

capítulo

cinco

CARACTERIZACIÓN DE
LADOS ANAEROBIOS Y
AGUAS RESIDUALES

5

EL ÉXITO O FRACASO DE UN SISTEMA ANAEROBIO DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DEPENDE FUNDAMENTALMENTE DE LA CALIDAD DE LA BIOMASA CONTENIDA EN EL REACTOR; POR LO TANTO, LA CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA PERMITE ENTENDER EL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA, PROYECTAR SU DESEMPEÑO FUTURO Y DEFINIR LA POTENCIALIDAD DE LA BIOMASA COMO FUENTE DE INÓCULO PARA OTROS REACTORES.

LODOS ANAEROBIOS

Caracterización Fisicoquímica

MUESTREO

La toma de una muestra de lodo en reactores de lecho suspendido, por ejemplo reactores UASB, se realiza extrayendo la cantidad de lodo necesaria mediante las válvulas de drenaje del sistema. En los reactores de lecho fijo, por ejemplo los filtros anaerobios, la toma de la muestra se lleva a cabo extrayendo una cantidad suficiente del medio de soporte y raspando posteriormente la biomasa adherida.

La muestra de lodo se toma en recipientes limpios; dependiendo del objetivo del estudio, se pueden tomar muestras puntuales de una o varias capas de lodos o del medio de soporte. La otra alternativa consiste en tomar muestras compuestas a partir de muestras individuales tomadas a diferentes alturas o alícuotas del manto de lodo o del medio de soporte. Es importante tener en cuenta, que para obtener una muestra representativa, debe descartarse el lodo almacenado en la válvula, para lo cual se descarta el volumen inicial colectado. Generalmente se toma de uno a dos litros de muestra y se recomienda llenar el recipiente hasta el borde superior para minimizar la exposición al oxígeno (Wills *et al.*, 2000).

Al tomar la muestra, se debe registrar información básica como el tipo de reactor evaluado, los parámetros de operación y las características del afluente y

el efluente del reactor. La muestra se debe transportar refrigerada, y una vez ingresa al laboratorio, se recomienda gasear la muestra con N_2 por 10 a 15 minutos y luego refrigerar a $4^\circ C$ hasta el momento de ser procesada.

SÓLIDOS

FUNDAMENTO TEÓRICO. El material suspendido o disuelto presente en el agua residual se denomina 'sólidos', y en él se pueden distinguir tres categorías: sólidos totales, sólidos suspendidos totales y sólidos disueltos totales. En cada una de estas tres categorías también se hace diferencia entre los sólidos fijos y los sólidos volátiles: los primeros son los sólidos que permanecen después de incinerar la muestra, mientras que los segundos son los sólidos oxidados o volatilizados al incinerar la muestra.

Cuando los lodos anaerobios presentan características sólidas o semi-sólidas, la masa de los sólidos disueltos es despreciable comparada con la fracción de sólidos suspendidos, por lo cual no es necesario filtrar los lodos, evitando así las dificultades inherentes a filtrar al vacío una cantidad apreciable de lodo.

En caso de que el contenido líquido del lodo sea importante, debe realizarse el filtrado de los lodos para separar la fracción suspendida de la disuelta; para este caso se utilizó el método consignado en los métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (APHA, 1998).

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Cápsulas de porcelana
- Balanza analítica
- Probeta
- Baño María
- Estufa
- Mufla
- Pipetas
- Pinzas para mufla

PROCEDIMIENTO. Se recomienda trabajar por triplicado, así:

- Colocar 30 mililitros de lodo en una cápsula de porcelana previamente incinerada y pesada, (P_1).

- Evaporar al baño María la humedad del lodo.
- Secar en estufa a una temperatura entre 103°C y 105°C durante 24 horas.
- Transferir las cápsulas al desecador hasta que se enfríen y pesarlas, (P_2).
- Incinerar la muestra en la mufia a 550°C \pm 50°C durante una hora.
- Transferir las cápsulas a la estufa durante 15 minutos.
- Posteriormente, colocar las cápsulas en el desecador y permitir que se enfríen.
- Pesar las cápsulas, (P_3).

CÁLCULOS.

- Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV):

$$SST \text{ (mg/l)} = (P_2 - P_1) * 1.000 / (30 / 1.000)$$

- Sólidos Suspendidos Totales (SST):

$$SSV \text{ (mg/l)} = (P_2 - P_3) * 1.000 / (30 / 1.000)$$

ÍNDICE VOLUMÉTRICO DE LODOS Y VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN

FUNDAMENTO TEÓRICO. Los sistemas de tratamiento de aguas residuales por procesos biológicos anaerobios se basan en la retención de grandes cantidades de lodo en el sistema; con ello se logra que el tiempo de retención de lodos sea mucho mayor que el tiempo de retención hidráulico; por lo tanto la velocidad de sedimentación (VS) es una variable importante para mantener la biomasa dentro del sistema. La velocidad de sedimentación indica la rapidez con la que sedimenta el lodo y se expresa en m/h.

El Índice Volumétrico de Lodos (IVL) es una prueba que evalúa la capacidad de sedimentación y compactación de un lodo; se define como el volumen que ocupa un gramo de lodo, después de sedimentar durante 30 minutos, sus unidades son ml/g.

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Probeta de vidrio de 1.000 ml
- Cronómetro
- Regla
- 200 ml de lodo sedimentado

PROCEDIMIENTO.

- Colocar los 200 ml de lodo sedimentado en la probeta y aforar a 1.000 ml con efluente clarificado del propio reactor anaerobio o con agua destilada.
- Tapar la probeta con parafilm, homogenizar el lodo y el agua invirtiendo la probeta tres veces.
- Colocar la probeta en una superficie plana y registrar el volumen de lodo sedimentado por unidad de tiempo; generalmente se registra el volumen sedimentado cada 30 segundos para los primeros 5 minutos y, posteriormente, cada 3 minutos hasta completar 30 minutos.

CÁLCULOS.

- Se convierte el volumen sedimentado a altura equivalente utilizando la siguiente ecuación $h_i = (1.000 - V_i) * L / 1.000$, donde h_i es la altura (cm) del borde superior de la probeta al volumen de lodo sedimentado para un tiempo t_i , V_i es el volumen sedimentado (ml) en un tiempo T_i y L es la altura (cm) de la probeta entre 0 y 1.000 ml.
- Se construye una gráfica de T_i (abcisas) contra h_i (ordenadas), uniendo los puntos manualmente, luego se traza una tangente a la zona de la curva con mayor pendiente. La pendiente de esta recta corresponde a la velocidad máxima de sedimentación (cm/min); utilizando el factor de conversión se calcula la velocidad de sedimentación en m/h.
- El IVL se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$IVL = V_{30\text{ minutos}} / (SST * F)$$

donde $V_{30\text{ minutos}}$ es el volumen en ml, ocupado por el lodo a los 30 minutos de iniciado el ensayo, los SST son los sólidos suspendidos totales del lodo en g/L y F es el factor de dilución, que para este caso es $200/1.000=0.20$.

PERFIL DE LODOS

FUNDAMENTO TEÓRICO. La concentración del lodo dentro del manto de lodo no es uniforme, pues generalmente la concentración disminuye desde el fondo a la superficie del reactor. La evaluación de esta variación se realiza determinando la concentración del lodo a diferentes alturas, procedimiento denominado 'perfil de

lodos', el cual permite estimar la cantidad de lodo existente en el reactor. Conociendo la biomasa presente y la actividad metanogénica del lodo, se puede predecir la máxima carga orgánica que puede soportar el sistema.

El contenido y la actividad del lodo varían con el tiempo; se estima que el reactor alcanza la estabilidad, la actividad metanogénica del lodo permanece constante y la cantidad del lodo aumenta a una tasa constante.

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Recipientes para toma de muestras.
- Materiales y equipos necesarios para determinar sólidos.

PROCEDIMIENTO.

- Tomar aproximadamente 100 ml de lodo en cada punto de muestreo.
- Determinar los SST y SSV en cada muestra de acuerdo con el método determinación de sólidos.

CÁLCULOS.

- Convertir la altura de toma de muestra a volumen de reactor utilizando la geometría y dimensiones del reactor
- Construir sendas gráficas de las concentraciones de SST o SSV (abscisas) contra el volumen correspondiente de reactor (ordenadas): el área bajo las curvas resultantes son las masas de SST y SSV contenidas en el reactor. El contenido total de SST y SSV se calcula descomponiendo el área bajo la curva en figuras geométricas, calculando el área para cada una de estas figuras y realizando la suma de las áreas individuales.

GRANULOMETRÍA

FUNDAMENTO TEÓRICO. El tratamiento anaerobio de residuos líquidos en reactores de lecho suspendido, tiene como fundamento el lograr la formación de gránulos que tengan velocidad de sedimentación alta y actividad metanogénica notable. Los gránulos evolucionan con el tiempo y dependen de la operación del reactor y del estado en que se encuentre el mismo, es decir en la fase de arranque o en la estable. La determinación del tamaño de los gránulos permite establecer sus cambios durante un proceso de granulación y además, permite identificar la homogeneidad o heterogeneidad de los gránulos del lodo con respecto a su tamaño.

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Agar bacteriológico o gelatina sin sabor.
- Cajas de Petri.
- Microscopio óptico con ocular de Whipple.

PROCEDIMIENTO.

- Preparar agar bacteriológico como lo recomienda la casa comercial; no se requiere su esterilización. Como alternativa se puede utilizar gelatina sin sabor.
- En 5 cajas de Petri, colocar 1ml de lodo en el centro.
- Enseguida verter el agar aún tibio, procurando formar una película lo más delgada posible.
- Distribuir la muestra en el agar de manera uniforme, con movimientos circulares de la caja de Petri hacia la derecha y los mismos hacia la izquierda, formando ochos.
- Esperar a que se solidifique el agar.
- Observar en el microscopio óptico empleando un ocular de Whipple previamente calibrado, determinando el tamaño de cada cuadrado del micrómetro ocular.

Para su lectura se debe tener en cuenta:

- Presencia de gránulos bien definidos y compactos.
- El valor del diámetro promedio se debe realizar sobre una muestra al azar de mínimo 100 gránulos.
- Para granos no esféricos se debe medir el diámetro mayor.

CÁLCULOS. Con los datos obtenidos de las mediciones de los gránulos se determina la valor promedio de los gránulos.

ACTIVIDAD METANOGÉNICA ESPECÍFICA

Para evaluar la actividad metenogénica específica (AME) del lodo, se determina la capacidad del consorcio microbiano para generar metano, lo cual se mide bajo condiciones controladas de temperatura. Se puede utilizar diferentes sustratos en forma individual o mezclados, lo cual permitirá establecer la presencia y la actividad de los diferentes grupos metanogénicos.

FUNDAMENTO TEÓRICO. La actividad metanogénica es una característica que indica la capacidad de la biomasa para transformar la materia orgánica en metano; se

define como la masa de sustrato en forma de DQO que es convertida a metano por unidad de masa de biomasa y por unidad de tiempo, lo cual se expresa con las siguientes unidades: $\text{gDQO-CH}_4/\text{gSSV día}$.

