "Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation". *Archiv für Mikrobiologie*, 59: 158-164.
- HUNGATE, R.E. (1969) "A roll tube method for cultivation of strict anaerobes". *Methods Microbiol*, 3B: 117-132.
- LETTINGA, G., Van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W. y Klapwijk, A. (1980). "Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment". *Biotechnology & Bioengineering*, 22: 699-734.
- LETTINGA, G., Hulshoff, Pol, L.W. y Zeeman, G. (1999). Lecture notes: Biological Wastewater Treatment. Part 1: Anaerobic Wastewater Treatment. Wageningen University The Netherlands. December 1999.
- MCCARTY, L. (1982). "One hundred years of anaerobic treatment". Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion, Federal Republic of Germany. Sept. 6-11, 1981. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- PINE, M.J y Barker, H.A. (1956). "Studies on the methane fermentation. XII. The pathway of hydrogen in the acetate fermentation". *Journal of Bacteriology*, 71: 644.

- STADMAN, R.C. y Barker, H.A. (1949). "Studies on the methane fermentation. VII. Tracer Experiments on the Mechanism of Methane Formation". *Archives of Biochemistry*, 21: 256.
- VAN DEN BERG, L. (1984). "Development in Methanogenesis from Industrial Waste Water". *Journal of Microbiology*, 30: 975-990.
- VAN HAANDEL, A. y Lettinga, G. (1994). Tratamento anaerobio de esgotos em regioes de clima quente. Editorial Epgraf. Campina Grande, Brasil.
- YOUNG, J.C. y McCarty, L. (1969). "The Anaerobic Filter for Waste Treatment". *J. Water Pollution Control Federation*, 41: R-160.

capítulo
tres

MICROBIOLOGÍA DE
LA DIGESTIÓN
ANAEROBIA

3

SE DENOMINA DIGESTIÓN ANAEROBIA AL PROCESO EN VIRTUD DEL CUAL LA MATERIA ORGÁNICA ES CONVERTIDA EN METANO, DIÓXIDO DE CARBONO E HIDRÓGENO, EN AUSENCIA DE OXÍGENO y a causa de la acción combinada de diferentes poblaciones bacterianas. La formación de metano y dióxido de carbono corresponde a la última etapa de una serie de reacciones en las cuales los compuestos orgánicos son degradados completamente.

La digestión anaerobia es un proceso que se produce en ambientes naturales como los pantanos, en zonas anegadas para el cultivo del arroz, en los sedimentos de lagos y mares, en las zonas anóxicas del suelo, en fuentes de aguas termales sulfurosas y en el tracto digestivo de los rumiantes. Bajo condiciones anaerobias, los diferentes grupos bacterianos interactúan unos con otros y constituyen una comunidad microbiana, la cual tiene una estructura definida y a la que contribuye cada población para su mantenimiento.

INTERACCIONES MICROBIANAS

En una comunidad, las diferentes poblaciones pueden desarrollar interacciones positivas y negativas, las cuales surgen en una sola población o entre las diferentes poblaciones que la conforman. *Estas interacciones permiten que las poblaciones alcancen un tamaño óptimo con los recursos disponibles del habitat; en su conjunto, las interacciones mantienen el balance ecológico de la comunidad.*

De acuerdo al principio de Allee, las interacciones positivas y negativas que ocurren en una población, dependen de la densidad. Cuando se presenta una relación positiva, la tasa de crecimiento aumenta y cuando es negativa, se presenta el efecto inverso. En general, las interacciones positivas (cooperación) se presentan en poblaciones con baja densidad, mientras que las interacciones negativas (competencia) se presentan cuando existe una alta densidad

poblacional. Como resultado, el máximo crecimiento se logra cuando se alcanza la densidad poblacional óptima.

Cuando dos poblaciones diferentes interactúan, una o ambas podrán beneficiarse o afectarse negativamente de esta relación. Para categorizar estas relaciones se utiliza un sistema de clasificación conceptual en el cual se describe cada una de ellas (Tabla 3.1). En general, en comunidades simples sólo se presentan una o más de estas interacciones; sin embargo, en comunidades complejas probablemente se presentan todas las interacciones posibles.

Tabla 3.1. Tipos de interacciones entre poblaciones microbianas

Interacción	Efecto de la interacción	
	Población A	Población B
Neutralismo	0	0
Comensalismo	0	+
Sinergismo	+	+
Mutualismo	+	+
Competencia	-	-
Amensalismo	0 / +	-
Predación	+	-
Parasitismo	+	-

0 = Sin efecto.
 + = Efecto positivo.
 - = Efecto negativo.

Fuente: Atlas y Bartha, 1993.

Con el desarrollo de interacciones positivas en una comunidad, los microorganismos utilizan los recursos disponibles en un determinado habitat de manera eficiente, combinando sus capacidades físicas y metabólicas, lo cual permite que las tasas de crecimiento y/o supervivencia aumenten. Las interacciones negativas actúan como un mecanismo de retro-alimentación que limita la densidad poblacional; no obstante, a largo plazo son un mecanismo de auto regulación que beneficia las especies porque evita la sobrepoblación, la destrucción del habitat y la extinción.

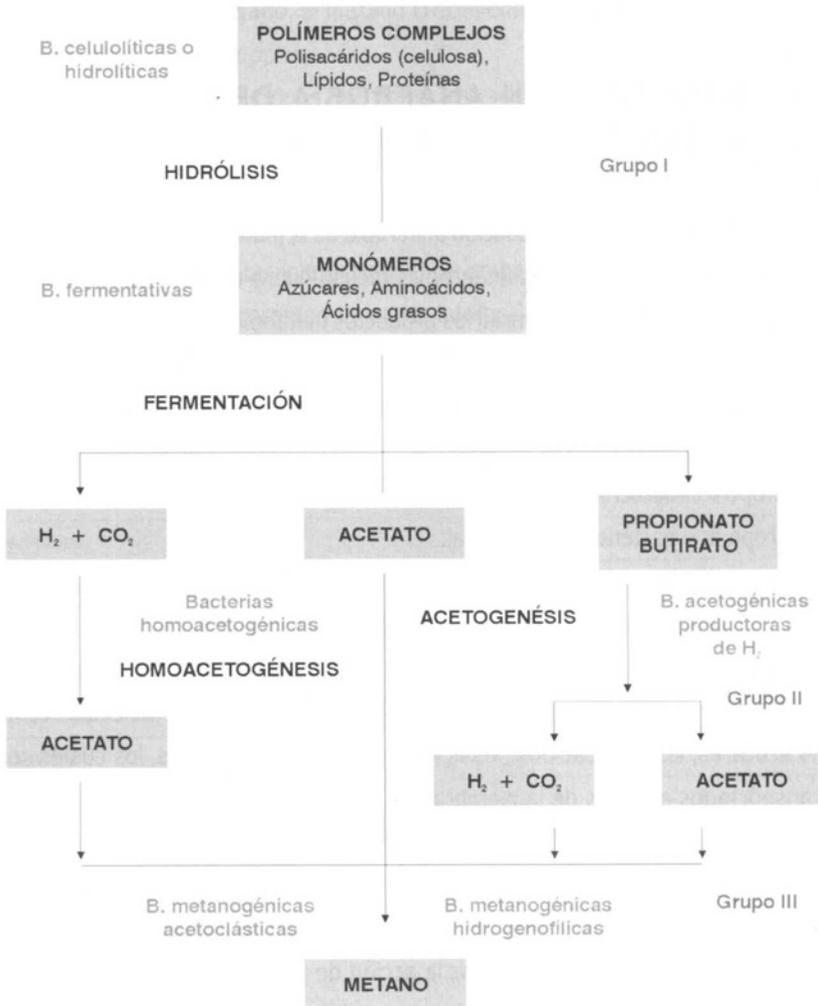
DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE LA MATERIA ORGÁNICA

En el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica intervienen diversos grupos de bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas las cuales utilizan en forma secuencial los productos metabólicos generados por cada grupo, según se esquematiza en la Figura 3.1. El flujo de carbonos y electrones generado durante la degradación anaerobia de los compuestos orgánicos involucra tres grandes grupos tróficos:

- Grupo I: bacterias hidrolíticas y fermentativas.
- Grupo II: bacterias acetogénicas.
- Grupo III: bacterias metanogénicas.

El proceso se inicia con la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos por la acción de enzimas extracelulares producidas por las bacterias del Grupo I. Los productos de esta reacción son moléculas de bajo peso molecular como los azúcares, los aminoácidos, los ácidos grasos y los alcoholes, los cuales son transportados a través de la membrana celular; posteriormente son fermentados a ácidos grasos con bajo número de carbonos como los ácidos acético, fórmico, propiónico y butírico, así como compuestos reducidos como el etanol, además de H_2 y CO_2 . Los productos de fermentación son convertidos a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por la acción de las bacterias del Grupo II, las cuales son conocidas como 'bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno' (Figura 3.1).

Finalmente, las bacterias del Grupo III o metanogénicas convierten el acetato a metano y dióxido de carbono, o reducen el dióxido de carbono a metano. Estas transformaciones involucran dos grupos metanogénicos que son los encargados de llevar a cabo las transformaciones mencionadas anteriormente. En menor proporción, compuestos como el metanol, las metilaminas y el ácido fórmico pueden también ser usados como sustratos de el grupo metanogénico (Figura 3.1).



Fuente: Madigan, Martinko y Parker, 1997.

Figura 3.1. Principales etapas de la digestión anaerobia y grupos bacterianos involucrados.

En la Tabla 3.2 se consignan las principales reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el proceso de digestión anaerobia con los correspondientes cambios de energía libre.

Tabla 3.2. Principales reacciones químicas que ocurren en la digestión anaerobia de la materia orgánica

Tipo de Reacción	Ecuación	$\Delta G^{\circ 1}$ (KJ/reacción)	$\Delta G^{\circ 2}$ (KJ/reacción)
Fermentación de glucosa a acetato	$\text{Glucosa} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}^+ + 4\text{H}_2$	- 207	- 319
Fermentación de la glucosa a butirato	$\text{Glucosa} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	- 135	- 284
Fermentación del butirato a acetato e H_2	$\text{Butirato} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	+ 48.2	- 17.6
Fermentación del propionato a acetato	$\text{Propionato} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	+ 76.2	- 5.5
Acetogénesis a partir del H_2 y CO_2	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	- 105	- 7.1
Metanogénesis a partir del CO_2 y H_2	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	- 136	- 3.2
Metanogénesis a partir del acetato	$\text{Acetato} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	- 31	- 24.7

¹ Condiciones estándar: solutos 1 molar, gases 1 atmósfera.

² Condiciones típicas en un reactor anaerobio: AGV = 1mM, HCO_3^- = 20mM, Glucosa = 10mM, CH_4 = 0.6mM, H_2 = 10₋₄ mM.

Fuente: Zinder, 1984.

BACTERIAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA

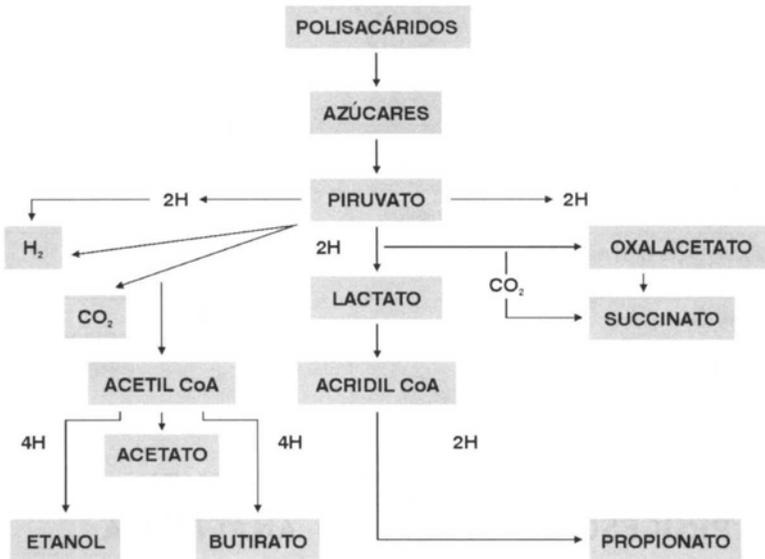
Grupo I: Bacterias fermentativas - hidrolíticas

La utilización microbiana de polímeros complejos requiere que los microorganismos involucrados en su degradación sean capaces de hidrolizar o romper las moléculas de polisacáridos, proteínas y grasas e hidrolizarlas a compuestos simples como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos. Las bacterias que llevan a cabo estas reacciones son anaerobias facultativas y los géneros más frecuentes que llevan a cabo esta reacción son los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, además de

los géneros: *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium*.

DIGESTIÓN ANAEROBIA DE POLISACÁRIDOS

En aguas residuales, los polisacáridos más comunes son la celulosa, la hemicelulosa, el almidón y la pectina; normalmente están presentes en materiales como el papel, la madera o la paja, los cereales y tubérculos comestibles, así como en los productos del procesamiento del café y la fabricación de cerveza.



Fuente: Bryant, 1979.

Figura 3.2. Principales vías metabólicas de la degradación anaerobia de polisacáridos.

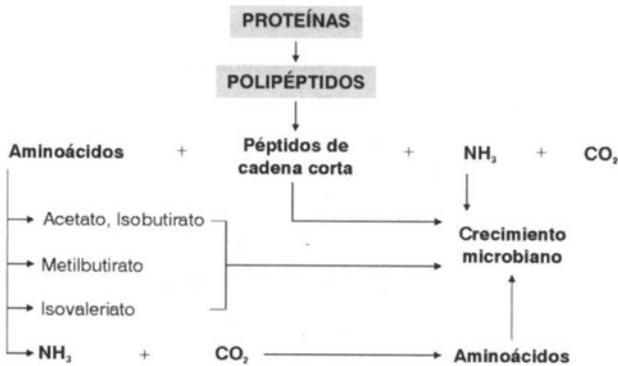
Los polisacáridos son carbohidratos de alto peso molecular constituidos por un gran número de unidades monoméricas unidas una a otra por enlaces covalentes conocidos como enlaces glucosídicos. Estos enlaces pueden tener orientación α o β , por lo que algunos polisacáridos con las mismas unidades monoméricas (por ejemplo, la glucosa), tienen propiedades funcionales diferentes debido a las diferentes configuraciones (α y β) de los enlaces glucosídicos. Es

común encontrar dos tipos importantes de polisacáridos: aquellos como la celulosa y la hemicelulosa con enlaces β -1-4, y los polisacáridos como la pectina y el almidón, con enlaces α -1-4. En la Figura 3.2 se presentan las principales vías metabólicas utilizadas en la degradación de polisacáridos.

El rompimiento de los enlaces β -1-4 presentes en la celulosa se lleva a cabo mediante la acción de enzimas extracelulares, las cuales rompen el enlace introduciendo una molécula de agua. Las enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa se conocen como 'celulasas'. El rompimiento de los enlaces α -1-4, comunes en el almidón y la pectina, son hidrolizados por la acción de amilasas y pectinasas las cuales son enzimas constitutivas de la gran mayoría de los organismos.

DIGESTIÓN ANAEROBIA DE PROTEÍNAS

Las proteínas se encuentran comúnmente en aguas residuales y están constituidas por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Las proteínas son solubles en agua y su hidrólisis se lleva a cabo por acción de proteasas; los productos son generalmente péptidos de cadena corta y aminoácidos. Estos productos son rápidamente fermentados a ácidos orgánicos, amonio y CO_2 . Las bacterias con actividad proteolítica son en su mayoría especies de los géneros *Clostridium*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium* y *Staphylococcus*. Las vías metabólicas utilizadas en la degradación de proteínas se presentan en la Figura 3.3.



Fuente: McInerney, 1988.

Figura 3.3. Degradación de proteínas y metabolismo del nitrógeno.

DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LÍPIDOS

Estas moléculas están constituidas por ácidos grasos unidos por un enlace éster a una molécula de glicerol, y se denominan triglicéridos cuando tres ácidos grasos se unen al glicerol. La hidrólisis dependerá de la solubilidad del ácido, la cual a su vez es función del pH. Por tanto, a altos valores de pH la solubilidad aumenta y a bajos valores disminuirá, por lo que la hidrólisis tendrá un comportamiento similar.

En ambientes anaerobios, los ésteres del glicerol son hidrolizados liberando los ácidos grasos. El glicerol, la galactosa, la colina y otros componentes también son liberados durante la hidrólisis y posteriormente fermentados a ácidos grasos volátiles por la acción de las bacterias fermentativas. Sin embargo, los ácidos grasos libres no son fermentados por las bacterias fermentativas, y solamente en algunos casos los ácidos grasos insaturados pueden ser hidrogenados. En los digestores anaerobios y sedimentos acuáticos, donde el tiempo de retención es suficientemente largo, los ácidos grasos (de cadenas larga y corta) son oxidados por las bacterias sintróficas productoras de H_2 a acetato mediante la vía de la B-oxidación. En ambientes ricos en sulfatos como los sedimentos marinos, la degradación se lleva a cabo por las bacterias sulfato reductoras. Bacterias como *Anaerovibrio lipolytica* con actividad lipolítica han sido aisladas del rumen; esta bacteria fermenta el glicerol, la ribosa y la fructosa a acetato, propionato y succinato; sin embargo, no puede hidrolizar galactolípidos a menos que los residuos de galactosa sean removidos. Igualmente, la *Butyrovibrio fibrisolvens* hidroliza fosfo-lípidos cuando crece con azúcares fermentables como fuente de carbono.

Grupo II: Bacterias acetogénicas

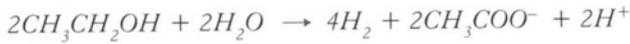
Para que tenga lugar una eficiente metanogénesis, los productos de fermentación como el propionato y el butirato deben ser oxidados a acetato, CO_2 , e H_2 . Esta oxidación es llevada a cabo por un grupo denominado organismos acetógenos productores obligados de hidrógeno (OHPA, *Obligate Hydrogen Producing Acetogens*), mediante un proceso conocido como 'acetogénesis'.

Aunque la mayoría de este tipo de reacciones consumen energía, el acoplamiento de la actividad de las bacterias OHPA con la de las bacterias consumidoras de H_2 (metanógenos hidrogenofílicos), mediante la 'transferencia interespecífica de hidrógeno', permiten un balance energético favorable. Esto significa que en ambientes donde la energía disponible para los microorganismos es baja, como ocurre en reactores anaerobios, las relaciones de cooperación entre los dos grupos microbianos permiten el máximo aprovechamiento de la energía. Así, si una célula requiere un mínimo de +70kJ para la síntesis de 1 mol de ATP, las relaciones de cooperación entre los microorganismos, permitirán mantener sus actividades metabólicas con sólo -20kJ (Schink,1997).

TRANSFERENCIA INTER-ESPECÍFICA DE HIDRÓGENO

Durante la acetogénesis el hidrógeno es un factor de regulación de la degradación anaerobia de compuestos orgánicos. La producción de hidrógeno en esta fase proviene de la oxidación del NADPH (nicotin-adenin-difosfo-nucleótido) cuyo potencial redox a pH 7 es -0.32 V (Wolin, 1976). Sistemas con bajos potenciales redox (E_h), como el que se obtiene durante la acetogénesis del piruvato, se ven poco afectados por la presión parcial de hidrógeno y las reacciones están favorecidas, por lo cual no pueden ser controladas. Reacciones en sistemas con altos potenciales redox (E_h), como los que se presentan en la producción de H_2 a partir del NADPH, o en la acetogénesis a partir del propionato o butirato, sólo estarán favorecidas a bajas presiones parciales de hidrógeno, condición facilitada por la interrelación entre las bacterias OHPA y las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas. Este último grupo, consume el hidrógeno generado por las OHPA manteniendo una presión parcial de H_2 a un nivel adecuado para que termodinámicamente pueda darse la conversión de los AGV a acetato e hidrógeno. Esta asociación se conoce como 'relación sintrófica' o 'transferencia interespecífica de hidrógeno'.

El sistema sintrófico mejor estudiado en el metabolismo fermentativo, es la fermentación del etanol a acetato y metano por un agente oxidante anaerobio y un metanógeno.

Fermentación del etanol:

Etanol

Acetato

$$\Delta G^\circ = + 41.9 \text{ KJ/reacción}$$

Metanogénesis:

$$\Delta G^\circ = -142.5 \text{ KJ/reacción}$$

Reacción acoplada:

$$\Delta G^\circ = -100.6 \text{ KJ/reacción}$$

En este sistema, los fermentadores del etanol producen hidrógeno y acetato en una reacción con un balance energético desfavorable. Sin embargo, el hidrógeno generado por las bacterias fermentativas es consumido por un metanógeno en una reacción energéticamente favorable. Cuando el cambio en energía libre de estas dos reacciones se suma la reacción total será energéticamente favorable.

Solamente un limitado número de especies del grupo OHPA han sido aisladas; probablemente existen más, pero aún no son conocidas. Dentro de las especies aisladas capaces de degradar ácidos grasos se pueden mencionar:

- *Syntrophomonas sapovorans* (Roy *et al.*, 1986): oxida ácidos grasos de 4 a 8 carbonos y algunos ácidos grasos insaturados produciendo acetato, CO_2 e H_2 .
- *Syntrophobacter wolinii* (Boone y Bryant, 1980): oxida propionato generando acetato, CO_2 e H_2 .

(OHPA)



$$\Delta G^\circ = + .76 \text{ KJ/reacción}$$

Reacción acoplada con la bacteria metanogénica:

$$\Delta G^\circ = -102.4 \text{ KJ/reacción}$$

- *Syntromonas wolfei* (McInerney *et al.*, 1981). Oxida ácidos monocarboxílicos saturados de 4 a 8 carbonos a acetato e hidrógeno.
- *Syntrophospora bryantii* (Stieb y Schink, 1985; Zhao *et al.*, 1990) : oxida ácidos grasos de cuatro a once carbonos.
- *Syntrophus buswellii* (Mountfort, 1984): oxida el benzoato.

Todas las bacterias OHPA aisladas crecen lentamente y sus tiempos de generación son muy largos. El estudio de *Syntrophobacter wolinii* (Boone y Bryant, 1980) mostró que en simbiosis con *Methanospirillum hungatei* tiene un tiempo de generación de 161 horas. Este hecho junto con las necesidades de aislarlas en co-cultivo ha limitado su estudio fisiológico. Sin embargo en 1987, Kaspar y su grupo de trabajo lograron desacoplar la oxidación del butirato y la utilización del hidrógeno, sustituyendo la bacteria hidrogenofílica por una oleofina en presencia de catalizadores. De esta forma, se logró el cultivo puro de la bacteria OHPA abriendo así, nuevas perspectivas para futuros trabajos.

Los rendimientos energéticos (ΔG°) de todas las conversiones realizadas por el grupo OHPA a condiciones estándar (solutos 1M; gases 1 atm) son positivos, por lo que se piensa que la oxidación de los ácidos grasos a hidrógeno deberá estar acoplada a la producción de ATP. Esto significa que la presencia o ausencia de H_2 afectará el rendimiento energético de la reacción. Como la concentración tanto del reactante como la del producto afecta el cambio en energía libre de la reacción (ΔG°), el rendimiento energético en situaciones reales puede diferir del rendimiento obtenido a condiciones estándar. Así, cuando el H_2 es un producto, las bacterias consumidoras de hidrógeno pueden mantener la concentración de H_2 tan baja que el rendimiento energético estará afectado significativamente. Por ello, durante la fermentación del etanol a acetato e H_2 el ΔG° (a 1 atm) es de + 9.63 kJ, sin embargo a 10^{-4} atm. el cambio en energía libre es de -36.03 kJ.

Teniendo en cuenta lo anterior, en una digestión anaerobia estable, las condiciones de las reacciones estarán controladas por la concentración de propionato, acetato e hidrógeno libre, donde las concentraciones de acetato y propionato oscilarán entre 10^{-4} y 10^{-5} molar y las presiones parciales de hidrógeno serán inferiores a 10^{-4} atmósferas (Figura 3.4). A presiones parcia-

les de H_2 mayores a 10^{-1} para el etanol, 10^{-3} para el propionato, y 10^{-4} para el butirato, la transferencia de hidrógeno no ocurre. A estos valores se produce una inhibición de las bacterias hidrogenofílicas, lo cual genera una sobreproducción de H_2 cuya acumulación inhibirá el proceso. También es necesario tener en cuenta que a nivel de la primera etapa las bacterias fermentativas transfieren los electrones vía H_2 a las bacterias hidrogenofílicas, haciendo que las primeras produzcan una mayor cantidad de acetato y por tanto una mayor cantidad de energía. Cuando la transferencia de hidrógeno no ocurre, el metabolismo de las bacterias fermentativas se desplazará hacia una mayor producción de compuestos reducidos como el etanol, el lactato, el propionato, el butirato, etc.

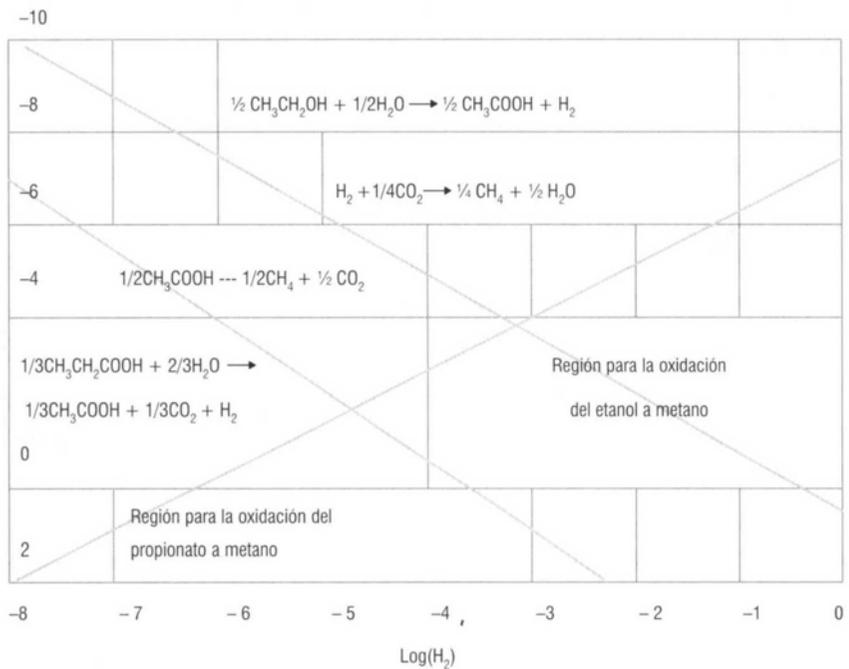


Figura 3.4. Efecto de la presión parcial de hidrógeno sobre la energía libre durante la conversión del etanol, el propionato, el acetato y el hidrógeno durante la digestión anaerobia.

Las relaciones dependientes de la transferencia interespecífica de hidrógeno se pueden presentar en los siguientes casos:

1. En bacterias involucradas en el catabolismo de alcoholes o lactato. Estos microorganismos pueden crecer con otros sustratos sin necesidad de una transferencia de hidrógeno, pero sólo pueden degradar alcoholes o lactato cuando el hidrógeno es removido por asociación con bacterias consumidoras de hidrógeno o cuando hay un aceptor de hidrógeno inorgánico (sulfato) u orgánico (fumarato).
2. En bacterias que degradan carbohidratos simples y complejos. Crecen bien sin que se produzca la remoción de hidrógeno, sin embargo cuando están en presencia de bacterias consumidoras de hidrógeno incrementan la producción de hidrógeno y acetato, disminuyendo la concentración de propionato, butirato, lactato y etanol.
3. En bacterias que producen hidrógeno de forma obligatoria, por lo que deben mantener una relación sintrófica obligada con bacterias consumidoras de hidrógeno las cuales reducen las concentraciones de hidrógeno en el medio (Ramírez, 1997).

Aunque la transferencia interespecífica se asocia fundamentalmente al hidrógeno, se ha podido establecer que el formato y el acetato también pueden ser transferidos. La difusión de estos compuestos de un organismo a otro, es un fenómeno regulado por factores como la relación área superficial/volumen de las bacterias, la constante de difusión del compuesto, el gradiente de concentración y la distancia entre los dos organismos (Schink y Thauer, 1988).

La distancia entre organismos productores y consumidores es un factor crítico para la difusión del H_2 y dependerá de la forma en que este estructurada la biomasa. Células agrupadas en lodos granulares presentan alta densidad celular lo cual favorece la transferencia interespecífica de electrones, por lo que con estos lodos se obtiene una alta actividad metanogénica con sustratos como propionato y butirato (Grotenhuis *et al.*, 1991).

Estudios orientados a determinar la importancia relativa de otros sustratos en la transferencia de electrones en cultivos sintróficos, no han mostrado resultados concluyentes a este respecto. En el caso del formato, las bajas concentraciones, la poca capacidad de las poblaciones acetogénicas para formar este sustrato, así como la baja capacidad de los metanógenos y sulfato reductoras para utilizarlo, son algunos de los factores que han dificultado establecer con claridad el papel

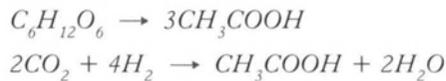
de este compuesto en la transferencia interespecífica de electrones (Grotenhuis *et al.*, 1991; Stams, 1994).

BACTERIAS HOMO-ACETOGÉNICAS

Dentro del grupo de acetógenos existe un grupo de bacterias conocidas como 'bacterias homo-acetogénicas' las cuales son anaerobias obligadas y utilizan el CO_2 , como aceptor final de electrones, produciendo acetato como producto único de la fermentación anaeróbica. Los electrones para la reducción del CO_2 provienen del H_2 y de una variedad de compuestos como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos y ciertas bases nitrogenadas.

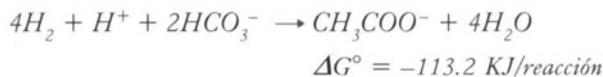
Aunque este grupo no es un grupo taxonómico definido, en él se incluyen una amplia variedad de bacterias Gram (+) y Gram(-) formadoras de esporas tales como *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum* y *Acetobacterium woodii* (Balch *et al.*, 1977).

Las especies *Clostridium* y *Acetobacterium woodii* pueden utilizar compuestos orgánicos o inorgánicos mediante la fermentación homoacética de azúcares o la reducción del CO_2 , de la siguiente forma:



Las bacterias homo-acetogénicas fermentan la glucosa mediante la vía glucolítica produciendo dos moléculas de piruvato y dos moléculas de NADH. Además del acetato producido a partir de las dos moléculas de piruvato, una tercera molécula de acetato se genera por la reducción del CO_2 producido en la reacción, utilizando los 4 electrones generados en la glucólisis más los 4 electrones producidos en la oxidación del piruvato. Por tanto, la producción total a partir del piruvato son tres moléculas de acetato.