La actividad metanogénica se mide bajo condiciones de saturación de sustrato; por lo tanto, la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) deberá ser suficiente para que su difusión en el lecho del lodo no constituya una limitante. Así por ejemplo, en ensayos estáticos con frecuencia el lodo sedimenta y forma una capa que limita la difusión del sustrato. También se debe adicionar macro y micronutrientes, una solución buffer para mantener el pH cercano a 7, mientras su incubación puede hacerse con o sin agitación, a una temperatura entre 30°C y 35°C . En estas condiciones ambientales los microorganismos presentes en el lodo podrán llevar a cabo la transformación del sustrato. Como resultado, podrá calcularse la tasa máxima de producción de metano para el lodo bajo estudio (Field, 1987). En reactores a escala real, o en la naturaleza, la tasa de conversión de sustrato a metano es menor debido a que existen limitaciones en la cantidad de sustrato, en la cantidad de nutrientes y en las condiciones ambientales.

Para determinar la cantidad de lodo y de sustrato que se deben adicionar en la prueba, se han hecho algunas recomendaciones (Field, 1987) las cuales se consignan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Relaciones SSV/AGV

Sistema	Lodo SSV (g/L)	AGV* (g/L) DQO
Agitado	2.0 a 5.0	2.0 a 4.0
No agitado	1.0 a 1.5	3.5 a 4.5

*Los AGV del sustrato deben ser neutralizados a pH 7 usando NaOH; de lo contrario, la baja de pH y la alta fracción de AGV no ionizados causarán inhibición severa de la metanogénesis.

Los sustratos más utilizados para este ensayo son una mezcla de $\text{H}_2\text{-CO}_2$ (80%–20%), ácidos grasos neutralizados solos o en mezclas, específicamente los ácidos fórmico, acético, propiónico y butírico; también se utilizan alcoholes, metanol, etanol y carbohidratos (glucosa).

La actividad metanogénica del lodo puede verse afectada por el tiempo que el lodo requiere para adaptarse al sustrato, este período se denomina 'fase

de adaptación' o 'fase lag'. Por esta razón, previamente a su determinación, se hace una primera alimentación con el sustrato, de forma que la actividad se mide durante la segunda alimentación.

METODOLOGÍAS. Existen diferentes metodologías para realizar el ensayo de actividad metanogénica, las cuales se diferencian en la forma como se mide la cantidad de CH_4 producido y en la manera como se realiza la adición del sustrato.

Las metodologías básicas de medición de la producción de metano son las siguientes:

- Medición de CH_4 por desplazamiento de líquido, para lo cual se utilizan recipientes de 0.5 litros o mayores y un sistema de desplazamiento de líquido (Figura 5.1). El biogas producido se burbujea en una solución alcalina (generalmente de NaOH o KOH) con pH mayor que 12 en la cual el CO_2 es adsorbido y el volumen de gas metano desplazará un volumen igual de la solución alcalina; esta metodología exige un montaje y seguimiento muy cuidadoso. El volumen de líquido desplazado fuera de la botella de solución será equivalente al volumen de biogas generado por el sistema.

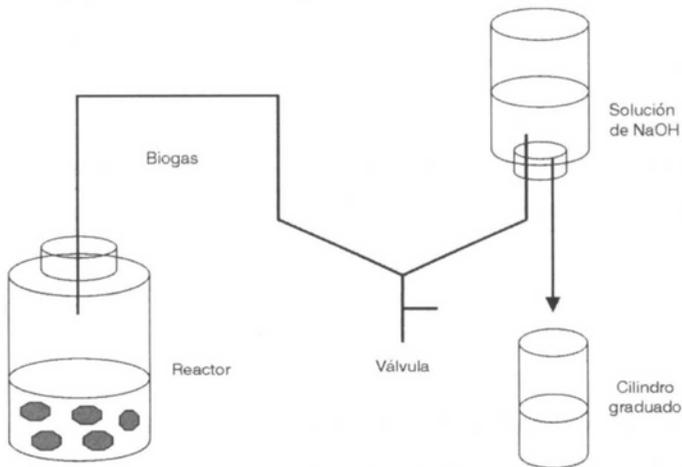


Figura 5.1. Medición de la actividad metanogénica por desplazamiento.

- Medición del volumen de metano mediante la determinación de la concentración de CH_4 por cromatografía de gases en un sistema cerrado (Figura 5.2), mediante el

uso de botellas serológicas de 60 o 120 ml, en las cuales la fase gaseosa corresponde a 2/3 del volumen de la botella donde podrá acumularse el metano producido. Tanto en la preparación del medio de cultivo, como en la inoculación se debe seguir los procedimientos recomendados para el manejo de microorganismos anaerobios (evitar contaminación con oxígeno y mantener condiciones reductoras). Aunque en este método la manipulación de las botellas es mucho más simple, los requerimientos de equipos de cromatografía de gases limitan su uso.

Para la adición del sustrato se pueden utilizar dos métodos:

- Realizar dos alimentaciones, iniciando la segunda alimentación cuando se ha logrado la conversión a metano de por lo menos el 80% del sustrato adicionado en la primera alimentación.
- Realizar una activación inicial del lodo mediante la adición de 0.1-0.3 ml de sustrato; al cabo de 12 horas se retira de la botella de ensayo todo el metano producido durante este lapso de tiempo. En ese momento, se adiciona una cantidad de sustrato tal, que se cumpla la relación SSV/AGV seleccionada y se inicia la medición de metano a diferentes intervalos de tiempo hasta el momento en que se alcanza la máxima producción (generalmente, 72 horas).

MEDICIÓN DE METANO POR DESPLAZAMIENTO DE LÍQUIDO

Ver Figura 5.1.

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Botellas de suero de 500 ml.
- Sistema de mangueras y agujas para comunicar la botella utilizada como reactor con la botella utilizada para medir la producción de metano por desplazamiento de líquido.
- Cuarto caliente o baño María.
- Solución de NaOH con fenofaleina como indicador de pH.
- Medio de cultivo (ver Anexo 1).
- Solución de nutrientes (ver Anexo 1).

PROCEDIMIENTO.

- Adicionar 250 ml de agua destilada hervida así como los volúmenes de AGV y de lodo. El volumen dependerá de si el sistema es estático o agitado.

- Cuando se sospecha una limitación de nutrientes y elementos traza se adiciona la solución de nutrientes en una relación de 1ml /L. El extracto de levadura se adicionan en una concentración de 0.2g/L.
- La temperatura de incubación es de 30°C a 35°C de acuerdo con las condiciones que se fijen para el ensayo.
- En otra botella de suero se colocan 500ml de la solución de NaOH, se sella con tapón de caucho el cual se perfora con dos agujas de jeringa. La botella con NaOH se coloca boca abajo, y se conecta a la botella con el lodo (Figura 5.1). La "T" de la manguera de conexión funciona como trampa para NaOH, e impide la entrada de NaOH a la botella de lodo. La segunda aguja en el frasco con NaOH permite la salida del líquido y medir el volumen de gas producido, el cual es equivalente al volumen de NaOH desplazado y recogido en el cilindro graduado.
- Determinar la producción diaria de metano a intervalos regulares de tiempo para determinar el periodo de tiempo en el cual se obtiene la mayor producción de metano. Es importante agitar la botella que contiene el lodo antes de realizar la lectura para liberar el gas del lodo y conseguir mayor contacto entre el sustrato y el lodo.
- Cada muestra se realiza por duplicado. Para cada serie de ensayos se incluye un blanco que contiene agua destilada y un control al que no se le agrega sustrato, a fin de corregir la producción endógena de gas, así como el volumen desplazado por cambios de temperatura y presión atmosférica.

Medición de metano por cromatografía

Ver Figura 5.2.

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Botellas serológicas de 60 ml, con tapón de caucho y sello de aluminio
- Cilindro de CH₄ puro para elaborar curva de calibración
- Cromatógrafo de gases configurado para cuantificación de concentraciones de CH₄.
- Cuarto caliente o baño María.
- Medio de cultivo, ver Anexo 1.

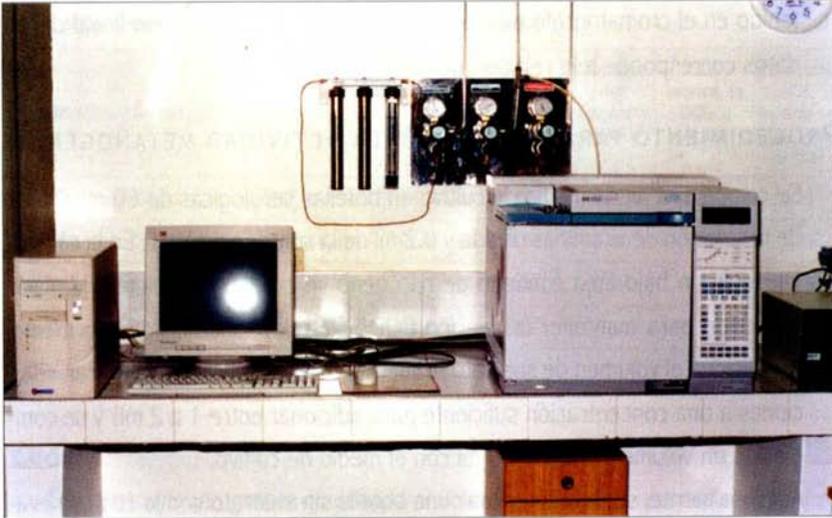


Figura 5.2. Cromatógrafo de gases para medición de metano.

PROCEDIMIENTO.

- Por cromatografía de gases no sólo se puede determinar la producción de metano sino las de alcoholes y ácidos grasos volátiles.
- Previa a la determinación de la actividad metanogénica es necesario contar con una curva de calibración para cuantificar el volumen de metano producido por cada muestra.

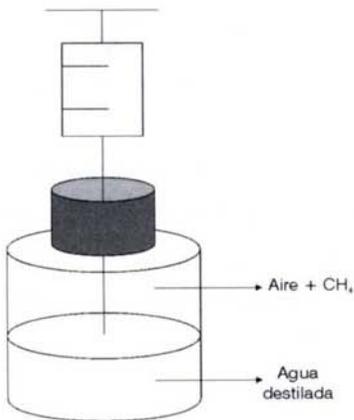


Figura 5.3. Preparación de la curva de calibración

CURVA DE CALIBRACIÓN.

- La curva de calibración se construye realizando mediciones en 6 botellas serológicas de 60 ml, a las cuales se les agrega 20 ml de agua destilada. Las botellas se tapan y se sellan con sello de aluminio. Utilizando jeringa se inyectan los siguientes volúmenes de metano puro: 0.5, 1, 5, 10, 20 y 30 mililitros (Figura 5.3).
- La curva de calibración se construye graficando el volumen de metano inyectado versus el área del cromatograma ob-

tenido en el cromatógrafo de gases. La ecuación de la regresión lineal de los datos corresponde a la relación de calibración.

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD METANOGENICA

- Se colocan 13 ml de medio de cultivo en botellas serológicas de 60 ml, 0.2 ml de la solución de vitaminas diluida y 0.2 ml de la solución de Na_2S . En la cámara anaerobia o bajo flujo continuo de nitrógeno se adiciona el volumen de lodo requerido para mantener la relación DQO/SSV seleccionada. Posteriormente, se adiciona el volumen de sustrato requerido (generalmente se preparan soluciones a una concentración suficiente para adicionar entre 1 a 2 ml) y se completa a un volumen total de 20 ml con el medio de cultivo.
- Adicionalmente, se debe preparar una botella sin sustrato con la cual, se evaluará la producción de metano residual del lodo. Se recomienda hacer el ensayo por triplicado para cada sustrato. La adición de las soluciones estériles (vitamina y agente reductor) se lleva a cabo con jeringa estéril, purgadas con N_2 (filtro estéril de algodón en rama para el flujo de N_2), y se debe flamear el tapón al realizar este procedimiento. La inoculación del lodo se puede realizar con pipeta o con jeringa sin aguja, el lodo a utilizar debe en lo posible estar estabilizado para eliminar la interferencia por producción de metano por sustrato residual presente en el lodo.
- Para la preparación de la solución de sustrato se pueden utilizar los datos para ácidos grasos volátiles que se presentan en la Tabla 5.2. La cantidad de sustrato y de lodo a agregar se calculan utilizando las relaciones consignadas en la misma Tabla 5.1.
- Para la incubación se colocan las botellas en posición invertida, lo cual contribuye a crear un sello hidráulico. Las lecturas se realizarán a diferentes intervalos de tiempo hasta cuando la producción de metano sea constante a través del tiempo o hasta que el 80% del sustrato haya sido utilizado. Cuando se realiza una segunda alimentación, se adiciona la misma concentración de AGV que la utilizada en la primera alimentación, el control de la producción de metano se lleva a cabo hasta que el 80% del sustrato haya sido consumido (Field, 1987).

Tabla 5.2. Datos básicos de los ácidos grasos volátiles (AGV)

Ácido	Fórmula		Peso molecular		Densidad del líquido(*) (g/ml)	DQO teórica (g DQO/g ácido)	Producción CH ₄ teórica (mol CH ₄ /mol ácido)
	Ácido	Sal	Ácido	Sal			
Fórmico	CH ₂ O ₂	CHO ₂ Na	46.0	68.01	1.22	0.348	0.25
Acético	C ₂ H ₄ O ₂	C ₂ H ₃ O ₂ Na.3H ₂ O	61.07	136.08	1.05	1.067	1.00
Propiónico	C ₃ H ₆ O ₂	C ₃ H ₅ O ₂ Na	74.08	96.06	0.99	1.514	1.75
Butírico	C ₄ H ₈ O ₂	C ₄ H ₇ O ₂ Na	88.11	110.1	0.96	1.818	2.50

(*) Depende de la calidad del reactivo.

CÁLCULOS.

Se construye una gráfica colocando el volumen acumulado de metano en el eje Y, y el tiempo acumulado en horas en el eje X. Se selecciona la región de mayor pendiente de la curva, y se calcula el valor numérico de dicha pendiente, la cual estará expresada en mililitros de CH₄/hora. El período de tiempo utilizado para determinar la tasa de producción de metano, debe cubrir por lo menos el requerido para la utilización del 50% de los AGV. La actividad metanogénica específica (AME) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$AME = (P*24) / (FC*V*SSV)$$

Donde,

P = Pendiente de la gráfica en ml/hora.

FC = Factor de conversión de DQO a CH₄, en ml CH₄/g DQO (este valor depende de la temperatura y la presión. En la Tabla 5.3 se consigna este factor para diferentes temperaturas).

V = Volumen de lodo utilizado en el ensayo en litros.

SSV = Concentración de SSV en el lodo.

Tabla 5.3. Factores de conversión de gramos de DQO a mililitros de CH₄ bajo diferentes temperaturas y a una presión de 1 atmósfera*

Temperatura (°C)	ml CH ₄ seco / g de DQO	ml CH ₄ húmedo/ g de DQO
10	363	367
15	369	376
20	376	385
25	382	394
30	388	405
35	395	418
40	401	433
45	408	450
50	414	471

* Si la determinación de la actividad metanogénica se realiza en mayores altitudes sobre el nivel del mar, se puede corregir el factor de conversión reportado para la presión atmosférica, así:

Factor de conversión $\times 760 /$ presión atmosférica del lugar (mm de mercurio).

Caracterización microbiológica

RELACIONES DE LOS MICROORGANISMOS CON EL OXÍGENO

En la naturaleza no existe una línea rígida de demarcación entre los organismos aerobios y anaerobios, por lo que los microorganismos pueden ser divididos en varios grupos de acuerdo con su relación con este parámetro; la Figura 5.4 ilustra dicha situación. Tomado como criterio la relación de las bacterias con el oxígeno, éstas se pueden clasificar como aerobios obligados, anaerobios obligados, anaerobio aerotolerante, anaerobio facultativo y microaerófilo.

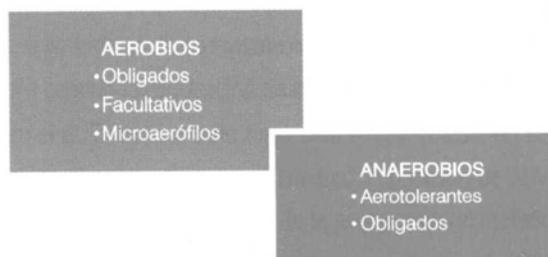


Figura 5.4. Relación de los microorganismos con el oxígeno.

- *Aerobios obligados*. Son bacterias capaces de crecer con las concentraciones de oxígeno presentes en el aire (21%) y muchos pueden tolerar altas concentraciones (hiperbáricos).
- *Anaerobios obligados*. Son microorganismos que carecen del sistema respiratorio y no pueden utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones. Estos mueren en presencia de oxígeno, probablemente por su incapacidad para detoxificar algunos de los productos del oxígeno. Cuando el oxígeno se reduce, algunos productos tóxicos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido (O_2^-), y el radical hidroxilo (OH) se producen. Muchos de los anaerobios obligados son ricos en enzimas flavínicas las cuales reaccionan espontáneamente con el O_2 generando los productos tóxicos. Obtienen energía mediante las vías fermentativas, en las que compuestos orgánicos como ácidos, alcoholes y otros productos sirven como aceptores de electrones.
- *Anaerobios aerotolerantes*. Son bacterias que pueden tolerar el O_2 y crecer en su presencia aún cuando no lo utilizan.
- *Anaerobios facultativos*. Son bacterias que crecen bajo condiciones anaerobias o aerobias determinadas. Usan el oxígeno como aceptor de electrones terminal, con menos eficiencia; en condiciones anaerobias, tienen metabolismo fermentativo produciendo H_2 y CO_2 y pueden crecer aeróbicamente por respiración produciendo sólo CO_2 . Si el O_2 está presente, produce mayor cantidad de ATP y mayor crecimiento de biomasa celular; pero si no hay O_2 , y está disponible una fuente de energía fermentable como la glucosa, se lleva a cabo la fermentación, que produce menos crecimiento de la biomasa y elimina H_2 y CO_2 . (Madigan *et al.*, 1997).
- *Microaerofílicos*. En contraste a los anteriores existen algunos microorganismos aerobios que utilizan el oxígeno solo cuando esta presente en niveles muy bajos, usualmente por su limitada capacidad para respirar o porque contienen alguna molécula o enzima sensible al oxígeno.

FORMAS TÓXICAS DEL OXÍGENO

Como se mencionó anteriormente, el oxígeno es un fuerte oxidante y un excelente aceptor de electrones en la respiración. La presencia de oxígeno atmosférico in-

duce reacciones en la célula que conllevan a la producción del radical superóxido de carga negativa (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros productos de oxidoreducción tóxicos. Los dos primeros pueden reaccionar y producir radicales hidroxilo (OH \cdot) libres que constituyen los oxidantes biológicos más poderosos conocidos. La enzima superóxido-dismutasa cataliza la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, mientras la catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

TÉCNICAS PARA EL CULTIVO DE BACTERIAS ANAEROBIAS

Considerando las limitaciones y restricciones de crecimiento de los microorganismos anaerobios, su aislamiento y cultivo requirió del desarrollo de metodologías especiales, que sólo hasta hace menos de cuatro décadas fueron incorporadas para su estudio. Los desarrollos de Hungate (1969), Wolfe (1976), Bryant (1967) y Mah (1980), permitieron avances significativos en el uso de técnicas específicas para el estudio de bacterias anaerobias estrictas. Además, estos avances permitieron conocer y entender la complejidad de las interacciones microbiológicas y bioquímicas que ocurren durante la digestión anaerobia de la materia orgánica.

JARRA DE ANAEROBIOSIS. Son recipientes sellados de policarbonato, en las cuales el aire es reemplazado por una mezcla de H_2 y CO_2 , y con la presencia de un catalizador químico se remueven las trazas de O_2 presentes en el vaso o en el medio de cultivo; de esta forma es posible obtener las condiciones anóxicas requeridas (Figura 5.5). En estos sistemas también se puede crear las condiciones anaerobias mediante el uso de *kits* para generar hidrógeno y dióxido de carbono (Gas PaK®, Gas Pack Plus®). Cuando se utilizan generadores de H_2 y CO_2 , el sobre del generador se abre y se coloca en la jarra, se adiciona 10 ml de agua destilada o desionizada para permitir la generación de hidrógeno y dióxido de carbono e inmediatamente se cierra la jarra. En el sistema Gas Pack Plus®, el hidrógeno se genera a partir de las tabletas de borohidruro; una vez que se adiciona agua, el hidrógeno que se genera se combina con el oxígeno presente en la jarra en presencia del catalizador de paladio para formar agua. El CO_2 se genera a partir del bicarbonato de sodio más la tableta de ácido cítrico. Con este sistema después de

30 minutos de incubación se observa la formación de gotas de condensación al interior de la superficie de la cámara. Dentro de las dos horas siguientes a 35°C, la concentración de CO₂ suele superar el 4%, pero menor al 10%. Después de la incubación, aire la jarra por 15 segundos, antes de retirar las cajas (Catálogo No. 4371040. Becton Dickinson®).



Figura 5.5. Jarras de anaerobiosis.

El catalizador que se utiliza está compuesto de bolitas de alúmina recubiertas de paladio, que actúa removiendo las trazas de oxígeno y generando vapor de agua, el cual puede ser inactivado por exposición a humedad y al H₂S u otros productos volátiles de la bacteria. Las bolitas de alúmina pueden ser rejuvenecidas o restituidas a su total actividad mediante calentamiento en horno seco a 160-170 °C durante 2 horas. Luego se guardan a temperatura ambiente en un recipiente limpio y seco, preferiblemente en un desecador, hasta el momento de ser usadas. Es importante cada vez que se usen las jarras, es preciso utilizar un catalizador activo e indicador de la anaerobiosis. Las jarras de anaerobiosis no son utilizadas para el aislamiento de bacterias anaerobias obligadas, por que la exposición al oxígeno no puede ser evitada durante en la manipulación de los cultivos.

En el *sistema evacuación-reemplazo* el aire del frasco es extraído y reemplazado por una mezcla de 85% de N₂, 10% de H₂ y 5% de CO₂; este sistema es más económico que el generador de gas y permite que las condiciones anaerobias se establezcan rápidamente (Holdeman *et al.*, 1977).

CÁMARA DE ANAEROBIOSIS. Sistema anaeróbico autoabastecido que permite la manipulación de bacterias por medio de dos guantes fijados herméticamente y proporciona una atmósfera de gases controlada con 85% de N_2 , 10% de H_2 y 5% de CO_2 (Figura 5.6). El material se introduce o se retira de la cámara mediante un dispositivo de intercambio de gases que, por lo general, es un compartimiento anexo a la cámara, de material rígido, con una puerta interior que comunica a la cámara y una exterior. Las cámaras de anaerobiosis pueden contar con incubadora, indicadores de potencial redox (azul de metileno, usualmente) y esterilizador de asas por electricidad (ver Anexo 4).