La mayoría de los homoacetógenos convierten el CO_2 en acetato por la vía de la acetil-CoA. La reacción de homoacetogénesis es:



En la Figura 3.5. se presentan las reacciones seguidas por las bacterias homoacetogénicas, sulfato reductoras y metanogénicas para la síntesis de acetato. El grupo metilo del acetato se origina en una serie de reacciones enzimáticas en las cuales el CO_2 se reduce para formar el grupo metilo del acetato, y otra molécula de CO_2 se incorpora para formar el grupo carboxilo. La vía Acetil-CoA requiere H_2 como donador de electrones, y una enzima clave es la carboxil-monóxido-dehidrogenasa que contiene como cofactores los metales Ni, Zn, y hierro. La importancia de esta enzima es que cataliza la reducción del dióxido de carbono a monóxido de carbono, el cual termina en la posición carbonil del acetato. Inicialmente el CO_2 se reduce a formato por la acción de la enzima formiato-dehidrogenasa, y posteriormente se convierte en formil-tetrahidrofoliato. El grupo metilo es entonces transferido a una enzima que tiene vitamina B_{12} como cofactor. En la fase final de la síntesis del acetato, el grupo metilo se combina con el CO en la monóxido dehidrogenasa. La adición de la coenzima A se produce en este punto, y la CO-dehidrogenasa cataliza la formación del acetil-CoA como producto final.

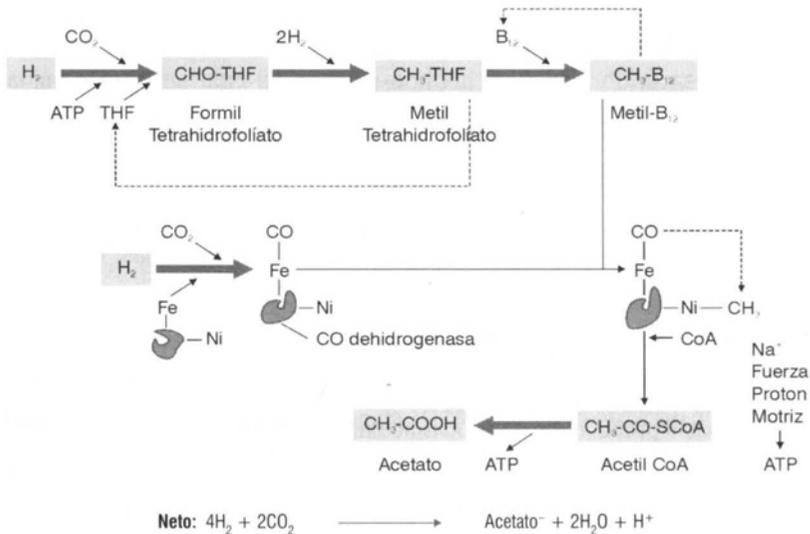


Figura 3.5. Vía del Acetil-CoA, mecanismo autótrofo de las bacterias homo-génicas, sulfato reductoras y metanogénicas. (Tomado de Brock, 1997)

Grupo III: Bacterias metanogénicas

Las bacterias metanogénicas pertenecen al grupo actualmente conocido como *Archaea*, cuyos miembros presentan características diferentes a las encontradas en *Bacteria*. Estas características están relacionadas fundamentalmente con la composición química de algunas estructuras celulares.

Aunque la estructura de la membrana celular es una bicapa de fosfolípidos, en lugar de los enlaces éster presentes en la unión entre el glicerol y los ácidos grasos, los lípidos del grupo *Archaea* son químicamente únicos, debido a que la unión del glicerol a las cadenas laterales hidrofóbicas se hacen mediante enlaces éter, además los lípidos carecen de ácidos grasos y en su lugar presentan cadenas laterales constituidas por unidades del hidrocarburo isopreno. Los di-éteres de glicerol y los tetra-éteres de glicerol son las principales clases de lípidos presentes en las especies del grupo *Arquea*, ellos forman una monocapa lipídica, en lugar de un arreglo de bicapa. Estas monocapas son muy resistentes y se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias hipertermófilas.

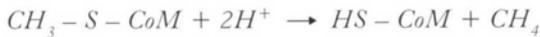
En forma similar, las paredes de algunos metanógenos están constituidas de un polisacárido similar al péptido-glucano, el cual se ha denominado pseudopéptido-glucano y está compuesto de unidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetiltalosaminurónico. Los enlaces glucosídicos son 1-3 en lugar de los 1-4 encontrados en el péptidoglucano. Las paredes celulares de otros *Archaea* están constituidas de polisacáridos, glicoproteínas, o proteínas. Especies de *Methanosarcina* presentan paredes gruesas de polisacáridos constituidos de glucosa, ácido glucurónico, galactosamina, y acetato.

Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas y producen metano como principal producto del metabolismo energético. A pesar de los requerimientos estrictos de anaerobiosis obligada y el metabolismo especializado de este grupo, estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. La actividad metanogénica es mucho mayor en ecosistemas de agua dulce y terrestres, la menor actividad detectada en océanos, se debe a la alta concentra-

ción de sulfatos, condición que favorece la sulfato reducción en sedimentos marinos (Whitman *et al.*, 1992; Zinder, 1998).

Las bacterias metanogénicas pueden llevar a cabo una serie de reacciones por la presencia de ciertas coenzimas, las cuales no se encuentran en otros géneros de bacterias, y se clasifican de la siguiente manera: coenzimas transportadoras de C_1 : coenzima M, metanofurano y metanopterina, y coenzimas involucradas en reacciones Redox: coenzima F_{420} y HS-HTP (fosfato de 7-mercaptoheptanoil treonina).

- Coenzima F_{420} : actúa como donador de electrones en la reducción del CO_2 en la metanogénesis hidrogenofílica. Esta coenzima en estado oxidado absorbe luz a 420nm y presenta fluorescencia azul verdosa, esta fluorescencia constituye una herramienta útil para la identificación preliminar de las bacterias metanogénicas (Whitman *et al.*, 1992).
- Coenzima F_{430} : actúa en el paso final de la metanogénesis como parte del sistema metil reductasa. Absorbe luz a 430 nm pero a diferencia del factor F_{420} no fluoresce.
- Metanofurano: está involucrado en el primer paso de la formación de metano a partir del CO_2 .
- Metanopterina: fluoresce a 342nm emitiendo un color azul brillante, es similar al ácido fólico, y actúa como transportador de compuestos monocarbonados durante la reducción del CO_2 a metano. La forma activa de la coenzima "in vivo" es la forma reducida, la tetrahidrometanopterina (THMP).
- Coenzima M: transporta los grupos metílicos y se reduce por el complejo enzimático metil-reductasa- F_{430} al final de la formación de metano.



Un potente inhibidor de la coenzima M es el ácido bromo-etano-sulfónico, este compuesto a una concentración de $10^{-6}M$ causa una inhibición del 50% de la actividad de la metil-reductasa, así como el crecimiento de las bacterias metanogénicas.

- La HS-HTP: (fosfato de 7 mercapto-heptanoil-treonina), al igual que la coenzima M, este cofactor está involucrado en la fase final de la formación

de metano catalizada por el sistema metil-reductasa. Su estructura es similar al ácido pantoténico, y actúa como donador de electrones en el sistema metil-reductasa.

Este grupo requiere amonio como fuente de nitrógeno, además de azufre, y micronutrientes como cobalto, níquel y hierro. El tungsteno, selenio, molibdeno y ciertas vitaminas como biotina, ácido p-aminobenzoico y riboflavina son estimuladores del crecimiento (Jarrel y Kalmokoff, 1987). Utilizan un limitado número de sustratos para la generación de metano, los principales sustratos son: $H_2 + CO_2$, formato y acetato. Adicionalmente otros compuestos de C_1 , pueden ser utilizados como son: metanol, trimetilamina, y algunos alcoholes como isopropanol, isobutanol, ciclopentano y etanol.

Con base en el tipo de sustrato utilizado, los bacterias metanogénicas se subdividen en tres grupos (Whitman *et al.*, 1992):

Grupo I: Utiliza como fuente de energía H_2 , formato y ciertos alcoholes, el CO_2 es el aceptor final de electrones el cual es reducido a metano. La reducción de CO_2 es importante para mantener una baja concentración de H_2 y formato, condición indispensable para los procesos de transferencia interespecífica de electrones.

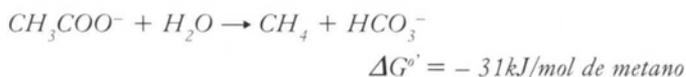
Reacciones	ΔG° (KJ/mol de metano)
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-135.6
$4 \text{ Formato} \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	-130.1

Grupo II: Utiliza una amplia variedad de compuestos que tienen el grupo metilo durante el metabolismo energético. Algunas de moléculas son oxidadas a CO_2 , el cual actúa como aceptor final de electrones y se reduce directamente a CH_4 .

Reacciones	ΔG° (KJ/mol de metano)
$4 \text{ Metilamina} + H_2O \rightarrow CH_4 + CO_2 + 4 NH_4$	-75
$2 \text{ Dimetilamina} + 2 H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_4$	-73.2

Aunque el metanol y H_2-CO_2 , pueden ser metabolizados simultáneamente, el metanol es consumido más rápidamente. El metabolismo de la amina metilada a CH_4 , conlleva a la producción de amonio, el cual es utilizado como fuente de nitrógeno (Jarrel y Kalmokoff, 1987).

Grupo III: aunque la mayor parte del metano que se genera en la naturaleza proviene del rompimiento del acetato, la habilidad de catabolizar este sustrato esta limitada a los géneros: *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (*Methanotrix*). El carbono metilado del acetato es reducido directamente a metano y el grupo carboxilo es oxidado a CO_2 . El acetato es utilizado como fuente de carbono y de energía, sin embargo, la energía que se obtiene a partir del acetato es pobre.



Género *Methanosarcina*: Se asocian formando pseudosarcinas y tienen baja afinidad por el acetato. La constante de afinidad por este sustrato (K_m) es del orden de 5mM y el tiempo de generación pueden llegar a 30 horas cuando se cultivan con este sustrato. Además del acetato, este género puede utilizar metilaminas, metanol y algunas especies pueden actuar hidrogenofílicamente. Las especies más representativas son: *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* y *Methanosarcina thermophila*.

Género *Methanosaeta* (antes llamado *Methanotrix*): Este grupo tienen un K_m para el acetato entre 0.7–1.2 mM y tiempos de generación entre 65 y 70 horas. Aunque las especies de este grupo no utilizan ni el hidrógeno, ni el metanol, ni las metilaminas, no son inhibidas por el hidrógeno o el formato. Dada la gran afinidad por el acetato, es recomendable mantener en los digestores anaerobios un alto contenido en este grupo de bacterias. Por lo general, es frecuente encontrar en lodos granulares un alto contenido de *Methanosaeta*. (Whitman *et al.*, 1992).

Es frecuente encontrar en reactores anaerobios, una competencia por el acetato entre las especies de los géneros *Methanosaeta* y *Methanosarcina*, sin embargo, las bajas concentraciones de acetato que usualmente predominan al interior de los reactores favorece el crecimiento del género *Methanosaeta*. Por

otra parte, también existen diferencias en los requerimientos de pH entre los dos géneros, *Methanosaeta* trabaja a pH 7.0, mientras *Methanosarcina* generalmente se presenta a valores inferiores a 7.0. Otra característica diferente se relaciona con la predominancia del género *Methanosaeta* en lodos con altas concentraciones de propionato, lo cual señala su mejor adaptación a este sustrato. En el caso de *Methanosarcina* hay una mejor adaptación al etanol, fenómeno asociado con los cambios del pH, producidos cuando la oxidación del etanol no está acoplada con la conversión del acetato. Cuando esto ocurre, el pH disminuye y las concentraciones de acetato se incrementan, lo cual favorece el desarrollo de la población de *Methanosarcina* (Grotenhui, et al., 1991).

METANOGENÉISIS

La producción de metano es la principal forma por medio de la cual las bacterias metanogénicas obtienen la energía necesaria para el crecimiento. Desde un punto de vista metabólico, la formación de metano es un tipo de respiración anaerobia en la cual, el dióxido de carbono actúa como aceptor de electrones y el hidrógeno es utilizado para reducirlo. Los estudios bioquímicos indican que el sistema de transporte de electrones no es igual al encontrado en organismos aerobios, no hay citocromos ni quinonas, y existe un sistema de transportadores en los cuales algunas de las coenzimas mencionadas permiten la reducción secuencial de los intermediarios monocarbonados.

Metanogénesis hidrogenofílica

La reducción de CO_2 a metano es un proceso H_2 dependiente aunque compuestos como el formato, el monóxido de carbono, y aún el hierro elemental (Fe^0) pueden actuar como donadores de electrones en este proceso (Vogels et al., 1982).

La reducción de CO_2 a CH_4 se efectúa mediante la utilización de varios intermediarios y los principales pasos se pueden resumir de la siguiente manera (Figura 3.6):

1. activación del CO_2 mediante su unión al metanofurano, y la posterior reducción del grupo formilo
2. transferencia del grupo formilo del metanofurano a la tetrahidrometanopterina, y la posterior deshidratación y reducción en dos etapas separadas a nivel de los grupos metileno y metilo.
3. transferencia del grupo metilo de la metanopterina a la coenzima M.
4. reducción del metil-coenzima M a metano mediante la acción del sistema metil-reductasa en el cual participan el F_{430} y el HS-HTP. El donador de electrones para esta reacción es el HS-HTP y el producto de la reacción además del CH_4 , es un disulfuro de la CoM y del HTP (CoM-S-S-HTP). Por reducción con H_2 se regeneran CoM y HS-HTP en libre.