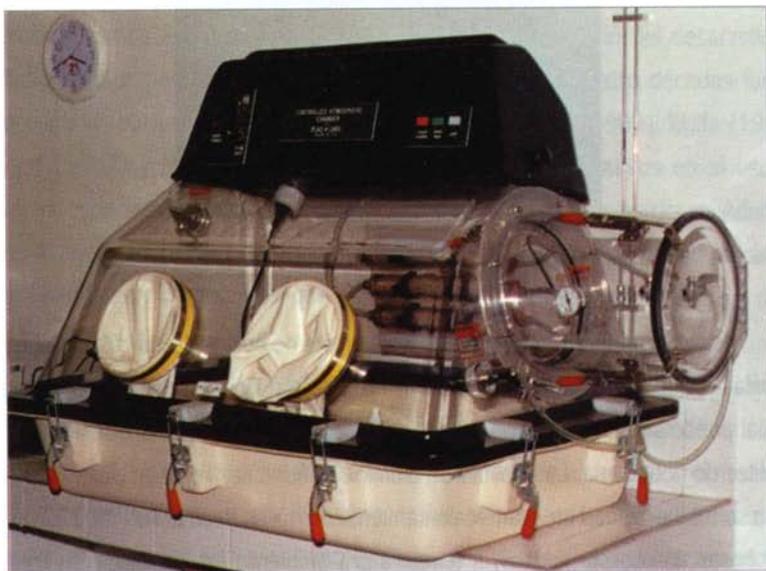


Figura 5.6. Cámara de anaerobiosis.

GASES LIBRES DE OXÍGENO

En los laboratorios de microbiología anaerobia se utiliza gases de alta pureza como: N_2 , H_2 , CO_2 , mezclas N_2-CO_2 (80-20%) y H_2-CO_2 (80-20%). El sistema de distribución utilizado, que se ilustra en la Figura 5.7, es el 'manifold' descrito por *Balch et al.* (1979). Los gases pueden contener algunas trazas de oxígeno las cuales pueden ser removidas haciendo fluir el gas por una columna de vidrio empacada con cobre

la cual es calentada a 350°C con electricidad, las trazas de oxígeno se combina con el cobre y este es oxidado tomando una coloración negra. El cobre puede ser regenerado haciendo pasar hidrógeno por unos pocos minutos (3% de H₂, y 97% de CO₂) a través de la columna de cobre calentada (Holdeman *et al.*, 1977).



Figura 5.7. Sistema de distribución de gases.

AGENTES REDUCTORES

Las bacterias anaerobias estrictas, grupo al que pertenecen las bacterias metanogénicas, requieren de un ambiente totalmente exento de oxígeno puesto que el este gas actúa como un tóxico o como un inhibidor del crecimiento del grupo de bacterias anaerobias estrictas; de otro lado las bacterias metanogénicas exigen también condiciones reductoras en el medio (≤ 330 mv).

Estos requerimientos obligaron a desarrollar técnicas especiales (Hungate, 1969; Wolfe, 1976; Balch y otros, 1979), dichas técnicas se apoyan en la aplicación de dos principios fundamentales:

1. Exclusión total de trazas de oxígeno en la preparación y almacenamiento de los medios de cultivo.
2. Mantenimiento de condiciones reductoras estrictas en dichos medios de cultivo.

El método más simple para evitar la contaminación con oxígeno del medio de cultivo, consiste en hervir y enfriar el medio bajo un flujo de gas inerte como N_2 o una mezcla N_2/CO_2 ; posteriormente se distribuye el medio en los viales, así mismo en presencia de dichos gases. Una vez distribuido el medio se realiza el cambio de la fase gaseosa para asegurar que cualquier traza de oxígeno presente en la misma desaparezca; por último, la manipulación de los medios se realiza dentro de la cámara anaerobia o utilizando jeringas y agujas hipodérmicas previamente purgadas con N_2 .

La sola remoción de las trazas de oxígeno del medio de cultivo no asegura las condiciones reductoras necesarias, por lo que se requiere adicionar al medio uno o varios compuestos reductores que permitan mantener un potencial *redox* adecuado para el crecimiento de las poblaciones anaerobias (Tabla 5.4).

Generalmente se utilizan dos agentes reductores: la cisteína-HCl, que se agrega al preparar el medio, y el sulfuro de sodio, que se agrega a cada tubo o botella antes de inocular para garantizar las condiciones de anaerobiosis adecuadas.

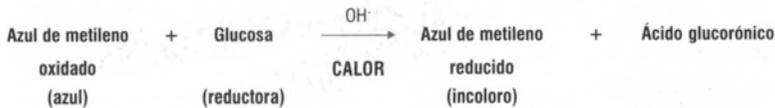
Tabla 5.4. Características de algunos compuestos reductores

Compuesto	Potencial redox estándar (mV)	Concentración utilizada (%)
Thioglicolato de sodio	-100	0.05
Cisteína-HCl	-210	0.05
Dithiothreitol	-330	0.05
Titanio III citrato	-480	0.5 a 2.0
$Na_2S \cdot 9H_2O$	-571	0.05

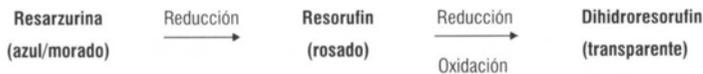
INDICADORES DE ANAEROBIOSIS

Las condiciones de anaerobiosis se controlan mediante un agente indicador de oxido-reducción. Para este propósito, se dispone en el comercio de tiras de azul de metileno o también se puede preparar una mezcla de azul de metileno-glucosa (Anexo 4); el azul de metileno (AM) es azul cuando está oxidado e incoloro cuando está reducido. Cuando el azul de metileno es incoloro el poten-

cial *redox* en este punto es cercano a -230mV . A pH alcalino y a una temperatura mayor de 37°C , la glucosa reduce el azul de metileno a una forma transparente. (Holdeman *et al.*, 1977)



Los indicadores generalmente se mantienen incoloros en condiciones reductoras y se colorean en condiciones oxidantes. Otro indicador de uso general en la preparación de medios de cultivos prereducidos es la resazurina, la cual presenta un color rosado a un Eh cercano de -80mV y es incolora a -10mV .



Al igual que los agentes reductores, los indicadores *redox* pueden ser tóxicos para algunas bacterias; por lo tanto, debe ser utilizado en concentraciones muy bajas en los medios. La resazurina se utiliza a una concentración aproximada de 1mg/L .

MATERIAL DE VIDRIO

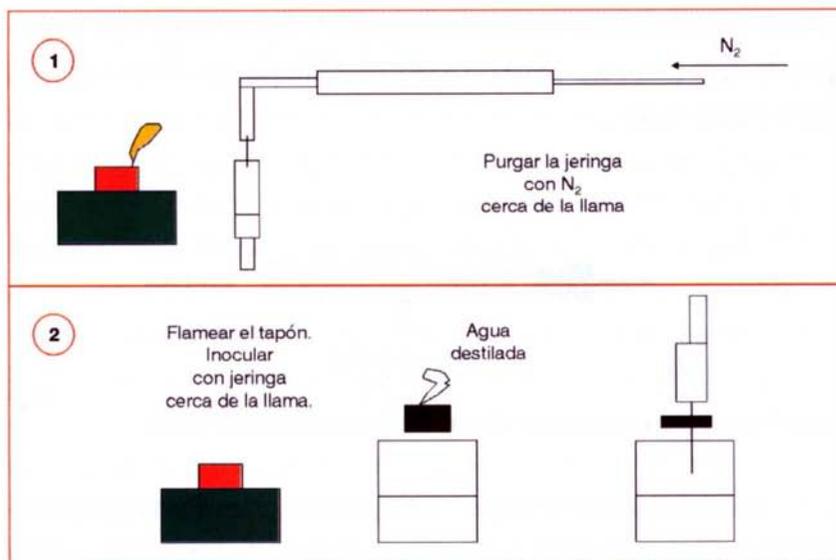
La vidriería utilizada en microbiología anaerobia se ilustra en la Figura 5.8; incluye botellas de suero de diferente volumen, tubos de alta presión y tubos Hungate, los cuales tienen tapa rosca y un septo de caucho. El material de vidrio se tapa con tapón de caucho de butyl y sello metálicos, de 20mm de diámetro; se utiliza la agrafadora y la desagrafadora para colocar y retirar los sellos metálicos respectivamente.



Figura 5.8. Material de vidrio: agrafador, desagrafador, tapones, agrapes y viales de cultivo.

INOCULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE SOLUCIONES

Los tubos y botellas utilizados en la manipulación de bacterias anaerobias se sellan con tapones de caucho, lo cual asegura las condiciones de anaerobiosis y permite agregar soluciones e inocular utilizando jeringas estériles gaseadas con N_2 . Para realizar la inoculación o transferencias de soluciones se utilizan generalmente jeringas de 1 ml tipo 'tuberculina'; antes de tomar cualquier líquido, el aire contenido en la jeringa se debe purgar con N_2 , para lo cual se introduce la aguja de la jeringa dentro de otra aguja de diámetro mayor, previamente esterilizada, realizando varias succiones de N_2 para desalojar el aire; posteriormente, se toma la solución deseada. Al inocular o transferir soluciones se tienen los cuidados normales para evitar la contaminación de estos medios (flamear los tapones, agujas y trabajar cerca de la llama); la Figura 5.9 ilustra el procedimiento de inoculación y transferencia de soluciones.



Tomado de Alazard *et al.*, 1997

Figura 5.9. Inoculación y transferencia de soluciones.

TRANSFERENCIA DE COLONIAS. El aislamiento de bacterias anaerobias estrictas requiere de un manejo especial para evitar el contacto con el oxígeno; a tal fin se realizan pases consecutivos de medio sólido a medio líquido hasta obtener un cultivo puro.

Para la inoculación en medio sólido se utiliza la técnica del *roll-tube* (tubo rodado). Los viales que contienen el medio sólido se llevan a un baño serológico a 50°C para evitar que se solidifiquen; con ayuda de una jeringa hipodérmica y su aguja, se inocula 0.5 ml de la dilución seleccionada del recuento realizado inicialmente; es necesario evitar la formación de burbujas. Luego el tubo es rodado lentamente hasta obtener una capa uniforme del medio sólido sobre las paredes del tubo. Los tubos rodados son incubados en posición invertida para que el agua de condensación pueda ser removida posteriormente.

Para la transferencia de las colonias, se seleccionan aquellas bien desarrolladas sobre la superficie del medio en el *roll-tube*, y son transferidas al medio líquido con la mínima cantidad de agar alrededor de la colonia. Para ello, y bajo condiciones asépticas, se remueve el agrafe y el tapón, se flama la boca

del vial e inmediatamente se inserta una aguja a través de la cual fluye el nitrógeno; la aguja debe estar adaptada a una jeringa empacada con fibra de vidrio estéril (Figura 5.10).

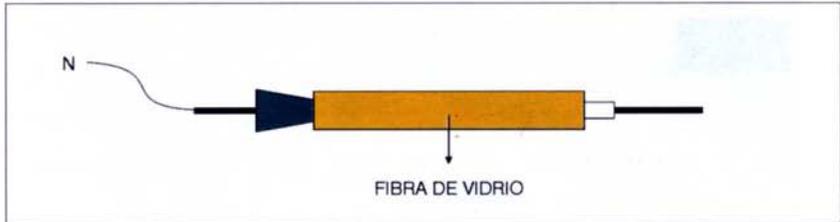
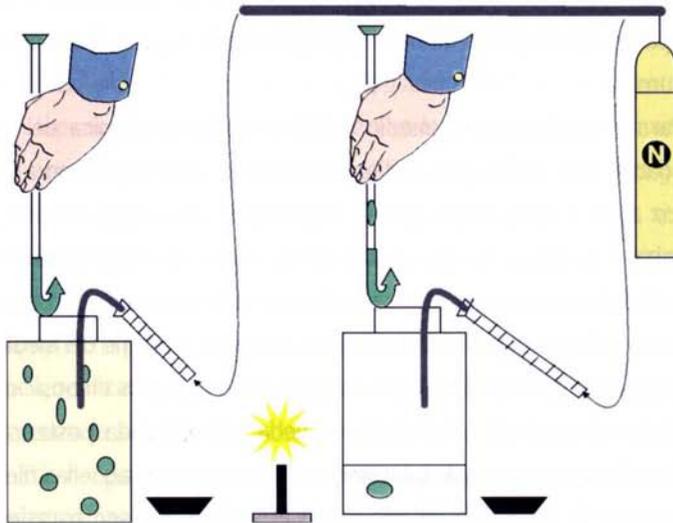


Figura 5.10. Jeringa empacada con fibra de vidrio para el saseo de los viales.

Usando una pipeta de Pasteur estéril, con su punta doblada y preferiblemente gaseada con nitrógeno, y valiéndose de la ayuda de una chupeta, se toma la colonia marcada sobre la superficie del vial y se transfiere a un vial con medio líquido el cual ha sido conectado al sistema de gaseo con nitrógeno; inmediatamente después se tapa y agrafa, procedimiento que ilustra la Figura 5.11. (Holdeman *et al.*, 1977).



Tomado de Espitia, 1999.

Figura 5.11. Transferencias de colonias a medio líquido.

COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA

Existen varios métodos para realizar la caracterización y la cuantificación de la composición microbiológica de los lodos. Los métodos convencionales para la caracterización del lodo se basan en el crecimiento de las diferentes poblaciones en medios selectivos. En primer lugar está la técnica del Número Más Probable (NMP), en la cual diluciones seriadas del lodo son inoculadas en medios selectivos; con este método se maneja un intervalo de confianza del 95% y brinda información de la proporción de cada población bacteriana presente en el lodo (Beliaeff y Mary, 1993).

El análisis de microscopía directa ha sido utilizado durante la caracterización de lodos, para determinar la estructura de los gránulos y las biopelículas. Algunas técnicas permiten realizar la visualización directa, otras requieren de la fijación y teñido del lodo previa al examen. Esta técnica presenta el inconveniente de basarse solamente en la morfología, lo cual no siempre permite identificar las bacterias con exactitud. La epifluorescencia permite identificar las bacterias metanogénicas gracias a la fluorescencia producida por el factor 420; sin embargo, tiene el inconveniente de que algunos microorganismos metanógenos no exhiben fluorescencia (Doddema y Vogels, 1978).

Otro método es la determinación de la velocidad de conversión de sustratos a metano (AME) el cual es frecuentemente utilizado para la caracterización de la biomasa del lodo, ya que proporciona información sobre la máxima actividad metabólica posible de los diferentes grupos microbianos presentes en el lodo; sin embargo no ha sido utilizada para la identificación y cuantificación de los microorganismos.

A pesar de las limitaciones de las técnicas convencionales descritas anteriormente, estas han sido utilizadas con éxito para la caracterización de las comunidades microbianas de los lodos, han permitido un mayor entendimiento de las diferentes reacciones metabólicas que se llevan a cabo entre las poblaciones dentro del reactor y, por lo tanto, contribuyen a mejorar el dominio de esta tecnología (Zinder, 1998; Oude Elferink, 1994).

Los avances en las técnicas de caracterización microbiológica han permitido disponer de diversos métodos como la inmunodetección (ELISA), los biomarcadores (RNA ribosomal; amplificación de secuencias de la fracción 16S del

rRNA mediante reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y los análisis de la composición lipídica de las membranas, para llevar a cabo una identificación directa de los microorganismos en los lodos (Oude Elferink, 1994). Cabe mencionar que, si bien estas técnicas permiten una rápida identificación de los representantes de las poblaciones microbianas presentes en el lodo, no evalúa la capacidad de estas poblaciones para producir metano a partir de diferentes sustratos. En la Tabla 5.5 se especifican las principales poblaciones microbianas que son cuantificadas en los estudios de caracterización microbiológica de los lodos.

A través de los recuentos microbiológicos se realiza la estimación del total de las poblaciones presentes y del número de representantes para cada población. Para ello se utilizan las siguientes técnicas:

- Recuento total de bacterias con naranja de acridina.
- Estimación del número más probable (NMP) de representantes de cada población.
- Recuento total de la población metanogénica por epifluorescencia (factor 420).

RECUESTO MICROBIOLÓGICO TOTAL

La metodología utilizada es la descrita en el *Standar Methods* (1992). La población total se estima a través de la extrapolación del promedio de varios conteos directos, realizados por microscopía de epifluorescencia sobre un filtro de nucleopore ($0.2 \mu\text{m}$), en el cual previamente se filtran la dilución del lodo seleccionada y se colorea con naranja de acridina (ver Anexo 2).

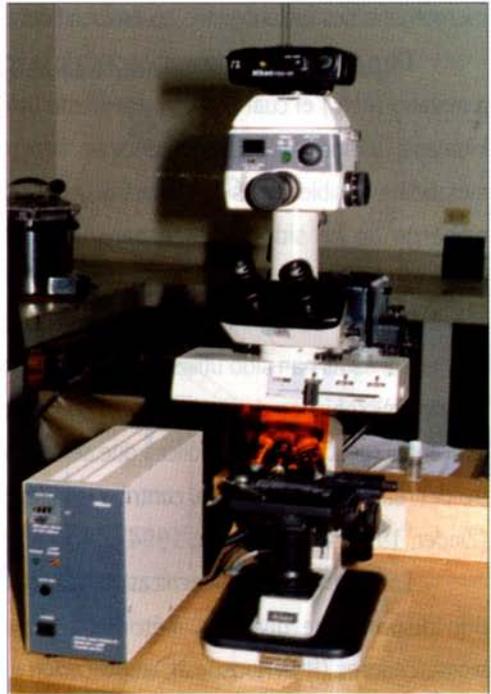


Figura 5.12. Microscopio de epifluorescencia.

Tabla 5.5. Caracterización microbiológica de lodos utilizados en el tratamiento de diferentes tipos de agua residual por la técnica del NMP

Grupos microbianos	Doméstica (Ramirez <i>et al.</i> 1996)*	Matadero (Ramirez <i>et al.</i> 1996)*	Vinaza (Ramirez <i>et al.</i> 1996)*	Refinería de azúcar (Grotenhuis <i>et al.</i> 1991)**	Refinería de azúcar (Dolting <i>et al.</i> 1985)**	Procesadora de papa (Wu <i>et al.</i> 1993)***	Palma africana (Espitia <i>et al.</i> 1998)*	Cervecería (Wu <i>et al.</i> 1993)***
Bacterias fermentativas (Glucosa) (Lactosa)	2 x 10 ⁷ 2 x 10 ⁷	3 x 10 ¹⁰ 5 x 10 ⁹	3 x 10 ⁸ 4 x 10 ⁸	2.1 x 10 ¹²	10 ¹⁰	2.7 x 10 ⁹ 5.6 x 10 ⁹	5 x 10 ⁸ 11 x 10 ⁸	1.9 x 10 ¹¹ 1.2 x 10 ¹¹
Bacterias sulfato reductoras (Acetato) (Lactato)	1 x 10 ⁸ 1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸ 3 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸ 4 x 10 ⁸				2 x 10 ⁸ x 10 ⁸	3.4 x 10 ¹⁰ 6.8 x 10 ¹¹
Bacterias acetogénicas Propionato Butirato Etanol	2 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶ 4 x 10 ⁷	2 x 10 ⁶	2.4 x 10 ⁸ 1.5 x 10 ⁹	10 ⁷ 10 ⁷	6.6 x 10 ¹⁰ 4.2 x 10 ¹¹	5 x 10 ⁸ x 10 ⁸	
Bacterias metanogénicas Acetato Hidrógeno Formato Metanol	2 x 10 ⁷ 8 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸ 2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸ 2 x 10 ⁸	2.4 x 10 ⁸ 9.0 x 10 ⁸ 2.0 x 10 ⁹	10 ⁸ 10 ⁹	1.3 x 10 ¹² 3.5 x 10 ¹² 2.0 x 10 ¹² 4.3 x 10 ⁹	3 x 10 ⁸ 5 x 10 ⁷	6.6 x 10 ¹¹ 1.3 x 10 ¹² 4.7 x 10 ¹² 3.1 x 10 ¹⁰

* No. de bacterias/ g SSV

** No. de bacterias/ ml

*** No. de bacterias/ g SSV

El microscopio está dotado de un ocular micrométrico de 100 divisiones, sobre el cual las bacterias coloreadas por el naranja de acridina toman una tonalidad verde-amarilla que presenta fluorescencia; se realizan varios conteos, cuyo promedio se extrapola al área del filtro, dividiendo dicho resultado por la biomasa filtrada; así, se obtiene el número total de bacterias por gramo de SSV de lodo.

ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE REPRESENTANTES DE CADA POBLACIÓN

Se realiza mediante la técnica del número más probable (NMP), descrita en el *Standard Methods* diferenciando los siguientes grupos según los medios de cultivo utilizados para cada población:

- Bacterias fermentativas (BF).
- Bacterias sulfatoreductoras (BSR).
- Bacterias sintróficas (BS).
- Bacterias metanogénicas (BM).

A su vez, para cada población se cuantifican el número de representantes con diferentes sustratos. La Tabla 5.6 resume los sustratos utilizados para cada población, el periodo de incubación y los parámetros para detectar la positividad de los tubos sembrados.

Se realizan diluciones seriadas del lodo en el medio correspondiente. La dilución 10^{-1} de la muestra de lodo previamente mezclada y homogenizada (mediante un homogenizador de tejidos) se realiza en la cámara de anaerobiosis o bajo una fuente de nitrógeno. Las demás diluciones se realizan fuera de la cámara con jeringas gaseadas con nitrógeno. Se inoculan tres o cinco tubos por cada dilución, adicionalmente se incuban para cada población tubos sin inóculo como control del medio (ver Anexo 3).

Las concentraciones de sustratos recomendadas para las bacterias metanogénicas fueron: formato de sodio 4g/L y metanol 4 ml/L para las bacterias acetogénicas; etanol 20-30mM/L para las sulfato reductoras; propionato 1 ml de una solución de ácido propiónico neutralizado, butirato, 1 ml de una solución neutralizada de ácido butírico, el metanol y etanol 1 ml de una solución stock de 6M y 1M respectivamente (Whitman, 1992; Widdel, 1992; Hickey 1991).

Tabla 5.6. Principales características de la determinación del NMP de acuerdo con el metabolismo bacterial de los grupos relacionados con la digestión anaerobia

Grupo	Sustrato	Periodo de incubación 35°C (días)	Detección tubos positivos
Bacterias fermentativas de la glucosa (BFG) y Lactosa (BFL)	Glucosa	5 a 8	Acidificación del medio, cambio de color verde a amarillo
Bacterias fermentativas del lactato (BFL)	Lactosa	5 a 8	Acidificación del medio, cambio de color verde a amarillo
Bacterias sulfatoreductoras del lactato (BSRL)	Lactato	7 a 15	Producción de FeS, coloración negra
Bacterias sulfatoreductoras del acetato (BSRA)	Acetato	7 a 15	Producción de FeS, coloración negra
Bacterias sintróficas del propionato (BSP)	Propionato	30 a 60	Detección de metano por cromatografía
Bacterias sintróficas del butirato (BSB)	Butirato	30 a 60	Detección de metano por cromatografía
Bacterias metanogénicas hidrogenofilicas (BMH)	H ₂ /CO ₂	15 a 45	Detección de metano por cromatografía
Bacterias metanogénicas acetoclásticas (BMA)	Acetato	30 a 60	Detección de metano por cromatografía

Para la estimación de la población metanogénica del H_2-CO_2 , se realiza el intercambio de gases con esta mezcla (80%-20%). Cada tres días se gasean los tubos inoculados. Para la población fermentativa, sintrófica y metanogénica, acetoclástica y sulfatorreductora, el intercambio de fase se realiza con mezcla N_2-CO_2 (80%-20%).