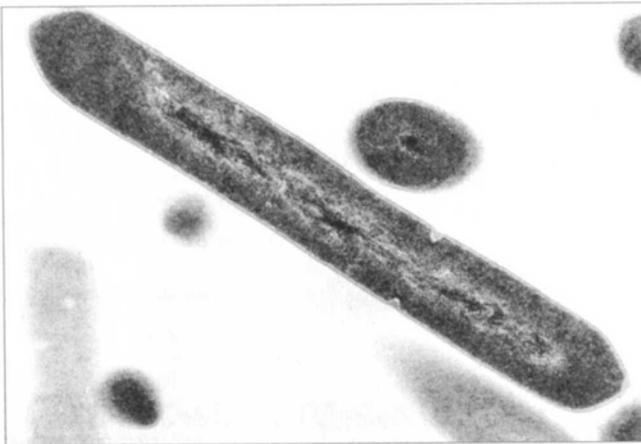


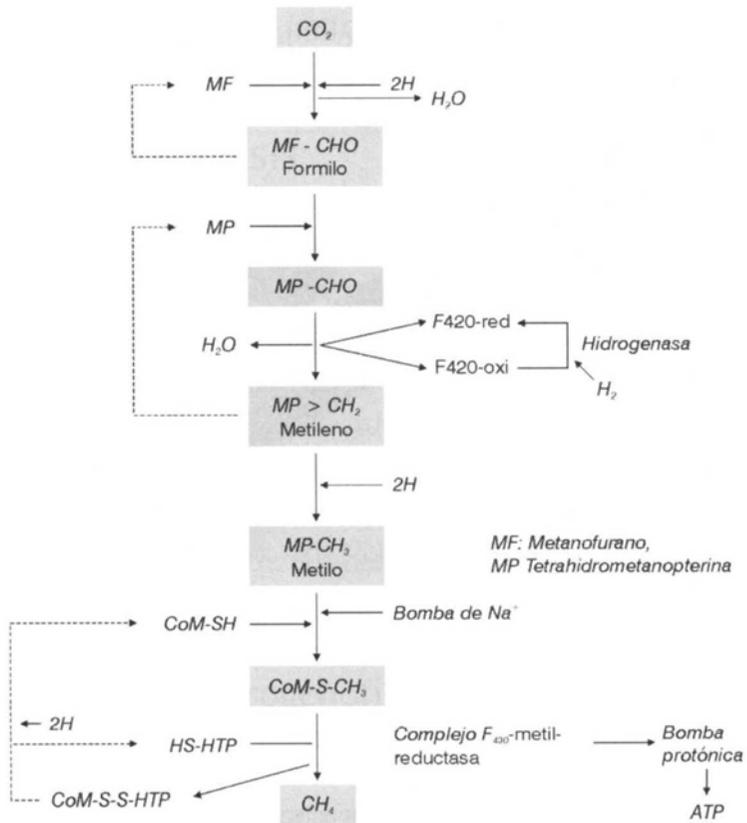
Foto de microscopía electrónica

Figura 3.6. *Methanobacterium formicicum*

Metanogénesis acetoclástica

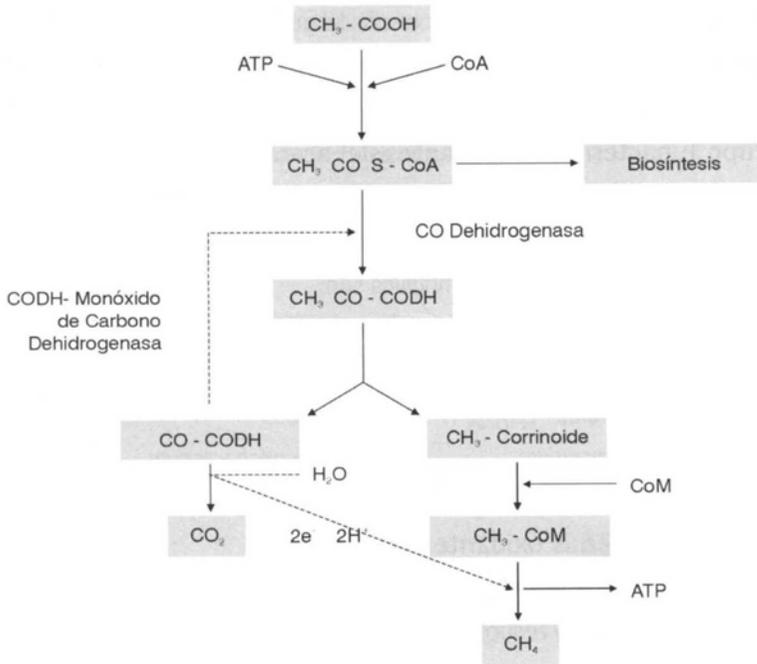
Las reacciones de la vía acetyl-CoA explicadas anteriormente están relacionadas con la producción de metano a partir de compuestos metílicos y del acetato. Compuestos metílicos como el metanol son catabolizados mediante la donación de los grupos metílicos a una proteína corrinoide para formar un complejo CH_3 -Corrinoide. Los corrinoideos son estructuras parentales como la vitamina B_{12} . El complejo Corrinoide- CH_3 dona el grupo metílico

a la CoM para formar el complejo CoM-CH_3 a partir del cual se obtiene el metano por reducción con los electrones obtenidos en la oxidación de otras moléculas de metanol a CO_2 . En el metabolismo energético, el acetato es activado a Acetil-CoA, el cual interactúa con el monóxido de carbono deshidrogenasa, para transferir el grupo metílico a la enzima corrinóide de la vía acetil-CoA. A partir de este punto, el grupo metilo es transferido a la tetrahidro-metano-pterina y a la coenzima M para formar el complejo CoM-CH_3 . Posteriormente, es reducido a metano con los electrones generados en la oxidación del CO a CO_2 por la acción de la CO deshidrogenasa (Figura 3.8).



Fuente: Madigan, Martinko y Parker, 1997.

Figura 3.7. Metanogénesis hidrogenofílica a partir de la reducción del CO_2 .



Fuente: Madigan, Martinko y Parker, 1997

Figura 3.8. Utilización de las reacciones de la vía acetil-CoA durante el crecimiento con acetato.

BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS (BSR)

Las bacterias sulfato reductoras son anaerobios estrictos, ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres donde se lleva a cabo los procesos de degradación de la materia orgánica. Utilizan el sulfato como aceptor de electrones durante la oxidación anaerobia de compuestos orgánicos, aunque pueden utilizar también, compuestos como el tiosulfato, el tetrionato y el azufre elemental. Los donadores de electrones más utilizados por las BSR son H₂, lactato, piruvato aunque existen otros tipos fisiológicos más restringidos.



El grupo de las BSR es diverso morfológicamente pero fisiológicamente unificado, taxonómicamente se reconocen 18 géneros capaces de llevar a cabo la sulfato reducción desasimilativa, los cuales se agrupan en dos subgrupos fisiológicos:

Grupo I: bacterias no oxidantes del acetato

Los miembros de este grupo utilizan el lactato, el piruvato, el etanol o ciertos ácidos grasos como fuente de carbono y energía, y reducen el sulfato a sulfuro de hidrógeno. Los géneros representativos son:

<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfobacula</i>
<i>Desulfomicrobium</i>	<i>Archaeoglobus</i>
<i>Desulfobotulus</i>	<i>Desulfobulbus</i>
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Thermodesulfobacterium</i>
<i>Desulfomonile</i>	

Grupo II: bacterias oxidantes del acetato

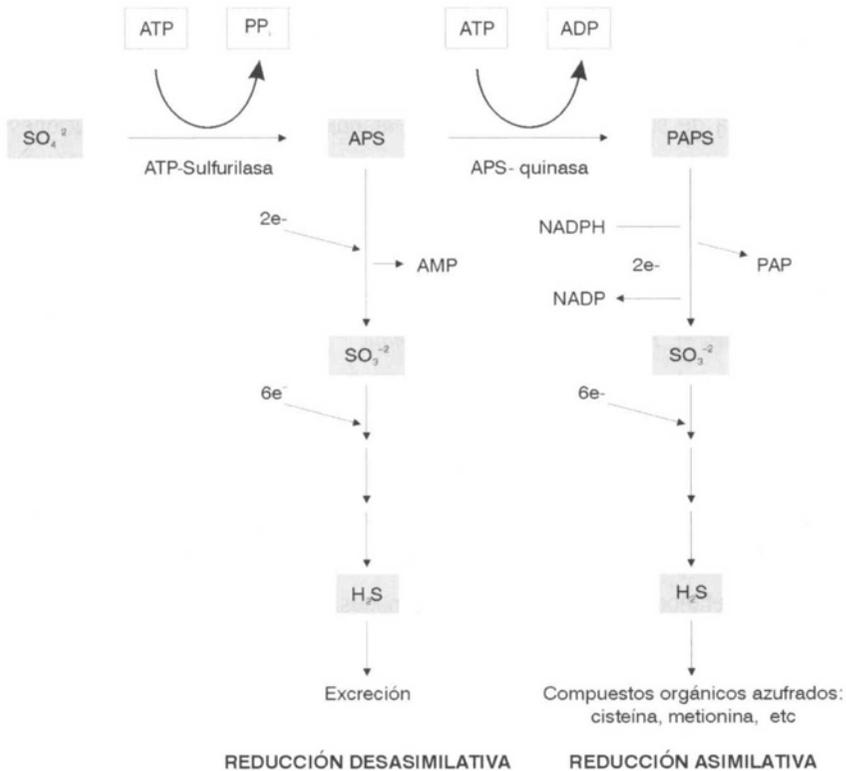
Las bacterias de este grupo se especializan en la oxidación de ácidos grasos particularmente el acetato y reducen el sulfato a sulfuro. Los géneros más representativos son:

<i>Desulfobacter</i>	<i>Desulfoarculus</i>
<i>Desulfobacterium</i>	<i>Desulfacinum</i>
<i>Desulfococcus</i>	<i>Desulforhabdus</i>
<i>Desulfonema</i>	<i>Thermodesulforhabdus</i>
<i>Desulfosarcina</i>	

Sulfato reducción

Para la reducción del sulfato a sulfuro de hidrógeno es necesario una reducción de ocho electrones, y se lleva a cabo a través de una serie de etapas. Como el ión sulfato es muy estable, para su utilización es necesario una activación previa mediante el ATP. La enzima ATP-sulfurilasa cataliza la unión del sulfato a uno de los fosfatos del ATP formando el adenosin-fosfo-sulfato (APS). En la sulfato reducción desasimilativa, el complejo APS se reduce directamente a sulfito SO_3^{-2} con la liberación de AMP. En la reducción asimilativa, un nuevo fosfato se une al APS para formar el fosfo-fadenosín-

fosfo-sulfato (PAPS) y solo entonces reduce el sulfato (Figura 3.9). En ambas reacciones, el primer producto de la sulfato reducción es el sulfito, a partir de este momento las subsecuentes reducciones ocurren rápidamente. En la sulfato reducción asimilativa el H_2S formado es convertido en azufre orgánico en la forma de aminoácidos, mientras en la sulfato reducción desasimilativa el H_2S es excretado.



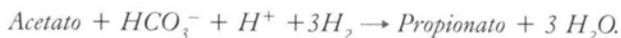
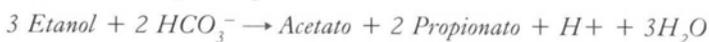
Fuente: Madigan, Martinko y Parker, 1997.

Figura 3.9. Sulfato Reducción Desasimilativa y Asimilativa de las Bacterias Sulfato Reductoras

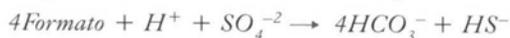
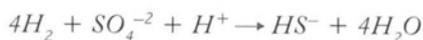
Interrelación de las BSR durante la degradación de la materia orgánica

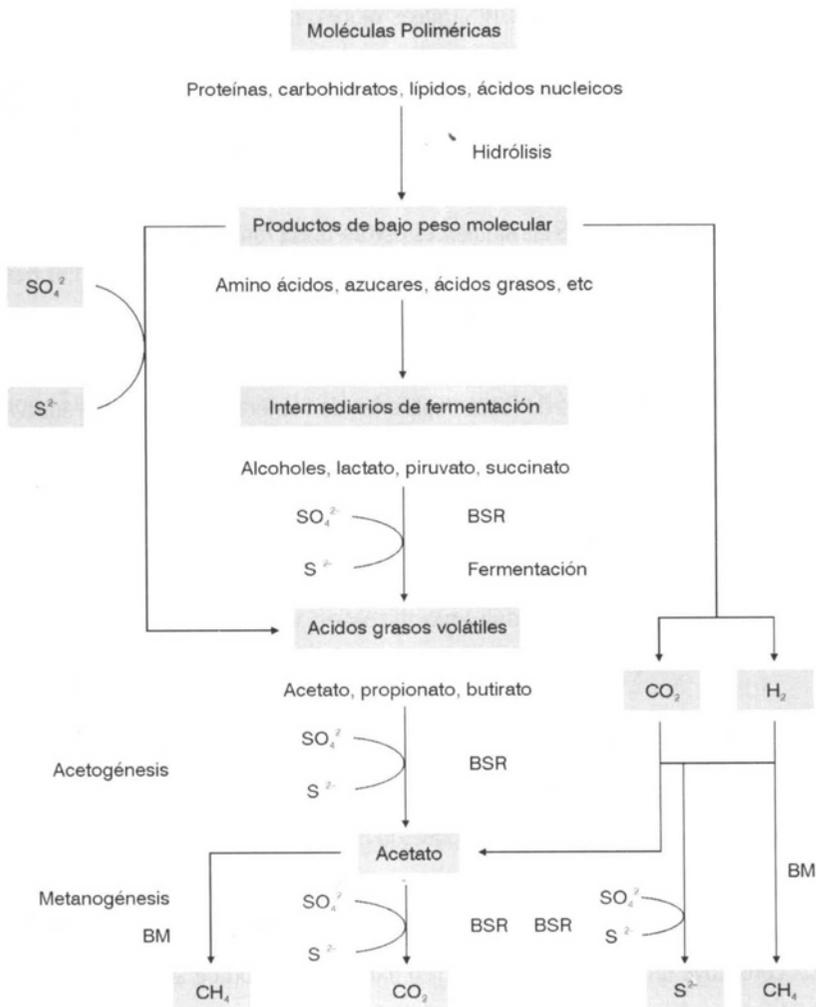
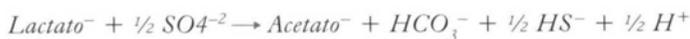
Una característica de los medios donde las BSR desarrollan una alta actividad metabólica, es la presencia de olores desagradables producidos por el H_2S , así

como un color negro en las aguas y los sedimentos, debido a la formación de sulfuros que precipitan al reaccionar con diferentes metales. Las BSR cumplen un importante papel en las etapas finales de la degradación de la materia orgánica, especialmente en la remoción de los sulfatos presentes en el afluente. Las bacterias BSR pueden crecer en presencia o ausencia de sulfatos, utilizando dos vías metabólicas diferentes; una fermentativa y la otra oxidativa. La Figura 3.10. presenta las interrelaciones de las BSR durante la utilización de la vía fermentativa en la cual, crecen sintróficamente con las bacterias metanogénicas, sin embargo, en la presencia de sustratos como lactato y etanol compiten con las poblaciones fermentativas por sustratos comunes (Gibson, 1990). Las siguientes reacciones ilustran la capacidad fermentativa de las BSR.



En presencia de sulfatos, las BSR son capaces de acoplar la oxidación de compuestos orgánicos e hidrógeno a la sulfato reducción, compitiendo con las bacterias metanogénicas por sustratos comunes, generando la inhibición de las bacterias acetoclásticas por la producción de H_2S . Los ácidos grasos como el propionato, y el butirato son oxidados completamente hasta CO_2 por las BSR, o parcialmente hasta acetato. Compuestos como el etanol, otros alcoholes, lactato, malato y compuestos aromáticos pueden ser degradados completa o parcialmente. Las siguientes reacciones ilustran la capacidad de las BSR de acoplar la oxidación de ciertos sustratos a la sulfato reducción (Oude Elferink *et al.* 1994; Gibson, 1990; Widdel and Hansen, 1992).





Fuente: Gibson, 1990

Figura 3.10. Interrelaciones entre las BSR durante la degradación de la materia orgánica.

De acuerdo con Oude Elferink *et al.* (1994), durante el tratamiento anaerobio de aguas residuales, la sulfato reducción puede interferir con la metanogénesis, generando en los reactores problemas como:

1. Competencia por sustratos comunes y la consecuente disminución en la producción de metano, entre BSR y bacterias metanogénicas.
2. Inhibición de varios grupos bacterianos por la presencia de H_2S .
3. Toxicidad generada por el H_2S , malos olores, corrosión en las calderas y los motores operados con biogas

La forma tóxica del H_2S es la forma no disociada lo que facilita su paso a través de la membrana celular. Pequeñas variaciones de pH en los digestores, pueden causar inhibición del proceso. Se ha recomendado para disminuir la toxicidad generada por el H_2S las siguientes estrategias (Tanaka y Lee, 1997; Hulshoff Pol, 1996):

- Diluir el afluente con aguas residuales que no contengan sulfato.
- Adicionar metales como el hierro para remover el H_2S por precipitación.
- Implementar sistemas de fases separadas de manera que la sulfato reducción se limite al reactor acidogénico.
- Incrementar el pH para obtener una forma menos tóxica del H_2S .
- Oxidar biológicamente el H_2S hasta sulfuro elemental.