Para el aislamiento de bacterias de las diferentes poblaciones cuantificadas por la técnica del NMP, a partir de la última dilución donde todos los tubos fueron positivos, se toma 0.2-0.5 ml y se inoculan medios de cultivo sólidos (agar-agar 2% para bacterias mesofílicas o 3% para bacterias termofílicas) para cada población y se aplica la técnica del tubo rodado, de tal forma que las colonias crecen sobre el agar en las paredes del tubo.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS METANOGENICAS

Para la inoculación de los medios sólidos se deben mantener a 50°C en un baño serológico. A esta temperatura adicionar las vitaminas, agente reductor e inoculo en condiciones de esterilidad con jeringas gaseadas con nitrógeno. Se homogeniza suavemente y se rodan bajo un chorro de agua fría. Se incuban en posición invertida por el tiempo necesario para obtener colonias, el agua de condensación es retirada con una aguja gaseada con nitrógeno. Las colonias posteriormente son transferidas, dentro de la cámara de anaerobiosis o bajo una fuente de nitrógeno con pipetas de Pasteur estériles dobladas en la punta, a medios de cultivo líquidos (el mismo medio que se utilizó para el aislamiento). Fuera de la cámara se realiza intercambio de fase con jeringas empacadas con fibra de vidrio y estériles para evitar una posible contaminación. El aislamiento de las colonias se obtiene mediante repiques sucesivos.

La pureza de los cultivos es confirmada inoculando el aislado en medio sólido donde se deben obtener colonias de un solo tipo, también se chequea la ausencia de contaminantes aerobios u otro tipo de anaerobios inoculándolo en un caldo nutritivo donde se inhiba el crecimiento de las bacterias en estudio y se favorezca el crecimiento de los posibles contaminantes.

Para el aislamiento de bacterias metanogénicas es necesario utilizar medios selectivos que proporcionen las fuentes de carbono y energía que requiere la

bacteria que se desea aislar; así, cuando se quiere aislar bacterias metanogénicas hidrogenofílicas, se utiliza H_2/CO_2 como fuente de carbono. Durante la incubación, el espacio de cabeza es analizado para determinar la producción de metano por cromatografía de gases. Cuando se obtiene un resultado positivo se examina el cultivo por epifluorescencia; si se observa una fluorescencia azul-verdosa, ello indica la presencia de bacterias metanogénicas (BM), pero es necesario tener en cuenta que no todas las BM muestran esta fluorescencia. El uso de antibióticos como kanamicina y vancomicina, entre otros, ayuda a reducir la contaminación con bacterias no metanogénicas durante el aislamiento.

AGUAS RESIDUALES

Muestreo

La toma de muestras del residuo debe enmarcarse en la metodología de caracterización de aguas residuales; ésta consta generalmente de cinco etapas (establecimiento de objetivos, información básica, selección de sitios de aforo y muestreo, programa de aforo y muestro, registro e interpretación de resultados), las cuales se especifican a continuación.

Objetivo de la caracterización. En este caso, el objetivo de la caracterización responde a obtener las características fundamentales del residuo antes y después del sistema anaerobio de tratamiento biológico. De esta manera se puede evaluar la eficiencia del sistema y realizar los balances básicos de materia orgánica, sólidos y nutrientes. Debe incluirse la medición y caracterización del biogas generado en el proceso.

Información básica para la caracterización. La información básica esta relacionada con las características del sistema de tratamiento, tales como: tipo de sistema, cargas hidráulica y orgánica, volumen y tiempo de retención hidráulico, origen del residuo, procesos preliminares (rejas, desarenado, sedimentación primaria).

Selección de sitios de aforo y muestreo. Con el fin de evaluar la eficiencia del sistema de tratamiento, los sitios de aforo y muestreo se localizan al ingreso

del sistema y a la salida del mismo. Normalmente se cuenta con algún dispositivo de aforo que permite determinar el caudal afluente y efluente del sistema. De otro lado, en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales, la medición y caracterización del biogás generado en el proceso es fundamental para realizar los balances de materia orgánica e identificar la eficiencia en su remoción; por lo tanto, se debe prever dicha medición en el programa de caracterización del residuo.

Elaboración del programa de aforo y muestreo. En la etapa de planificación del muestreo se debe definir si se toman muestras puntuales o una muestra compuesta; por lo general, cuando se quiere evaluar la calidad del residuo y la eficiencia del sistema, se trabaja con muestras compuestas; esta muestra se compone a partir de muestra puntuales, mezclándolas en forma proporcional al flujo o al tiempo. La muestra debe tomarse en recipientes limpios y refrigerarse a 4°C hasta su análisis, los parámetros más importantes a analizar son la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y los Sólidos Suspendidos (SST y SSV). La medición de biogás generalmente se realiza con medidores continuos tipo gasómetro seco, como los utilizados en las redes de gas natural.

Registro e interpretación de resultados. La calidad con que se realice todo el proceso de caracterización del residuo influye directamente en los resultados del mismo; así, los aspectos más sobresalientes para tener en cuenta son: representatividad de la muestra, técnicas de muestreo apropiadas, adecuado manejo y preservación de muestras y análisis de datos desde los aspectos más relevantes. Generalmente, el análisis se fundamenta en determinar las cargas hidráulica, orgánica y de sólidos que ingresan al sistema, así como en evaluar la eficiencia del sistema para remover materia orgánica y sólidos. Otro aspecto importante en el análisis es la estabilidad del pH en el sistema, así como la evolución de los ácidos grasos volátiles (AGV). Dichos parámetros influyen directamente en el desempeño del proceso de digestión anaerobia: la tasa de degradación anaerobia es máxima en la faja neutra, cerca del $\text{pH} = 7$, pero si el pH toma valores menores de 6.3 o mayores de 7.8, la tasa de metanogénesis disminuye drásticamente (Van Handel y Lettinga, 1994).

Demanda Química de Oxígeno

La determinación de la DQO, tanto en el afluente como en el efluente del sistema, permite evaluar la tasa de remoción de la materia orgánica. Para completar el cuadro de transformación de la materia orgánica en un reactor anaerobio, se requiere cuantificar y caracterizar el biogas generado en el proceso. Según las características del residuo y el proceso de tratamiento, la DQO puede presentarse de varias maneras: soluble, insoluble, biodegradable y resistente. En el proceso de degradación, la DQO biodegradable está constituida por las fracciones acidificada, celular y metanogénica. La suma de la DQO resistente y la acidificada en el efluente, representa la DQO no removida; mientras que la sumatoria de la DQO celular y la metanogénica conforma la DQO removida. La Figura 5.13 representa esquemáticamente el balance de DQO en el proceso de degradación anaerobia.

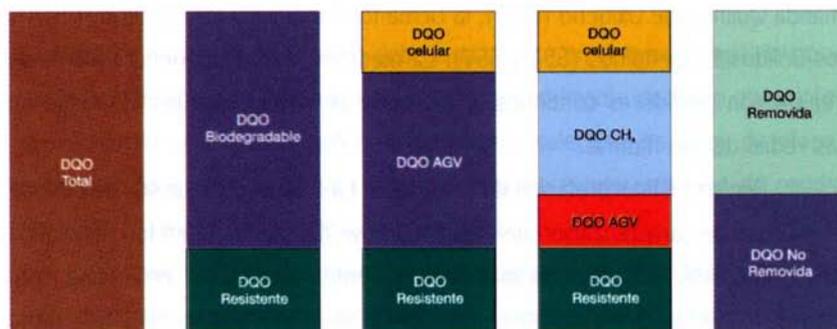


Figura 5.13. Balance de DQO en el proceso de degradación anaerobia.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La metodología para la determinación de la demanda de oxígeno se fundamenta en una oxidación de la materia orgánica presente en la muestra en medio ácido, para lo cual se utiliza una mezcla de dicromato de potasio en exceso y ácido sulfúrico, en presencia de un catalizador y alta temperatura. Luego de la digestión, se valora el exceso de dicromato de potasio y por lo tanto se determina la cantidad de materia orgánica oxidada en términos de equivalentes de oxígeno.

METODOLOGÍAS

Con respecto a la forma en que se realiza la digestión y oxidación de la materia orgánica, los métodos de determinación se clasifican en aquellos de *reflujo abierto* y los de *reflujo cerrado*. Los primeros, referenciados bajo el método 5220B en los *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales* (APHA, 1998), requieren de una cantidad importante de muestra y de los compuestos químicos utilizados en la determinación; además, para concentraciones bajas de DQO, no presentan buena exactitud. El otro método es el de *reflujo cerrado*, más económico en el uso de reactivos y con buena exactitud para concentraciones bajas de DQO, siempre y cuando dichas concentraciones estén por encima de 50 mg/l.

Con relación al método de valoración del dicromato de potasio en exceso se dispone de dos métodos: el *titulométrico* y el *colorimétrico*. El primero, referenciado como el método 5220C en los *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales* (APHA, 1998), consiste en una titulación del dicromato de potasio en exceso en presencia de indicador de ferroína, utilizando una solución valorada de sulfato ferroso amoniacal; por su parte, el método colorimétrico, referenciado como 5220D en el mismo manual de referencia, requiere cantidades pequeñas de muestra y de reactivos, y para su implementación debe usarse un espectrofotómetro y una curva de calibración que se obtiene a partir de una solución estándar de ftalato hidrógeno de potasio.

Ácidos grasos volátiles

MÉTODO 1. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES POR TITULACIÓN

La medición de los AGV también puede ser realizada por titulación, método por el cual se determina el bicarbonato y los ácidos grasos volátiles en soluciones acuosas. La muestra centrifugada o filtrada se lleva a pH 3.0 con HCl 0.1N; a este pH, el bicarbonato será convertido en CO_2 y los AGV estarán presentes en solución en la forma no ionizada. Después de ebullición la solución bajo condensador, para remover el CO_2 , la solución se titula con NaOH 0.1N hasta pH 6.5. Los AGV (y quizás algunos otros ácidos orgánicos) serán convertidos ahora a su forma disociada.

Los equivalentes de bicarbonato y AGV se pueden calcular a partir de los volúmenes de ácido y base utilizados en la titulación. (Rojas, 1988).

Las aguas residuales que contienen compuestos oscuros coloreados necesitan ser evaluadas para corregir la acidez preexistente debida a ácidos orgánicos que no son volátiles, generalmente ácidos húmicos y compuestos acaramelados. Una vez conocida esta acidez, la concentración verdadera de AGV puede ser calculada:

$$AGV \text{ verdaderos}(\text{meq/l}) = AGV (\text{meq/l}) - \text{Acidez preexistente} (\text{meq/l})$$

El procedimiento se realiza de la siguiente manera: la muestra se centrifuga por cinco minutos a 5000 rpm o se filtra a través de papel filtro, se deja decantar y el sobrenadante se lleva a un recipiente graduado. Posteriormente, se agrega agua destilada hasta un volumen de 100 ml, cuando el pH es mayor de 6.5 se añade ácido hasta lograr un pH de 6.5, enseguida se titula con ácido clorhídrico 0.1N hasta pH 3.0 (el consumo se registra como A).