A pesar de los problemas que ocasiona la sulfato reducción al interior de los reactores, esta reacción puede presentar algunas ventajas (Oude Elferink *et al.*, 1994; Dvorak *et al.*, 1992):

1. Contribuye a mantener un bajo potencial de óxido-reducción al interior de los reactores.
2. Constituye un método biotecnológico para la remoción de sulfato.
3. Los complejos Metal- S^{-2} tienen baja solubilidad, propiedad que puede ser utilizada para la precipitación de metales pesados como Co, Ni, Pb y Zn.

Interrelación entre las BSR - bacterias acetogénicas (BA) y las bacterias metanogénicas (BM)

EN PRESENCIA DE SULFATO

Las bacterias sulfato reductoras compiten con las bacterias metanogénicas (BM) por sustratos comunes como; formato e hidrógeno, con las bacterias acetogénicas (BA) por componentes como propionato y butirato (Lovley, *et al.* 1982). Esto no significa que la metanogénesis y la sulfato reducción sean excluyentes, pues pueden ocurrir simultáneamente cuando el metano se genera a partir del metanol y/o aminas metiladas, sustratos por los cuales las BSR tienen poca afinidad.

La relación DQO/sulfato en las aguas residuales es un indicador de la cantidad de materia orgánica que puede ser degradada vía sulfato reducción. En teoría todo el material orgánico puede ser degradado vía sulfato reducción, si la relación DQO/sulfato es menor de 0.66. Si por lo contrario, la relación DQO/sulfato es mayor de este valor, las BSR compiten con las bacterias metanogénicas y acetogénicas por los sustratos disponibles, además de otras sulfato reductoras por el sulfato disponible. Se ha estimado que la concentración de H_2S al interior del reactor, no debe exceder de 150mg/L, para que el proceso metanogénico sea eficiente (Harada *et al.*, 1994; Oude Elferink *et al.*, 1994).

En general, los reactores anaerobios operan a valores umbrales para el consumo de hidrógeno por la población metanogénica. Sin embargo, el valor umbral de las BSR es más bajo, por lo que en presencia de sulfato el hidrógeno es consumido principalmente por las BSR. Esta población tiene ventajas cinéticas frente a las BM que favorecen su proliferación al interior de los reactores (Lovley *et al.*, 1982).

Tabla 3.3. Parámetros cinéticos de crecimiento entre las bacterias metanogénicas y sulfato reductoras consumidoras de hidrógeno en presencia de sulfato.

Microorganismo	Ks (μM)	V _{max} (días ⁻¹)	Rendimiento (g/mol H ₂)	Km (μM)	V _{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> cepa G11	2.4–4.2	1.2–1.6	1.4–2.0	1.1	65
<i>Methanospirillum hungatei</i>	5.8–7.3	1.2–1.8	0.3–0.5	5.0	70

Tomado de Harada *et al.*, 1994

La población de bacterias metanogénicas acetoclásticas (BMA), predominan en reactores anaerobios cuando la concentración de sulfato es baja al interior del reactor debido a que las BSR acetoclásticas compiten con las otras BSR por el sulfato disponible y con las BM acetoclásticas por el acetato. Por otra parte, el acetato es el sustrato menos utilizado por las BSR comparado con el propionato, butirato y el hidrógeno. Sin embargo, factores como tiempos de retención celular cortos favorecen el crecimiento de la población BSR acetoclástica ya que la velocidad de crecimiento es mucho más alta. Para *Desulfotomaculum acetoxidans* se ha reportado μ_{max} entre 0.65 y 1.39 días⁻¹, mientras para *Methanosaeta soehngeni* las tasas de crecimiento oscilan entre 0.08 y 0.29 días⁻¹. Otros parámetros como afinidad por el sustrato, la capacidad de utilizar otros sustratos y la temperatura también influyen en la competencia entre BSRA y BMA en presencia de sulfato (Jetten *et al.*, 1992; Visser *et al.*, 1993).

En reactores anaerobios con alta concentración de sulfato, las bacterias sulfato reductoras también compiten con las bacterias acetogénicas (BA) por sustratos como propionato y butirato, por lo que la relación sintrófica entre las BM y BA para la oxidación de estos compuestos, son superadas por las BSR.

EN AUSENCIA DE SULFATO

En ausencia de sulfato, las BSR puede constituir el 15% del total de la biomasa presente en el reactor. Bajo estas condiciones fermentan sustratos como: piruvato, lactato, etanol, fructosa, propanol y acetato entre otros, y crecen como organismos acetogénicos. Se ha reportado la degradación del formiato mediante la relación sintrófica de *Desulfovibrio vulgaris* y *Methanobacterium bryantii*. Las BSR

mantienen una presión parcial de hidrógeno (1–2 Pa) por debajo de la requerida para que se de la transferencia interespecífica de electrones con la población metanogénica (3–10 Pa). Esta diferencia, podría estar mostrando que la velocidad de crecimiento de las BA dependerá del organismo consumidor de hidrógeno. Es por ello, que en algunos estudios se reportan tasas de crecimiento máximo para las BA consumidoras del propionato y butirato en co-cultivo con BM de 0.10 y 0.19 días⁻¹, mientras en co-cultivo con BSR es de 0.19 y 0.31 días⁻¹. Esto estaría sugiriendo que la utilización del propionato y butirato por las BSR, está más relacionada con la presión parcial de hidrógeno, que con la capacidad de esta población para utilizar estos sustratos. El crecimiento de BSR con butirato en ausencia de sulfato, no ha sido demostrado. Sin embargo *Desulfovibrio sp* ha sido aislado en reactores con altas concentraciones de butirato y en ausencia de sulfato (McInerney *et al.*, 1981; Bryant *et al.*, 1977; Stams, 1994).

BIBLIOGRAFÍA

- ATLAS, R. y Bartha, R. (1993). Microbial ecology: Fundamental and application. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park, California.
- BALCH, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.E. y Wolfe, R.S. (1977). "Acetobacterium a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing anaerobic bacteria". *Inst. Journal System Bacteriology*, 27: 355-386.
- BRYANT, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A. y Crabill, M.R. (1977). "Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria". *Applied Environmental Microbiology*, 33: 1162-1169.
- BRYANT, M.P. (1979). "Microbial methane production-theoretical aspects". *Journal Animal Science*, 48: 193-201.
- BOONE, D.R. y Bryant, M.P. (1980). "Propionate-degrading bacterium *Syntrophobacter wolini* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystem". *Applied Environmental Microbiology*, 40: 626-632.
- DVORAK, D.H., Hedin, R.S., Edenborn, H.M. y McIntire, P.E. (1992). "Treatment of metal contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors". *Biotechnology & Bioengineering*, 40: 609-616.
- GIBSON, G.R. (1990). "Physiological and ecology of the sulfate-reducing bacteria". A review. *Journal Applied Bacteriology*, 69: 769-797.
- GROTENHUIS, J.T.C., Smit, M., Plugge, M., Yuansheng, X., Van Lammeren, A.A.M., Stams, A.J.M. y Zehnder, A.J.B. (1991). "Bacteriological Composition and Structure of Granular Sludge Adapted to Different Substrates". *Applied Environmental Microbiology*. July 1991: 1942-1949.
- HARADA, H., Uemura, S. y Monomoi, K. (1994). "Interaction between sulfate reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate". *Water Research*, 28: 355-367.
- HULSHOFF-POL L. (1996). *Perspective for anaerobic treatment of sulfate rich wastewater*. Memorias IV Seminario Taller Latinoamericano sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales. Bucaramanga, Colombia: 383-396.

- JARREL, K.F. y Kalmokoff, M. (1987). "Nutritional requirements of the Methanogenic Archeobacteria". *Canada Journal Microbiology*, 34: 557-576.
- JETTEN M.S., Stams A.J. y Zehnder A.J. (1992) "Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanoxithrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp". *FEMS Microbiology*, 88: 181-198. En Stams, A.J. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 271-294.
- KASPAR H.F., Holland A.J. y Mountfort D.O (1987). "Simultaneous butyrate oxidation by *Syntrophomonas wolfei* and catalytic oleofin reduction in absence of interspecies hydrogen transfer". *Arch. Microbiology*, Volumen?. 1029-1039.
- LOVLEY, D.R., Dwyer, D.F. y Klug, M.J. (1982). "Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments". *Applied Environmental Microbiology*, 43: 1373-1379.
- MADIGAN, M.T., Mertinko, J.M. y Parker, J. (1997). *Biology of microorganisms*. Eighth Edition. Prentice Hall. New Jersey (USA).
- MCCARTY, L. (1982). "One hundred years of anaerobic treatment". En: Anaerobic Digestion (1982). Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion, Federal Republic of Germany on Sept. 6-11. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- McINERNEY, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B. y Costerton, J.W. (1981). "*Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium". *Applied Environmental Microbiology*, 41: 1029-1039.
- McINERNEY, M.J. (1988). "Anaerobic hydrolysis and fermentation of fat and protein". En: Zehnder A.J.B (Ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc., publication. New York, p. 373-415.
- MOUNTFORT, D.O., Brulla, W.J., Krumholz, L.R. y Bryant, M.P. (1984). "*Syntrophus buswellii* gen. nov. sp. nov., a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems". *Int. J. Sys. Bacteriology*, 34: 216-217.
- OUDE ELFERINK, S.J., Visser, A., Hulshoff-Pol, L. y Stams, A.J. (1994). "Sulfate reduction in methanogenic bioreactors". *FEMS Microbiology Review*, 15: 119-136.
- RAMÍREZ, L. (1996) "Evaluación de potenciales semillas para la inoculación de reactores anaerobios". En: IV Seminario Taller latinoamericano sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Bucaramanga (Colombia).

- ROY, F., Samain, E., Dubourguier, H.C. y Albagnac, G. (1986). "*Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobic oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids". *Arch. Microbiology*, 145: 142-147.
- SCHINK, B. (1997). "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation". *Microbiology Molecular Biology Review*, 61: 262-280.
- SCHINK, B. y Thauer, R.K. (1988). "Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation". En Stams, A.J. 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 271-294.
- STAMS, A.J. (1994). "Metabolic interaction in methanogenic bioreactors". *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 271-294.
- STIEB M. y Schink B. (1985). "Anaerobic oxidation of fatty acid by *Clostridium bryantii* sp. nov. a spore forming obligately syntrophic bacterium". *Archives Microbiology*, 140: 387-390.
- TANAKA, K. (1992). "Anaerobic oxidation of 1,5- pentanediol, 2- butanol and 2- propanol by a newly isolated sulfate- reducer". *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 72: 362-365.
- VISSER, A., Beekman, I., Van der Zee, A., Stams, A.J y Lettinga, G. (1993). "Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulfate concentrations". *Applied Microbiology & Biotechnology*, 40: 549-556.
- VOGELS, G.D., Keltjens, T.J. Hullen, J.T. y Van der Drift, C. (1982). "Coenzyme Methanogenic Bacteria". *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C.* 3: 258-264.
- WHITMAN, WB, Bowen, T.L., Boone, D.R. (1992). "The Methanogenic Bacteria". In: Prokaryotes 2nd edn. (Balows A, Truper, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H, Eds.) 719-767. Springer Verlag. New York.
- WOLIN, M. J (1976). Interactions between H₂- producing and methane- producing species. En: *Microbial Formation and utilization of gases (H₂, CH₄, CO)*. Schlegel, H.G., Gottschalk, G. y Pfenning, N. (Ed.) E. Goltze, K.G. Germany.
- ZINDER, S.H. y Koch, M. (1984). "Non-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic co culture". *Arch. Microbiology*, 138: 263-272.
- ZINDER, S.H. (1998). Chapter 5. Methanogens. En: Burlage, R.S. et al., *Techniques in Microbial Ecology*. Oxford University Press. New York. 113-135.
- ZHAO, H., Yang, D., Woese, C.R. y Bryant, M.P. (1990). "Assignment of *Clostridium bryantii* to *syntrophospora bryantii* gen. nov., comb. Nov. on the basis of 16S rRNA sequence analysis". *Int. Journal System bacteriology*, 43: 278-286.

capítulo

cuatro

PUESTA EN MARCHA Y

OPERACIÓN DE

REACTORES

ANAEROBIOS



REACTORES ANAEROBIOS: ¿CAJA NEGRA O ECOSISTEMA MICROBIANO?

LOS INGENIEROS GENERALMENTE UTILIZAN EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA PARTIENDO DE PRINCIPIOS BÁSICOS, CONTROLANDO Y OPERANDO EL PROCESO EN LA PRÁCTICA COMO UNA CAJA negra, en la cual se conocen las entradas: el caudal de agua residual y su carga orgánica, así como la existencia o no de sustancias tóxicas en concentraciones apreciables. El seguimiento de las salidas del sistema de tratamiento se desarrolla a través del monitoreo de la calidad del efluente líquido y de la cantidad y calidad del efluente gaseoso. No obstante, al no disponer de un conocimiento detallado de los procesos biológicos que ocurren dentro de los reactores, los ingenieros se guían fundamentalmente por el principio experimental de ensayo y error. En este campo existen numerosos trabajos que presentan metodologías para el arranque y operación de los sistemas anaerobios, las cuales se basan fundamentalmente en el seguimiento de los parámetros de operación y en el aumento paulatino de la carga, dependiendo de la "salud" del sistema.

De otro lado, microbiólogos y biólogos se centran en el estudio de las poblaciones microbiológicas existentes y en el tipo de relaciones que se establecen entre ellas, aislándolas y clasificándolas con procedimientos que suelen demorar días y aún meses. Se estudian así mismo, los fenómenos de competencia por el sustrato, los procesos bioquímicos y en general se realiza la evaluación cuidadosa de las principales relaciones y sucesos que ocurren dentro del proceso de la digestión anaerobia.

Ambos enfoques, el de la ingeniería de orden eminentemente pragmático y práctico, y el microbiológico poseedor de una mirada más científica y analítica, deben complementarse procurando un entendimiento integral del proceso. El trabajo mancomunado debería centrarse en la búsqueda de soluciones para los principales problemas de la tecnología anaerobia, como son: el control de olores, la optimización de la etapa de arranque, la identificación y manejo de sobrecargas, el arrastre de sólidos y la valorización de subproductos. Se pone entonces, al

orden del día, la conformación de grupos interdisciplinarios que estudien y experimenten con la tecnología anaerobia, avanzando de una manera más integral en el conocimiento teórico y práctico de la misma, y en su aplicación a nuestra realidad, mediante un enfoque interdisciplinario (Figura 4.1).