Posteriormente la muestra se coloca en un balón de digestión con conexiones de vidrio esmerilado, se añaden algunas perlas de vidrio de ebullición y se conecta el balón al condensado. De esta forma se elimina por calentamiento el bicarbonato como CO_2 , mientras que se preservan los AGV que han sido volatilizados por condensación. Se calienta el balón hasta que el líquido empieza a ebullicir y se deja así tres (3) minutos. Se interrumpe el calentamiento y se espera dos (2) minutos, entonces se titula inmediatamente hasta lograr un pH 6.5 con NaOH 0.1N (este consumo se registra como B). No es necesario enfriar el líquido (Field, 1987). Los meq/l de AGV se calculan de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Volumen de base gastada (B)} \times 0.1\text{meq} &= \text{meq AGV} \\ \text{meq AGV} / \text{Volumen de muestra } V(\text{ml}) \times 1000 &= \text{meq/l AGV} \\ \text{Volumen de ácido gastado (A)} \times 0.1\text{meq} &= \text{meq de Acidez total} \\ \text{meq de Acidez total} / \text{Volumen de muestra } V(\text{ml}) \times 1000 &= \text{meq/l Acidez total} \\ \text{meq/l Acidez total} - \text{meq/l AGV} &= \text{meq/l bicarbonato.} \end{aligned}$$

MÉTODO 2. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES POR CROMATOGRAFÍA

Para la determinación de ácidos grasos volátiles, la muestra se toma asépticamente del cultivo, se acidifica y extrae con éter; el extracto de éter es utilizado para la lectura por cromatografía.

La sal a partir del ácido es soluble en agua pero no en éter. A bajo pH (por ejemplo, pH 2.0) los ácidos se encuentran en la forma de ácido libre, la cual es soluble en agua y éter. Por esta razón las muestras para el análisis cromatográfico son acidificadas a pH 2.0 o menor con una solución acuosa de H_2SO_4 al 50% previamente a la extracción.

Para su análisis la muestra (1 ml) se mezcla con 0.2 ml de H_2SO_4 al 50%, 0.4g de NaCl y 1 ml de etil éter, mezclar, centrifugar y retirar la capa de éter, a esta adicionar $CaCl_2$ para remover agua disuelta en el éter. Inyectar en el cromatografo el extracto de éter para su análisis. Se utiliza un cromatógrafo de gases, equipado con detector de conductividad térmica, columna de aluminio o acero inoxidable de 6 $\frac{1}{4}$ de pulgada, empacada con Supelco 1000[®], o 5% de FFAP sobre Chromosorb-G[®] y como gas de arrastre se utiliza helio.

La solución estándar de los ácidos grasos volátiles se prepara: 1meq de Ca /100ml de solución acuosa: ácido fórmico: 0.037ml, acético 0.057ml, propiónico 0.075mL y butírico 0.091ml (Holdeman *et al.*, 1977).

Biodegradabilidad del residuo

FUNDAMENTO TEÓRICO

Existen dos tipos de procesos para el tratamiento de aguas residuales: los fisicoquímicos y los biológicos. Los primeros son aplicados a aguas con contaminantes inorgánicos o con materia orgánica no biodegradable. Los procesos biológicos aerobios y anaerobios son utilizados cuando los principales contaminantes son biodegradables.

La prueba de biodegradabilidad anaerobia permite evaluar el potencial de degradación de la materia contaminante en un agua residual hasta metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2). Con esta prueba se puede determinar:

- La velocidad de reacción (tasa de biodegradabilidad).
- Porcentaje máximo de biodegradabilidad.
- El efecto de la carga orgánica.
- Detectar efectos inhibitorios.

El método se basa en medir a lo largo del tiempo (30-45 días) la producción de metano generado dentro de un reactor *batch* con medio mineral, lodo metanogénico activo y la muestra problema. En esta prueba se puede determinar si los microorganismos son capaces de llevar a cabo la degradación de la materia orgánica, lo cual permite hacer una aproximación al comportamiento y la velocidad de reacción de las bacterias en un tratamiento continuo.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Botellas serológicas de 160ml con tapones de hule y sellos de aluminio.
- Lodo metanogénico activo.
- Cromatografía de gases equipado con columna para la determinación de metano.
- Análisis de DQO (ver sección respectiva).
- Análisis de ácidos grasos volátiles (ver sección respectiva).
- Análisis de sólidos suspendidos volátiles (ver sección respectiva).
- Incubadora a 35°C.
- Medio mineral de Batch (Anexo 1).

REACTORES

Las pruebas de biodegradabilidad se realizan en botellas serológicas de 160 ml con un volumen de fase gaseosa del 30% del volumen total. El medio mineral se adiciona para asegurar que no se presente limitación por nutrientes, las botellas con el medio se esterilizan previo a la adición del lodo y del agua residual de prueba.

INÓCULO Y ARRANQUE

El agua residual a estudiar se debe caracterizar mediante la determinación de sólidos totales, volátiles y fijos; en sus formas totales (ST), suspendidos (SS) y disueltos (SD), Demanda Química de Oxígeno (DQO) total y soluble. Cuando el agua residual tiene un pH ácido se debe neutralizar.

Al lodo metanogénico activo que se va a utilizar como inóculo se le determinan los sólidos suspendidos volátiles. Estos datos, junto con la DQO del agua, son necesarios para calcular las cargas orgánicas de prueba. Durante el ensayo se debe montar una botella testigo (lodo y medio mineral únicamente) para corregir la producción de gas generada por el lodo solo y obtener la producción neta de metano.

PROCEDIMIENTO

Aunque depende de la actividad metanogénica del lodo y del volumen total de la fase líquida en el vial de ensayo, la mayoría de los autores recomiendan utilizar una concentración de lodo suficientemente alta para mantener un exceso (5 gSSV/l), pero suficientemente baja para que el lodo no contribuya con más del 20% de la DQO. Si el lodo tiene una alta actividad metanogénica ($> 0.2 \text{ gDQO-CH}_4/\text{g SSV día}$) se puede usar menor cantidad de lodo, pero no menos de 1.5 gSSV/L. La concentración de DQO del agua residual debe ser suficientemente alta que permita medir el metano y los AGV en forma precisa. Generalmente se recomienda, utilizar agua residual con una concentración de 5 gDQO/L (Field, 1987).

Luego de la inoculación los reactores son incubados a 35°C, el ensayo se debe realizar por triplicado, ya que al tiempo cero se sacrifica una botella por cada carga que se va a evaluar para verificar pH y determinar DQO total y soluble y ácidos grasos volátiles. Durante la prueba se debe medir la producción de metano acumulada, la presión de la botella con un transductor de presión, la concentración de AGV y la DQO filtrada, tanto del lodo control como del tratamiento en intervalos de tiempo de tres a cuatro días.

El volumen de medio mineral de Balch en las botellas, puede variar, dependiendo del agua residual. Aguas residuales con una baja DQO son poco adecuadas para el tratamiento anaerobio, el volumen de medio mineral adicionado a cada vial puede introducir una importante dilución del agua residual a probar, dando resultados poco confiables

El periodo de tiempo requerido para el ensayo depende del tiempo permitido para que ocurra la digestión y por lo tanto siempre se debe informar el número de días en que se llevó a cabo el experimento para obtener resultados de DQO_{BD} (Díaz-Baez, 1994; Field, 1987).

La prueba de biodegradabilidad se da por terminada cuando deja de aumentar la presión interna de la botella y la producción de metano se hace nula; cuando esto sucede, se procede a abrir las botellas para determinar la DQO total y soluble final, así como el pH y los SSV (Díaz-Báez, 1994).

CÁLCULOS

A manera de ejemplo se realizará el cálculo del volumen de agua residual y de lodo a utilizar en un ensayo de biodegradación. En el caso que se quiera evaluar una relación de 1 gDQO/gSSV con un agua residual y un lodo con las siguientes características:

<i>Agua residual</i>	<i>Lodo de inóculo</i>
$QO_{Total} = 81369 \text{ mg/l}$	$SST = 46850 \text{ mg/l}$
$QO_{Soluble} = 77260 \text{ mg/l}$	$SSV = 32740 \text{ mg/l}$

Para los cálculos se debe trabajar en mg/ml, por lo que los anteriores valores serían:

<i>Agua residual</i>	<i>Lodo de inóculo</i>
$DQO_{Total} = 81,369 \text{ mg/ml}$	$SSV = 46,850 \text{ mg/ml}$

El volumen de lodo adicionar a la botella de ensayo, teniendo en cuenta una concentración mínima de lodo 1.5 g SSV/l (1.5mg/ml) y un volumen total de la fase líquida del ensayo (por ejemplo 13 ml) será:

$$x = 1.5 \text{ mg} * \frac{13 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$x = 19.5 \text{ mg}$$

Como la concentración de sólidos del lodo es: 32.740 mg/ml,

$$x = 19.5 \text{ mg} * \frac{1 \text{ ml}}{32.740 \text{ mg}}$$

$$x = 0.6 \text{ ml de lodo}$$

Para el cálculo del agua residual, por ejemplo para una carga de 1mg DQO/mgSSV, será:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mg DQO/mgSSV} & 32.740 \text{ mgSSV/ml} & \\ 0.6 \text{ ml} & x & \\ x = & 19.6 \text{ mg DQO} & \end{array}$$

La DQO_{Total} del agua residual es de 81.369mg/ml:

$$\begin{array}{rcl} x = & 1 \text{ ml} * \frac{19.6 \text{ mg DQO}}{81.369 \text{ mg DQO}} & \\ x = & 0.24 \text{ ml de residuo.} & \end{array}$$

Cuando el agua residual tenga más del 80% de la DQO total como DQO soluble, se tomará en cuenta la DQO soluble para los cálculos, de lo contrario la DQO soluble e insoluble (o DQO filtrada y DQOss) deberán ser separadas y estudiar la biodegradabilidad para cada fracción (Field, 1987).

Con los datos experimentales obtenidos en la prueba de biodegradación se realizan los siguientes cálculos:

CÁLCULO DE LA DQO SOLUBLE DEL AGUA RESIDUAL. La primera etapa del cálculo es convertir los datos de la producción acumulada de CH₄ a mg de DQO-CH₄/L (DQO convertida a metano), como sigue (Field, 1987):

$$1000 \times (S\text{CH}_4 / \text{FC}) / V$$

Donde,

S CH₄: Producción acumulada de CH₄ (ml) producido después de un tiempo de digestión.

FC: Factor de Conversión (ml de CH₄ / gDQO). (ver Tabla 5.3.).

V: Volumen efectivo (litros) del recipiente de digestión.

$$1000 = \text{mg/g}$$

El factor también puede ser calculado con base en la masa de metano producida expresada como DQO, dividida sobre la masa de DQO removida. Si el cálculo se hace sobre la fracción soluble, la producción que se considera es la neta de metano; si es sobre la DQO total, se utiliza la producción bruta de metano. Para el primer caso, es necesario lavar el lodo antes de inocular las botellas para eliminar el sustrato soluble que pueda contener el inóculo.

$$Y = \frac{MCH_4 - DQO(g)}{MCH_4 - DQO_{removida}(g)}$$

$$MCH_4 - DQO(g) = nCH_4 \text{ netas (máximo)} (16) (4) = gCH_4 - DQO$$

$$MCH_4 - DQO_{removida}(g) = (DQO_i - DQO_f) \text{ (Volumen fase líquida)}$$

Los valores de concentración de los ácidos grasos volátiles deberán ser convertidos a mg DQO/L, en el caso que estén expresados meq/L. Los factores de conversión son: para el ácido acético 64, para el propiónico 112 y para el butírico 160. Sin embargo, es necesario conocer la relación C2:C3:C4 para poder calcular el factor de conversión correcto. Estos pueden ser cuantificados por cromatografía de gases.