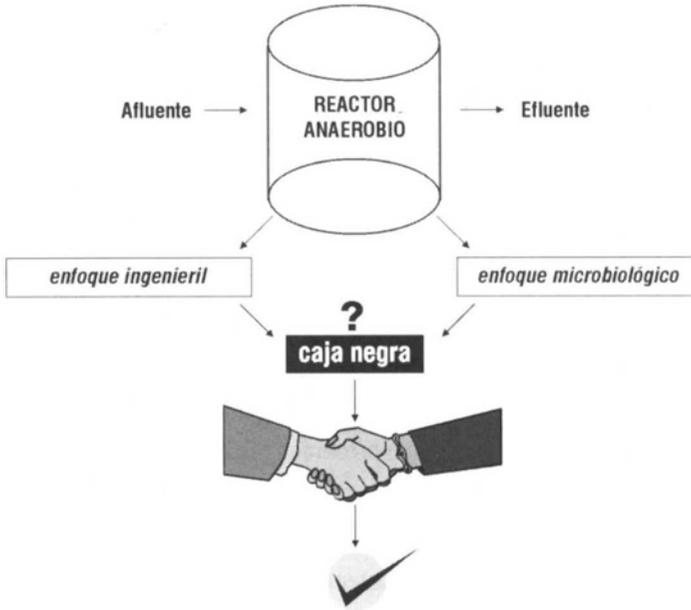


Figura 4.1. Integración de los enfoques ingenieril y microbiológico en los reactores anaerobios.

Reconociendo los vacíos que existen actualmente en Colombia respecto a las metodologías para el estudio de la digestión anaerobia, en este capítulo se considerarán los aspectos críticos en la implementación de esta tecnología, buscando una mayor integración entre los saberes microbiológico e ingenieril.

El uso de la tecnología implica dos etapas fundamentales: el arranque o puesta en marcha del sistema y la operación del mismo (Tabla 4.1). En ambas etapas la microbiología juega un papel fundamental, aportando elementos que permiten explicar las respuestas del sistema, evaluar la salud del reactor, planificar el esquema de trabajo y, en general, obtener información de los fenómenos microbiológicos que ocurren en el sistema.

Tabla 4.1. Caracterización del residuo y de los lodos anaerobios desde el diseño del reactor hasta la fase de estudios de mejoramiento de lodos

Fase	DISEÑO	ARRANQUE	OPERACIÓN	MEJORAMIENTO
Componente				
RESIDUO	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido de nutrientes • DQO • Biodegradabilidad • Toxicidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Remoción de DQO • AGV efluente • Alcalinidad y pH efluente • Producción de biogas 	<ul style="list-style-type: none"> • Remoción de DQO • AGV efluente • Alcalinidad y pH efluente • Producción de biogas 	
INÓCULO O LODO	<ul style="list-style-type: none"> • Origen del lodo • Actividad metanogénica • Sedimentabilidad • Relación SSV/SST • Composición bacterial (NMP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad metanogénica • Sedimentabilidad • Relación SSV/SST • Composición bacterial (NMP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad metanogénica • Sedimentabilidad • Relación SSV/SST • Composición bacterial (NMP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad metanogénica • Sedimentabilidad • Relación SSV/SST • Composición bacterial (NMP) • Aislamiento • Índice de diversidad de especies.

Lo anterior se logra estudiando y caracterizando el lodo en las diferentes etapas: antes del arranque como inóculo potencial, durante el proceso de arranque para evaluar la evolución del lodo y durante la etapa de operación para realizar el seguimiento de la calidad de éste. Es obvio que la información sobre las características microbiológicas del lodo es de gran ayuda para el ingeniero en la toma de decisiones frente a las dos variables de operación como la carga hidráulica y la carga orgánica.

ETAPA DE PUESTA EN MARCHA O ARRANQUE DEL REACTOR

Es el período de tiempo durante el cual la biomasa anaerobia se adapta a la cantidad y calidad de las aguas residuales que debe tratar; en dicho período generalmente el sistema de tratamiento se alimenta con caudales menores al de diseño y la eficiencia de remoción de materia orgánica aumenta lentamente hasta alcanzar los valores proyectados. Por lo tanto, es una etapa inestable y crítica cuya duración puede oscilar entre un mes y un año o más, dependiendo del inóculo, las características del agua residual y de la estrategia de arranque utilizada. La duración de la etapa de arranque está definida, según Van Haandel y Lettinga (1994), por el período de tiempo necesario para obtener una calidad constante del efluente y una masa de lodo que no varía cualitativamente con el tiempo.

La mayoría de los autores identifican el final del proceso de arranque en lo que respecta a la biomasa, con la aparición del fenómeno de granulación y/o la formación de una biopelícula o floc estable (Weimin *et al.*, 1986; Lane, 1986; Francese y Siñeriz, 1990, 1994; Campos y Anderson, 1991; Weiland y Rozzi, 1991).

Se han podido definir tres etapas en el proceso de arranque de las unidades anaerobias (Lettinga *et al.*, 1980):

- Adaptación primaria y crecimiento de bacterias degradadoras de los ácidos acético y propiónico.
- Formación de una biomasa anaerobia metanogénica activa.
- Formación de un lodo granular, si las condiciones del sustrato lo permiten.

Enfoques utilizados en la etapa de arranque

AUMENTO LENTO DE LA CARGA ORGÁNICA

El enfoque tradicional de arranque de los reactores anaerobios se fundamenta en una estrategia de aumento lento de la carga orgánica, siempre y cuando la 'salud' del reactor lo permita; se inicia el arranque con cargas orgánicas bajas, las cuales

se incrementan cuando se alcanzan eficiencias de remoción de la materia orgánica entre 60 y 80% y el reactor presenta estabilidad en dichas remociones. Este enfoque produce generalmente períodos de arranque largos, del orden de varios meses; con el fin de reducirlos, se han desarrollado otros enfoques los cuales se presentan a continuación.

ALTA PRESIÓN SELECTIVA

Se utiliza fundamentalmente para reactores de flujo ascendente y manto de lodos (UASB). La velocidad ascensional conseguida funciona como factor de selección del lodo: inicialmente se presenta el lavado del lodo floculento y disperso con bajas actividades metanogénicas y, por lo tanto, en virtud de este fenómeno de selección, suele aparecer el lodo granular (Hulshoff-Pol, 1989). La velocidad ascensional está controlada por dos parámetros de operación: la carga hidráulica, relacionada directamente con la velocidad ascensional del líquido, y la carga orgánica que regula la producción de biogas; al ascender, el gas aumenta la turbulencia y, por lo tanto, la presión selectiva sobre las partículas de lodo.

ADICIÓN DE ELEMENTOS Y SUSTANCIAS QUE AUMENTAN LA ADHESIÓN BACTERIAL

Esta estrategia consiste en agregar al reactor, a través del sustrato, elementos y sustancias que incrementen la adhesión bacterial. Se ha probado, entre otros compuestos, la adición de Ca^{++} y de polielectrolitos; se reportan valores de Ca^{++} de 100 mg/l^{-1} con un efecto positivo sobre la adherencia (Mahoney, 1987; Hulshoff-Pol, 1989).

Por su parte, el uso de polielectrolitos mejora las condiciones de formación de gránulos, incrementando su tamaño (Cail y Barford, 1985). Los polielectrolitos pueden ser útiles cuando el arranque se realiza con lodos pobremente aclimatados o para residuos concentrados que dificultan la utilización de cargas hidráulicas altas buscando la granulación; la adición de polímeros catiónicos en presencia de carbón activado, como soporte inicial del gránulo, se ha reportado como una combinación exitosa para conseguir la granulación (Wirtz y Dague, 1996). También se ha reportado la adición de sucrosa en proporción de 0.1% (masa/volumen) como estímulo para la formación de gránulos (Tay y Yan, 1996).

FENÓMENO DE GRANULACIÓN

El fenómeno de formación de biomasa con buenas características de sedimentación, preferiblemente bajo la forma de agregados en granos, se denomina 'granulación' y es resultado de varios procesos físicos, químicos y biológicos. El tiempo necesario para que el fenómeno de granulación tenga lugar dependerá, entre otras cosas, del tipo de agua residual, del lodo utilizado como semilla, la disponibilidad de nutrientes esenciales y las condiciones de operación del sistema.

El conocimiento de la composición microbiológica del lodo y el papel de las especies en la adhesión ha sido de gran utilidad para el cabal entendimiento de la manera como los consorcios microbiológicos trabajan, así como de los factores que contribuyen a la formación del gránulo (Wu *et al.*, 1992; Dolfing, 1985; Grotenhuis *et al.*, 1991).

El proceso de granulación se inicia cuando las bacterias se adhieren a los precipitados inorgánicos o a las matrices formadas por las bacterias filamentosas. En ambos casos los polímeros extracelulares excretados por los microorganismos contribuyen a dar firmeza a la adherencia. Los conglomerados que se forman son de tres tipos (Tay y Yan, 1996; Wentzel y Moosbrugger, 1995):

- Flocs: conglomerados con estructura suelta.
- Pellets: conglomerados con estructuras bien definidas que sedimentan rápidamente.
- Gránulos: son pellets con apariencia granular y alta sedimentación.

Los principales factores que influyen en la granulación del lodo son (Weigant *et al.*, 1986; Hulshoff-Pol, 1989): el tipo y concentración del lodo semilla; las concentraciones de cationes bivalentes; la producción de sustancias poliméricas extracelulares; el efecto hidráulico denominado 'presión selectiva'; la concentración del sustrato.

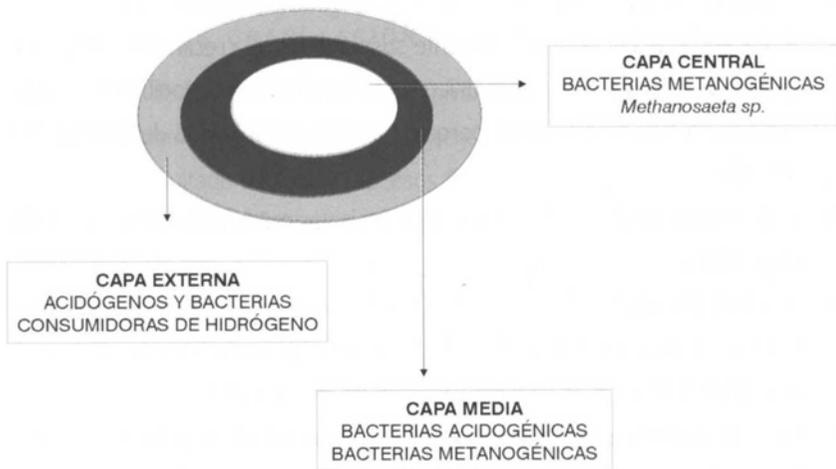
La formación de agregados celulares tiene las siguientes ventajas (Hulshoff-Pol *et al.*, 1986):

- a. Conduce al ordenamiento de poblaciones heterogéneas de microorganismos sintróficos en forma de asociaciones multicelulares, bajo condiciones fisiológicas favorables.

- b. Facilita las interacciones simbióticas entre organismos adyacentes.
- c. A diferencia de las células libremente suspendidas, el crecimiento dentro del gránulo incrementa el aprovechamiento de los nutrientes disponibles en el agua residual, lo cual se manifiesta porque aumenta la capacidad de degradación del lodo.
- d. La granulación protege a las células de organismos predadores como los ciliados anaerobios.
- e. Se minimiza la distancia de difusión para la fermentación de productos intermedios; esto es una forma eficiente de aprovechar cada fracción de energía disponible dentro de un sistema complejo de degradación.
- f. Bajo condiciones donde la composición del agua es adversa para el crecimiento celular, se crea un microambiente más favorable dentro del grano, de manera que el metabolismo bacteriano se pueda llevar a cabo.

Algunos autores (Dolfing *et al.*, 1985), con base en estudios de microscopía electrónica de transmisión, muestra que los organismos se encuentran distribuidos al azar dentro del grano y, por lo tanto, no es posible una organización interna que se pueda considerar repetitiva. En contraposición, otros autores que se han valido de la misma técnica de microscopía, proponen el 'modelo de multicapas', pues consideran a los gránulos como consorcios concéntricos que poseen una estructura bien definida (Guiot *et al.*, 1992; Fang, 1995) constituida por tres capas: la *capa interna* es el centro del gránulo y está conformada por bacilos metanogénicos que poseen flagelos (género *Methanosaeta*); la *capa media* la conforman bacterias del mismo género *Methanosaeta* y bacterias acetogénicas; la *capa externa* contiene una diversidad de microorganismos e incluye, tanto organismos acidogénicos, como sulfato-reductores y metanogénicos (Figura 4.2).

La predominancia de *Methanosaeta* en todas las muestras de lodos granulares sugiere que su presencia es esencial para la formación de gránulos. Por otra parte, otros autores indican que esta predominancia está asociada con gránulos de buena sedimentabilidad y tamaño mayor, si se les compara con gránulos donde predomina el género *Methanosarcina* (Tay y Yan, 1996).



Tomado de Fang, 1995.

Figura 4.2. Estructura y composición bacterial de los gránulos que tratan carbohidratos solubles.

ETAPA DE OPERACIÓN

La operación rutinaria del sistema se inicia una vez superada la etapa de arranque, cuando se alcanzan las condiciones de diseño de carga orgánica e hidráulica y la eficiencia de remoción de materia orgánica proyectada. En esta etapa se espera que el reactor funcione en condiciones de estado estacionario o estable, en el cual las variables de salida del sistema se mantienen relativamente constantes a pesar de las variaciones temporales en cantidad y calidad del afluente.

La carga hidráulica aplicada sobre un sistema de tratamiento de aguas residuales se define como la relación entre el caudal del afluente y el volumen útil del sistema; por lo tanto, la carga hidráulica es igual al inverso del tiempo de retención hidráulico.

El tiempo de retención hidráulico es el tiempo promedio de permanencia del líquido en el reactor, el cual se define mediante la siguiente relación:

$$Lh = Qa/Vr = 1/Trh \quad (1)$$

Donde,

Lh = Carga hidráulica

Qa = Caudal del afluente

Vr = Volumen útil del reactor

Trh = Tiempo de retención hidráulico.

Por carga orgánica volumétrica se entiende la relación entre la masa de material orgánico aplicada por unidad de tiempo y por unidad de volumen del reactor, y se define así:

$$Lo = (Qa * Ca)/Vr = Ca/Trh \quad (2)$$

Donde,

Lo = Carga orgánica

Ca = Concentración de DQO del afluente.

De otro lado, se define también la carga orgánica másica como la relación entre la masa de material orgánico aplicada por unidad de biomasa presente en el reactor y por unidad de tiempo:

$$Lm = (Qa * Ca)/Mvl \quad (3)$$

Donde,

Lm = Carga orgánica másica

Mvl = Biomasa presente en el reactor.

Factores que influyen el arranque y la operación de los reactores anaerobios

El arranque y operación de un reactor son procesos complejos que involucran simultáneamente los siguientes factores relacionados (Figura 4.3):

- Factores relacionados con el diseño y operación del reactor.
- Factores ambientales (temperatura, pH, nutrientes).
- Factores relacionados con la calidad y cantidad de la biomasa.
- Factores relacionados con las características del residuo.

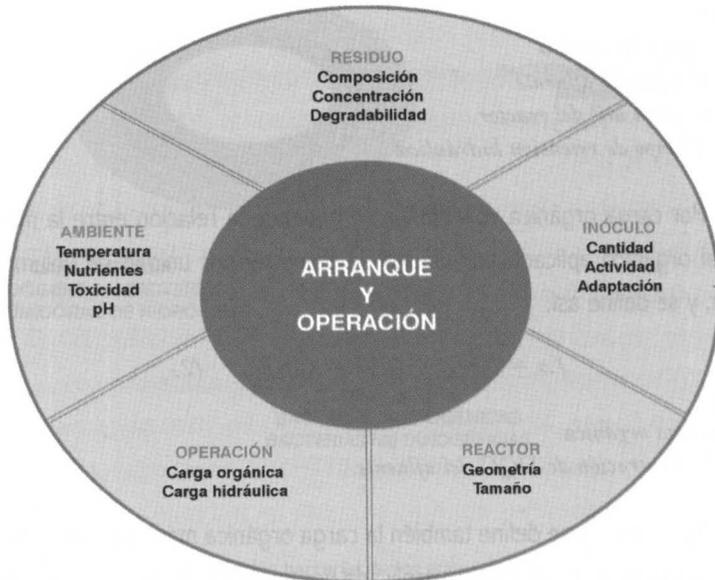


Figura 4.3. Factores que afectan el arranque y la operación de los reactores anaerobios.

FACTORES RELACIONADOS CON EL DISEÑO Y LA OPERACIÓN

El diseño y operación de un reactor anaerobio debe asegurar las siguientes condiciones (Monroy, 1997):

- Retención de lodos viables dentro del reactor. Mientras mayor sea la concentración de células activas retenidas (sedimentadas o adheridas), mayor será la carga orgánica que podrá tratar. La capacidad que puede tener un reactor para retener biomasa bajo diversas condiciones y el sistema de separación gas-sólido-líquido son los factores claves en el diseño y operación de reactores anaerobios.
- Contacto entre el lodo y el sustrato. El tiempo de retención hidráulica (TRH) debe ser suficiente para permitir un estrecho contacto entre los reactantes. Si se tiene en cuenta la baja velocidad de crecimiento de las bacterias metanogénicas, y además que el 90% de la energía que utiliza esta población es para la producción de metano y sólo el 10% para síntesis celular, el tiempo que se requiere para

formar una biomasa activa implica que el tiempo de residencia del lodo con el agua se debe incrementar. El contacto lodo-agua residual es efectivo solamente si el lodo está localizado en la parte principal del reactor.

Un problema común es que algunos lodos pueden flotar en la superficie del reactor; entonces, el lodo que flota no se pone en contacto con el agua residual y hay una alta posibilidad que el lodo que flota saldrá del reactor. Varias condiciones pueden asociarse con la flotación de la biomasa: presencia de biomasa ligeramente filamentososa (que puede entrapar el biogas); presencia de sustancias grasas en el lodo las cuales absorben el biogas; presencia de proteínas en el agua residual; contacto inadecuado entre la biomasa y el agua residual debido a deficiencias en el sistema de alimentación.

- Velocidades de reacción. Es decir que los productos puedan salir fácilmente del agregado, que los subproductos puedan transferirse inmediatamente entre las especies bacterianas y que los sustratos se encuentren a concentraciones adecuadas frente a dichas especies. La difusión del sustrato hacia el microambiente que rodea las bacterias está limitada por la velocidad de difusión del sustrato en el manto de lodo y en el lodo granular (Field, 1987) (Figura 4.4).

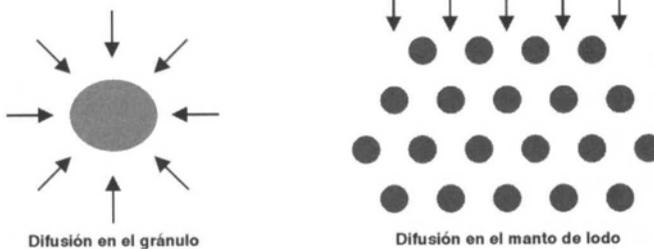


Figura 4.4. Difusión de las partículas de lodo.

- Transferencia de masa. El tamaño de las biopartículas o biopelículas debe permitir el fácil acceso de los organismos al sustrato.
- Tiempo de retención de sólidos. Un tiempo de retención de los sólidos alto en el reactor contribuirá a una mayor adaptación de los lodos al afluente, lo que favorece la estabilidad de la biomasa.

FACTORES AMBIENTALES

Entre los factores ambientales que afecta la operación de un biorreactor anaerobio se encuentran el tipo de sustrato, la temperatura de operación, los nutrientes disponibles, el pH, la relación alcalinidad/ácidos grasos volátiles (AGV) y la toxicidad anaerobia.

TIPO DE SUSTRATO. El tipo de sustrato determina la comunidad trófica que se desarrolla. En ecosistemas complejos como el de un digestor anaerobio, el tamaño de cada grupo de organismos deberá ser proporcional al flujo de su correspondiente sustrato en el sistema y la prevalencia de una u otra ruta metabólica está determinada por el acoplamiento entre la velocidad de producción y la capacidad de asimilación del mismo. Si las diferencias entre el contenido de DQO y DBO_5 son grandes, indica que existe una alta proporción de componentes no biodegradables. Cuando la DQO_{BD} está compuesta por sustratos fácilmente biodegradables, tales como azúcar o aminoácidos, la etapa limitante en la digestión anaerobia es la metanogénesis, porque las bacterias fermentativas tienen la capacidad de acidificar el sustrato a una velocidad ocho veces más rápida comparada con la velocidad con que las bacterias metanogénicas consumen los ácidos grasos volátiles (AGV) productos de la fermentación; como resultado, la capacidad de utilización de DQO_{BD} total de la población metanogénica en el reactor determina la máxima carga de DQO_{BD} que puede aplicarse. Si la velocidad de carga excede la capacidad metanogénica se producirá una acumulación de AGV en el reactor y el pH disminuirá (Zegers, 1987).

Cuando ocurren sobrecargas en el reactor puede darse lugar a dos situaciones:

- Las bacterias acetogénicas crecen rápidamente y producen grandes cantidades de ácido acético. Esto ocasiona una baja del pH y la liberación de hidrógeno; sin embargo el aumento en la concentración de hidrógeno en el reactor estimula una disminución en la producción de ácido acético, lo cual permite que el reactor se recupere y que el metabolismo se desplace hacia la formación de ácido butírico, lo que reduce la carga sobre el sistema.
- Cuando la sobrecarga es muy alta, la concentración de hidrógeno induce la formación de grandes cantidades de ácido propiónico y, paralelamente, el me-

tabolismo y crecimiento de las bacterias acetogénicas cesa por el hidrógeno acumulado en el sistema. Esta situación se conoce como 'sobrecarga por ácido propiónico' y constituye un grave problema ya que su recuperación es incierta y muy lenta (Zegers, 1987).

Por otra parte es importante conocer la composición promedio del agua residual con respecto a:

- La presencia de compuestos tóxicos.
- La cantidad de nutrientes.
- La disponibilidad de trazas de elementos como Fe, Co y Ni.

TEMPERATURA. La mayoría de los digestores anaerobios operan entre 30-35°C, por que la formación de metano a 20°C es baja. En reactores operados a 35°C se ha observado un descenso del 50% en la actividad y crecimiento de las bacterias cuando la temperatura disminuye en 10°C. Por el contrario, el aumento en la temperatura permite incrementar la producción de metano. Comparativamente, los reactores que son operados en el intervalo termofílico (55-60°C) muestran el doble de la producción de metano que a 35°C, lo cual disminuye el tiempo de residencia y volumen del reactor, en contraprestación de la energía que se requiere para mantener el reactor a esta temperatura (Varel *et al.*, 1977).

NUTRIENTES. Los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias al interior del reactor dependen de la concentración de DQO_{BD} del agua residual. Aunque los requerimientos nutricionales de las bacterias durante el proceso de degradación anaerobia son bajos, y la mayoría de las aguas residuales no presentan tal deficiencia, los efluentes producidos en la fabricación de papel, almidón y alcohol pueden ser deficientes en los micronutrientes esenciales. La adición de nitrógeno y fósforo incrementa la eficiencia del proceso. Sin embargo, es necesario controlar la concentración de amonio en el afluente del reactor, pues aunque éste es utilizable por las bacterias para su crecimiento, su exceso puede causar toxicidad e inhibición de la población metanogénica (Field, 1987; Zegers, 1987).

PH. El reactor debe operar en un intervalo de pH entre 6.8 y 7.5, porque la actividad de la población metanogénica es altamente vulnerable a los cambios de pH comparada con las demás poblaciones presentes en el lodo. Los AGV son tóxicos para la metanogénesis, solamente en la forma no ionizada. A pH neutro,

los ácidos orgánicos están mayoritariamente (>99%) en la forma ionizada (no tóxica). No obstante, cuando el pH disminuye, los AGV están menos disociados (tóxicos), incluso a pH 5.0, los AGV están disociados en un 50% aproximadamente (Zegers, 1987).

RELACIÓN ALCALINIDAD/ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES. La relación AGV/alcalinidad es un parámetro de utilidad para controlar la acumulación de AGV en los reactores anaerobios: un valor de 0.2 indica una excelente capacidad buffer del sistema, con un máximo valor de 0.4; sin embargo, en los reactores UASB, un valor de 0.35 indica acidificación. Así, esta relación es utilizada como un indicador temprano de acidificación, comparado con los datos de pH y alcalinidad que se alteran en estados avanzados y de difícil recuperación (Rojas, 1987).

TOXICIDAD ANAEROBIA. El consorcio de microorganismos involucrados en el proceso de digestión anaerobia de la materia orgánica, como cualquier organismo vivo, no está exento de ser inhibido por alguno de los compuestos presentes en el agua residual. Sin embargo, dado el hecho de que las bacterias metanógenas tienen tiempos de generación muy prolongados, la consecuencia de la introducción de sustancias tóxicas es mayor en un sistema anaerobio que en uno aerobio. Es por esta razón que se debe conceder una especial atención a la operación de este tipo de reactores para evitar que las sustancias tóxicas entren a los sistemas anaerobios, por lo menos en concentraciones inhibitorias. Para tal fin es necesario conocer y entender a fondo el fenómeno de toxicidad.

El término toxicidad se refiere normalmente a la perturbación originada por una sustancia sobre un proceso metabólico o sobre la viabilidad del organismo en cuestión. En la práctica, durante el tratamiento anaerobio del agua residual, la toxicidad se observa como una reducción en la producción de metano a consecuencia de un compuesto o una mezcla de compuestos. Cabe considerar que la inhibición causada por determinadas sustancias puede ocurrir en cualquiera de las poblaciones del consorcio bacteriano, lo que implicaría un desbalance poblacional y, por consiguiente, una síntesis disminuida del producto final: el metano. Esto implica que el efecto de un compuesto tóxico es muy complejo y no puede asumirse solamente como la inhibición de las bacterias metanogénicas, pues ellas dependen del metabolismo de las demás bacterias allí presentes; por

otra parte, la magnitud de la toxicidad es función de varios factores entre los que se encuentran la concentración, la formación de complejos y la aclimatación, entre otros.

De acuerdo con Lettinga (1999), se pueden distinguir tres tipos de toxicidad:

- a. *Toxicidad metabólica*: Se refiere a la inhibición competitiva de un proceso metabólico; al retirar la sustancia tóxica, la toxicidad es completamente reversible.
- b. *Toxicidad fisiológica*: Es la inhibición que resulta del daño sobre componentes subcelulares; al retirar el compuesto tóxico ocurre la recuperación, aunque de manera tardía. Esta demora se debe al tiempo requerido para reparar los daños ocurridos.
- c. *Toxicidad bactericida*: Se aplica a sustancias tóxicas que causan la muerte celular; luego de su remoción, la producción de metano puede que se reanude luego de mucho tiempo, pues se requiere que surja una nueva generación a partir de las células viables, lo cual se ve muy limitado por los largos tiempos de generación de las bacterias involucradas.

Existe una gran variedad de compuestos reportados como tóxicos; Lettinga (1999) propone la siguiente clasificación en cinco clases principales:

1. *Inhibidores tóxicos*. Dentro de este grupo se encuentran aquellos compuestos que son causa frecuente de toxicidad en la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Tal es el caso de los ácidos grasos volátiles, sustratos típicos de las aguas residuales, o del amonio y el sulfuro de hidrógeno, productos finales de la digestión anaerobia que resultan de la degradación de proteínas y de la reducción del sulfato. Estos compuestos tienen en común que su toxicidad es dependiente del pH; esto se debe a que las especies no ionizadas de dichos compuestos, al tener un carácter apolar, son absorbidas por la membrana celular y alteran las funciones celulares, siendo entonces las responsables de la toxicidad. En la medida en que esta disociación está en función del pH, es posible controlar hasta cierto punto el efecto de estos compuestos; así, a pH menores de 6, la fracción de ácido acético no ionizado es muy significativa, mientras que a pH 8 es sólo una traza. Por lo tanto, durante la operación del reactor es necesario mantener el pH en un intervalo ligeramente alcalino (7,5 - 8) de manera que no se exceda la capacidad de carga orgánica particular del reactor.

En el caso del sulfuro, su toxicidad se debe a la forma no ionizada del sulfuro de hidrógeno; como esta especie se incrementa a pH ácido, se estima que una concentración de 250 mg/L causa la inhibición del 50% de la actividad metanogénica. Para estimar la concentración de esta especie en el reactor se debe tener en cuenta: la cantidad de sulfuro que se llega a producir por reducción del sulfato, la producción de biogas, pues junto con el metano también se escapa una fracción de H_2S , y finalmente, la ionización del sulfuro. Por su parte, el amonio es una fuente importante de toxicidad en aguas residuales ricas en nitrógeno orgánico; el amoniaco, la base no ionizada del amonio, es considerado como el responsable de la toxicidad, pues su concentración aumenta a pH alcalino mientras en condiciones neutras disminuye significativamente.

2. *Sales*. El agua residual de algunas industrias suele contener altas concentraciones de sal. Los problemas más comunes de toxicidad se relacionan con Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} .
3. *Compuestos naturales*. En este grupo se encuentran aquellas sustancias naturales que tienen efectos inhibitorios sobre las células bacterianas. Este tipo de compuestos es común encontrarlos en los efluentes de plantas de procesamiento de alimentos.
4. *Contaminantes industriales*. Dentro de esta clase se agrupan los compuestos xenobióticos que tienen generalmente un origen industrial, en algunas ocasiones con una contraparte natural, pero cuya concentración en el ambiente es muy baja. Usualmente son muy tóxicos y ejercen fuertes efectos inhibitorios a muy bajas concentraciones; entre éstos se incluyen sustancias como solventes, pesticidas, surfactantes, colorantes, organohalogenados y metales pesados, entre otros.

Los metales pesados pueden estar presentes en concentraciones considerables en las aguas residuales que provienen de industrias, fuentes domésticas y comerciales (Hickey *et al.*, 1989; Bhattacharya *et al.*, 1995). Una concentración alta de estos metales en los lodos puede conducir a la perturbación del proceso de estabilización del lodo y, por lo tanto, puede llegar a limitar sus opciones de disposición. La digestión anaerobia es, por lo general, el primer proceso que sufre un deterioro en su funcionamiento debido a estos compues-

tos. Swandick (1969), citado por Battacharya, afirma que la inhibición por metales pesados es la segunda causa, después del diseño y operación inadecuada, relacionada con el bajo rendimiento de la digestión anaerobia y las consecuentes fallas del proceso. Una de las principales características que distingue a los metales pesados de otros compuestos tóxicos es que no son biodegradables y, por lo tanto, se acumulan en el lodo hasta alcanzar concentraciones tóxicas (Bhattacharya *et al.*, 1995). La especiación y partición de los metales es el factor que más influye en su potencial de toxicidad. Las investigaciones de Gould y Genetelli (1978), citados por Hickey *et al.* (1989), muestran que los organismos vivos son más sensibles a los metales iónicos libres en solución que aquellas especies del metal unido a complejos o precipitados.

La toxicidad relacionada con los metales pesados ocurre debido a la alteración de la estructura y las funciones de las enzimas, pues éstos se unen con determinados grupos de la proteína o reemplazan los metales que ocupan normalmente el grupo prostético Hickey *et al.* (1989). En consecuencia, cualquiera de las poblaciones del consorcio bacteriano son sensibles a estos elementos; se ha reportado que los metales más tóxicos para las bacterias metanogénicas son el cromo, el cadmio, el plomo, el zinc, el cobre y el níquel.

Los compuestos aromáticos están presentes en el ambiente en forma de derivados de la lignina, los taninos, los aminoácidos fenólicos y otros componentes aromáticos de las plantas. Así mismo, muchas actividades humanas contribuyen a la presencia en el medio de estos compuestos; dentro de las principales fuentes de contaminación se encuentra la incineración de desechos, la minería y la descarga a los cuerpos de agua de los desechos provenientes de las industrias petroquímica, farmacéutica y productora de papel. Algunos de estos compuestos son xenobióticos y tienden a bioacumularse resultando tóxicos para los microorganismos (Reyes *et al.*, 1991). Según Reyes y Lettinga, los bencenos monosustituidos que presentan mayor toxicidad para las bacterias metanogénicas acetoclásticas son el clorobenceno, el metoxibenceno y el benzaldehído; concluyen también que la toxicidad de los compuestos aromáticos se incrementa al aumentar la longitud de las cadenas alifáticas sustituyentes, al igual que el número de grupos alquil y cloro. Así mismo, estos autores repor-

tan que existe una correlación positiva entre la hidrofobicidad del compuesto y la inhibición de la actividad metanogénica.

5. Otras sustancias: Se han realizado otra serie de investigaciones en donde se busca analizar el efecto de determinados compuestos que suelen entrar en contacto con las bacterias encargadas de la degradación anaerobia, dependiendo de los procesos que se lleven a cabo en cada industria en particular. Es así como se encontró que las resinas ácidas, presentes en el agua residual de las industrias productoras de papel, resultan tóxicas para las bacterias anaerobias (McCarthy *et al.*, 1990). Otro ejemplo corresponde al caso del formaldehído, un compuesto ampliamente usado en las industrias química, textil y maderera, para el cual los investigadores encontraron que causa una fuerte inhibición de la biomasa responsable de la digestión (Lu *et al.*, 1998). Los compuestos citados se incluyen dentro de las sustancias xenobióticas causantes de toxicidad en los sistemas anaerobios, junto con el formaldehído, algunos antibióticos, hidrocarburos clorados y algunos aromáticos. El efecto de estos detergentes o surfactantes sobre los sistemas de tratamiento de aguas se ha venido apreciando en varios casos; Austermann *et al.* (1998), reportan que durante la recuperación de la planta de tratamiento de aguas de una cervecería alemana se hizo necesario sustituir algunos de los desinfectantes y de los lubricantes de cadenas utilizados, así como la reducción en el uso de agentes desinfectantes como el ácido etilendiamino triacético (EDTA), con el fin de mejorar el nivel de tratamiento. García *et al.* (2000) estudiaron el efecto de varios surfactantes catiónicos comerciales (sales de amonio cuaternario) sobre la degradación anaerobia y encontraron que uno de los tres compuestos evaluados (compuestos con dos grupos metilo sustituidos y unidos directamente al átomo de nitrógeno) resultaba tóxico para las bacterias en concentraciones superiores a 64 mg/g de lodo; los demás surfactantes, en los cuales los grupos hidrofóbicos estaban unidos al nitrógeno por enlaces éster, eran tomados como nutrientes por parte de las bacterias. Wagener *et al.* (1987) reportan porcentajes de inhibición del 80% de la actividad metanogénica con surfactantes aniónicos del tipo alquil-benceno-sulfonatos, y del 20% para surfactantes no iónicos como los alquil-fenol-etoxilatos.

Factores relativos a la calidad del lodo

TIPO DE INÓCULO

El tiempo para el arranque del reactor será corto si el lodo utilizado como inóculo tiene una alta actividad metanogénica y está adaptado a los sustratos presentes en el agua residual. En países donde la tecnología anaerobia es ampliamente utilizada (Europa, USA, China), la consecución de lodos como inóculos para las plantas de tratamiento normalmente se realiza a partir de otros reactores o éstos son suministrados por compañías privadas; sin embargo, en los países de América Latina que han venido utilizando esta tecnología, la consecución de lodos como inóculos no es una labor fácil, ya que no existen suficientes reactores anaerobios que suministren inóculos de calidad.

Frente a esta dificultad se viene trabajando en el acondicionamiento de inóculos a partir de fuentes diferentes a los reactores anaerobios; por ejemplo, se han explorado inóculos provenientes de lodos activados, lagunas de estabilización, tanques de sedimentación y tanques sépticos, requiriéndose por lo tanto, la adaptación de dichos inóculos al sustrato que se va a utilizar.

En este proceso de búsqueda de inóculos alternativos, la caracterización microbiológica de los lodos se ha constituido en una herramienta fundamental de trabajo, toda vez que permite identificar y seleccionar potenciales inóculos para reactores anaerobios. En la Tabla 4.2 se reportan las posibles fuentes de inóculos de los reactores, así como los valores de actividad metanogénica y el contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) (Guyot, 1993; Ramírez, 1996).

En general, se recomienda una concentración mínima de $10\text{KgSSV}/\text{m}^3$ y un volumen no mayor del 60% del volumen total del reactor. Por otra parte, es importante evitar el arrastre de las bacterias durante la fase de arranque y controlar parámetros como la carga orgánica volumétrica, el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la concentración de AGV en el efluente del reactor (Hulshoff-Pol, 1987).

Tabla 4.2. Diferentes fuentes de inóculos para reactores anaerobios

Tipo de inóculo	Actividad metanogénica específica gCH ₄ -DQO/g SSV.d	Concentración típica de SSV en el lodo g/l
Lodo granular	0.5 - 1.5	70 - 120
Biopelícula	0.4 - 1.2	ND
Lodos domésticos digeridos	0.02 - 0.2	15 - 40
Estiércol digerido	0.02 - 0.08	20 - 80
Lodo de fosa séptica	0.01 - 0.07	10 - 50
Laguna anaerobia	0.03	30
Estiércol fresco	0.001 - 0.002	30 - 140
Sedimento laguna	0.002 - 0.005	20 - 50

Fuente: Field, 1987

Los procesos anaerobios de segunda y tercera generación requieren de biomasa con alta actividad metanogénica y que se mantenga en el reactor, ya sea por adherencia a un soporte como en el caso de los filtros anaerobios o los reactores de lecho fluidizado, o por formación de gránulos como ocurre en los reactores UASB de alta tasa. En la Tabla 4.3 se consigna un resumen de las principales características de los lodos granulares presentes en reactores UASB de alta carga.

Tabla 4.3. Propiedades del lodo granular

Característica	Intervalo
Densidad (kg/m ³)	1028 a 1082
Relación SSV/SST	0.45 a 0.90
Velocidad media sedimentación (m/h)	53 a 100
Diámetro medio de gránulos (mm)	0.8 a 2.2
Actividad metanogénica (gDQO-CH ₄ /gSSV/d)	0.2 a 1.9

Fuente: Hulshoff- Pol, 1989.

BIBLIOGRAFÍA

- AUSTERMANN, U.; Lange, R. y Seyfried, C. (1998). "Upgrading an Anaerobic/Aerobic Wastewater Treatment Plant". *Water Science Technology*, 37: 243-250.
- BHATTACHARYA, S.; Madura, R. y Uberoi, V. (1995). "Toxic Effects of Cadmium on Methanogenic Systems". *Water Research*, 29: 2239-2345.
- CAIL, R.G y Barford, J.P. (1985). "The development of granulation in an upflow floc digester and an upflow anaerobic blanket digester treating cane juice stillage". *Biotechnology Letters*, 7: 493-498.
- CAMPOS, C.M y Anderson, G.K. (1991). "The effect of the liquid upflow velocity and the substrate concentration on the start-up and the steady state periods of lab-scale UASB reactors". In: 6° International Symposium on Anaerobic Digestion. Sao Paulo, Brasil.
- DOLFING, J. (1985). "Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge". Canada. *Journal of Microbiology*, 31: 744-750.
- DOLFING J. y Bloemen, W. (1985). "Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments". *Journal of Microbial Methods*, 4: 1 - 12
- FANG, H., Chui, H.K. y Li, Y. (1995). "Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewater". *Water Science Technology* 30(12): 86-96.
- FIELD, J. (1987) "Medición de parámetros". En: Curso de arranque y operación de reactores anaerobios con flujo ascendente y manto de lodos (UASB). Universidad del Valle, Cali. (Colombia).
- FRANCESE, A. y Siñeriz, F. (1990). "Puesta en marcha de reactores anaerobicos tipo UASB". Memorias del XXII Congreso de AIDIS, San Juan de Puerto Rico.
- FRANCESE, A. y Siñeriz, F. (1994). "Puesta en marcha de reactores UASB". Memorias del III Taller y Seminario Latinoamericano 'Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales'. Montevideo, (Uruguay).
- GARCÍA, M., Campos, E., Sanchez, J. y Ribosa I. (2000). "Anaerobic Degradation and toxicity of Comercial Cationic Surfactants in Anaerobic Screening Tests". *Chemosphere*. 41: 705-710.

- GROTEHUIS J.T., Smith, M. y Plugge, C.M. (1991). "Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates". *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7): 1942-1949.
- GUIOT, R.S., Pauus A. y Costerton J.W. (1992). "A structural model of the anaerobic granule consortium". *Water Science Technology*, 25(7): 1-10.
- GUYOT, J.P. (1993). "Anaerobic microbial counts of different potential anaerobic inocule". *Applied Microbiology*, 40: 139-142.
- HICKEY, R., Vanderwielen, J. y Switzenbaum, M. (1989). "The effect of Heavy Metals on Methane Production and Hydrogen and Carbon Monoxide Levels During Batch Anaerobic Sludge Digestion". *Water Research*, 23:207-218.
- HULSHOFF-POL, L., Worp, L.W. y Lettinga, G. (1986). "Physical characterization of anaerobic granular sludge". Procc. NVA/ EWPCA, Water Treat. Conf. Anaerobic Treatment: A grow-up technology, Amsterdam, (The Netherlands). Sept. 1986: 89-101.
- HULSHOFF-POL, L. (1987). "Arranque y operación de reactores UASB. Arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo UASB. Manual del curso. Universidad del Valle. Corporación Autónoma Regional del Cauca y Universidad Agrícola de Wageningen. Santiago de Cali (Colombia). Noviembre. E-1 - E-11.
- HULSHOFF-POL, L. (1989). "The phenomenon of granulation of anaerobic sludge". Tesis doctoral. Universidad Agrícola de Wageningen, (Holanda).
- LANE, A.G. (1986) "Star-up, operating requeriments and granule formation during upflow sludge bed treatment of a strong food processing effluent". *Environmental Technology Letters*, Vol. 7.
- LETTINGA G. (1980) "Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment". *Biotechnology & Bioengineering*, 22: 699-734.
- LETTINGA G., Hulshoff-Pol L. y Zeeman G. (1999). Lecture notes: "Biological wastewater treatment. Part One: Anaerobic Wastewater Treatment". Wageningen University (The Netherlands), December, 1999.
- LU, Z. y Hegemann, W. (1998). "Anaerobic Toxicity and Biodegradation of Formaldehyde in Batch Cultures". *Water Research*, 32: 209-215.
- MAHONEY, E.M. (1987). "The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor star-up". *Water Science Technology*, 19: 249-260.
- MCCARTHY, P., Kennedy, K. y Droste, R. (1990). "Role of Resin Acids in the Anaerobic Toxicity of Chemithermomechanical Pulp Wastewater". *Water Research*. 24, 1401-1405.

- MOLINA, F. (1997). "Influencia de la carga hidráulica y la concentración del sustrato en el arranque de reactores UASB". Tesis de Maestría. Universidad del Valle, (Colombia)
- MONROY, O. (1997). "Sistema de Reactores Anaerobios". Memorias. VIII Curso Avanzado sobre Procesos Biotecnológicos "Biotecnología Ambiental". Junio 30-Julio 11. Cuernavaca, (México).
- RAMIREZ, L., Molina F., Rojas O. y Alazard D. (1996). "Evaluación de potenciales semillas para la inoculación de reactores anaerobios". En: IV Seminario Taller Latinoamericano sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Bucaramanga, (Colombia).
- REYES, S. y Lettinga, G. (1991). "The Effect of Aromatic Structure on the Inhibition of Acetoclastic Methanogenesis in Granular Sludge". *Applied Microbiology & Biotechnology*, 34: 544-550.
- ROJAS, O. (1987). "Relación Alcalinidad – Ácidos grasos volátiles. Arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo". UASB. Manual de curso. Universidad del Valle. Corporación Autónoma Regional del Cauca y Universidad Agrícola de Wageningen. Santiago de Cali (Colombia). Noviembre. D-1-D-31.
- TAY, J. y Yan, Y. (1996). "Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactors". *Water Environment Research*, 68(7): 1140-1150.
- VAN HAANDEL, A. y Lettinga, G. (1994). Tratamiento anaerobio de esgotos em regioes de clima quente. Editora EPGRAF. Campina Grande, Brasil
- VAREL V.H., Isassson, Bryant, M.P. (1977). "Thermophilic methane production from cattle waste". *Applied Environmental Microbiology*, 33: 298-307.
- WAGENER, S. y Schink, B. (1987). "Anaerobic degradation of nonionic and anionic surfactans in enrichment cultures and fixed-bed reactors". *Water Research*, 21:615-622.
- WEIGANT, M. y De Man, A.W (1986). "Granulation of biomass in thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors treating acidified wastewater". *Biotechnology & Bioengineering*, 28: 718-727.
- WEILAND, P. y Rozzi, A. (1991). "The start-up operation and monitoring of high-rate anaerobic treatment systems. Discussers reports". *Water Science Technology*, 24 (8): 257-277.
- WENTZEL, M.C y Moosbrugger, R.E. (1995). "Tentative guidelines for waste selection, process desing, operation and control of upflow anaerobic sludge bed reactors". *Water Science Technology*, 30(12): 31-42.
- WEIMIN, W., Jiwi, H. y Xiasheng, G. (1986). "Effect of granulation of sludges in the upflow reactor in solid-liquid separation". *Uanjing Kexue Xuebae*, 6 (1): 86-95.

- WIRTZ, R. y Dague, R. (1996). "Enhancement of granulation and star-up in the anaerobic sequencing batch reactor". *Water Environment Research*, 68(5): 883-892.
- WU, W.M., Jain, M.K., Macario, E.C., Thiele, J.H y Zeikus, G. (1992). "Microbial composition and characterisation of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules". *Applied Microbiology & Biotechnology*. 38: 282-290.
- ZEGERS, F. (1987). Microbiología, arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo. UASB. Manual de curso. Universidad del Valle. Corporación Autónoma Regional del Cauca y Universidad Agrícola de Wageningen. Santiago de Cali. Colombia. Noviembre. A-1-A-14.
- ZEHNDER, A. (1988). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons. Inc.