Con los datos en mg DQO/L, es necesario corregir los datos de cada tratamiento, restándoles los valores obtenidos para el control. Los datos corregidos se dividen por la concentración corregida de la DQO del agua residual al tiempo cero (Field, 1987).

Para obtener los porcentajes de metanogénesis, el porcentaje de AGV presentes, el porcentaje de acidificación, y el porcentaje de DQO filtrada remanente, se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Metanogénesis: } DQO - CH_4 / DQO_{t=0} \times 100$$

$$\% \text{ Acidificación: } DQO - \text{acid} / DQO_{t=0} \times 100$$

$$\% \text{ AGV presentes: } DQO - A.G.V / DQO_{t=0} \times 100$$

$$\% \text{ DQO filtrada remanente: } DQO - \text{filtr} / DQO_{t=0} \times 100$$

Después se calcula la DQO filtrada removida (% DQO_{filtrada} removida) o % R de la siguiente forma:

$$\% R = 100 - \% DQO_{filtrada}$$

Los porcentajes de biodegradación del agua residual (% DQO_{BD} o % BD) y las células producidas como una fracción de la DQO del agua residual (% DQO_{cel} o % células) se calcula como sigue:

$$\% BD = \% R + \% AGV$$

$$\% \text{ Células} = \% BD - \% A \text{ o } \% \text{ Células} = \% R - \% M$$

El coeficiente de rendimiento celular (Y): $g \text{ DQO}_{\text{células}} / g \text{ DQO}_{\text{BD}}$

$$Y = \% \text{ células} / \% \text{ BD}$$

CÁLCULO DE LA MÁXIMA TASA DE BIODegradABILIDAD. Indica la velocidad de utilización del sustrato por los microorganismos, se calcula a través de la medición de metano obtenida por unidad de SSV y por unidad de tiempo. Para ello se gráfica las moles netas de metano producidas en función del tiempo, y se calcula la pendiente máxima de producción de metano. El dato de la pendiente máxima de la curva, se divide entre los SSV inoculados en la botella. Las moles de metano expresadas en masa de DQO ($g \text{ CH}_4\text{-DQO}$), se obtienen multiplicando por el peso molecular del metano (16g) por los gramos de O_2 requeridos para oxidar 1 g de CH_4 a CO_2 y H_2O (4g). Las unidades obtenidas son $g \text{ CH}_4\text{-DQO}/g\text{SSV días}$ (Díaz-Báez, 1994).

La tasa máxima de biodegradabilidad será:

$$\frac{\text{Pendiente máxima } n\text{CH}_4 \text{ netas} \times 16 \times 4 \times 1000}{\text{SSV}^*} = \text{mgCH}_4\text{DQO}/\text{mgSSV.d}$$

*La concentración mg/ml x volumen de lodo inoculado

Toxicidad anaerobia

FUNDAMENTO TEÓRICO

En el tratamiento de aguas residuales, la toxicidad es observada cuando se produce una reducción en la producción de metano como consecuencia de la presencia de uno o varios compuestos tóxicos. El ensayo de toxicidad se basa en comparar la reducción en la tasa de producción de metano de un lodo expuesto a una sustancia tóxica frente a un control que no tiene dicha sustancia (Figura 5.14).

Generalmente la toxicidad es el resultado de la inhibición de bacterias metanogénicas y/o acetogénicas, sin embargo se puede presentar inhibición de las enzimas extracelulares producidas por las bacterias responsables de la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y grasas.

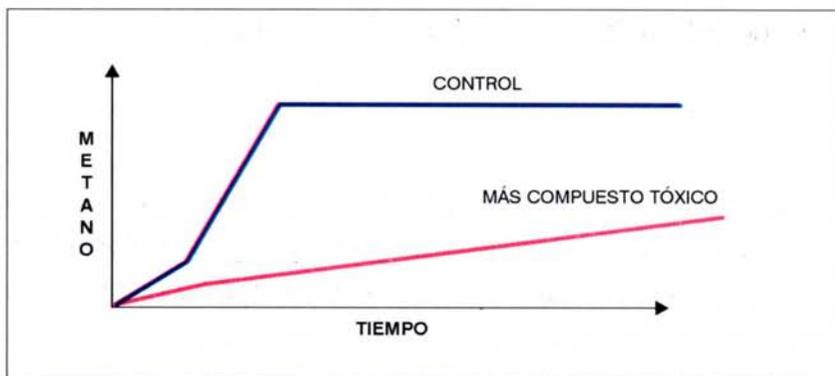


Figura 5.14. Producción de metano en un ensayo de toxicidad.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Botellas serológicas de 120ml, con tapón de caucho y sello de aluminio.
- Cilindro de CH_4 puro para elaborar curva de calibración.
- Cromatógrafo de gases configurado para cuantificación de CH_4 .
- Cuarto caliente o baño María.
- Medio de cultivo (ver Anexo 1).

PROCEDIMIENTO

El ensayo de toxicidad se realiza igual a una Actividad Metanogénica Específica, AME (ver sección correspondiente) con la activación previa del lodo y la cuantificación de la producción de metano mediante cromatografía de gases.

La prueba se hace por triplicado, debe incluir un control positivo con una sustancia de referencia de toxicidad conocida, y un control negativo en el cual no se le ha adicionado la sustancia o el agua residual potencialmente tóxica (lodo + sustrato). Se deben probar además diferentes concentraciones del tóxico o del agua residual que se va a evaluar.

Luego de la activación del lodo, se adiciona el sustrato para control negativo, para cada uno de los tratamientos se adiciona el sustrato junto con el tóxico o dilución a evaluar. Se incuban las botellas a 35°C , y se realiza la medición de la producción de metano cada tres horas durante las primeras 24 horas del ensayo. Posterior a este tiempo, se hacen mediciones dos veces al día durante los si-

güentes 5 días de exposición. Previo a iniciar el ensayo de toxicidad se establece la tasa de producción de metano propia del lodo mediante un ensayo de actividad metanogénica específica.

CÁLCULOS

Con los datos obtenidos, se construye una gráfica de volumen de metano producido en función del tiempo de prueba. Se calcula la pendiente obtenida para el control negativo, el control positivo, y para cada uno de los tratamientos utilizados. Con los valores obtenidos, se calcula la actividad metanogénica de cada uno de los tratamientos.

La inhibición de la actividad metanogénica para cada uno de los tratamientos se calcula comparando el valor obtenido respecto al valor obtenido para el control negativo. El porcentaje de actividad metanogénica (% ACT) comparada con la del control será:

$$\% ACT = (ACT_T / ACT_C) \times 100$$

El porcentaje de inhibición (% I) para cada tratamiento o concentración será:

$$\% I = 100 - \% ACT$$

El valor de la concentración a la que un compuesto o mezcla de compuestos (agua residual) produce una inhibición de la actividad en un 50%, se determina graficando los % ACT obtenidos para cada tratamiento en función de la concentración o dilución del tratamiento. La concentración a la cual se obtiene una inhibición del 50%, corresponderá a la CE_{50} de la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- ALAZARD, D. y Molina, F. (1997). *Microbiología de la digestión anaerobia y caracterización de lodos anaerobios*. Universidad de Antioquia, Medellín, (Colombia).
- APHA (*American Public Health Association*) (1998). *Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th edition. Washington.
- BALCH, W.E.; Fox, G.E.; Magrum, L.J.; Woese, C.R y Wolfe, R.S. (1979). "Methanogens: Revaluation of unique biological group". *Microbiol. Rev.* 43: 260-296.
- BELIAEFF, B. y Mary, J.Y. (1993). "The Most Probable Number Estimate and its confidence limits". *Water Res.* 5: 799 - 805.
- BROCK, T. y Madigan, M. (1984). *Biology of Microorganisms*. Fifth Edition. Prentice Hall. New Jersey (EUA).
- BRYANT, M.P.; Wolin, E.A. y Wolfe, R.S. (1967). "*Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria". *Archiv fur Mikrobiologie* 59, 20- 31
- Catálogo No. 43710401993. U.S. Patent No 4,976,931. BBL Gas Generator Envelopes of Anaerobic Atmosphere. Gas Pak Plus™ Disposable Hydrogen + Carbon. Becton Dickinson and Company.
- DÍAZ-BÁEZ, M.C. (1994). "Manual de ensayos de caracterización de lodos y reactores anaerobios". Corporación para el fomento de la investigación y el desarrollo tecnológico de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá (Colombia).
- DODDEMA, H.J. y Vogels, G.D. (1978). "Improved Identification of Methanogenic Bacteria by fluorescence microscopy". *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 752-754.
- DOLFING, J.; Griffioen A.; Van Neervan, A. y Zevenhuizen, L.(1985). "Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge". *Can. J. Microbiol.* 31: 744-750.
- E.P.A. 1986. "Operation of Wastewater Treatment Plants". Volumen II. En: Romero, J. (1989). *Acuanálisis*. Escuela Colombiana de Ingeniería. Bogotá (Colombia).

- ESPITIA, S. (1999). "Caracterización microbiológica de lodos provenientes de plantas de tratamiento anaerobio". Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).
- FIELD, J. (1987). "Parámetros operativos del manto de lodos anaerobios de flujos ascendente. 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. B-1 - B-35.
- GROTENHUIS, 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.
- HICKEY, R.F.; Wu, W. y Zeikus, G. (1991). "Characterisation of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of Sulfate-reducing bacteria". *Applied Environmental Microbiology* 57(12): 3438-3449.
- HOLDEMAN, L.V.; Cato, E. y Moore, W.E.C. (1977). "Anaerobe Laboratory Manual. Culture Methods. Use of Prereduced Media". 4th Edition. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia (EUA), p. 117-121.
- HUNGATE, R.E (1967). "Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation". *Archiv fur Microbiologie* 59: 158-164.
- MAH, R.A. (1980). "Isolation and characterization of *Methanococcus mazael*". *Current Microbiology* 3: 321-326.
- OUDE, E.; Visser A.; Hulshoff L.W. y Stams A.J. (1994) "Sulfate reduction in methanogenic bioreactors". *FEMS Microbiology Rev.* 15: 119 - 136.
- RAMÍREZ, F.; Molina, F.; Rojas, O. y Alazard, D. (1996). "Evaluación de potenciales semillas para la inoculación de reactores anaerobios". Memorias IV Seminario Taller Latinoamericano sobre tratamiento de aguas residuales. Bucaramanga (Colombia) p. 33-44.
- ROJAS, O. (1988). "La alcalinidad como parámetro de control de ácidos grasos volátiles en digestión anaerobia". En: Manual del curso Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales Microbiología y Bioquímica. Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia).
- VAN HAANDEL, A. y Lettinga, G. (1994). Tratamiento anaerobio de esgotos em regioes de clima quente. Editora EPGRAF. Campina Grande (Brasil).
- WIDDEL, F. y Hansen, T.A. (1992). "The dissimilatory sulfate and sulfur-reducing bacteria". In: The Prokaryotes, 2nd ed. (Balows A., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H, Eds.), p. 719-767. Springer Verlag. New York (EUA).

- WILDSCHUT, L. (1987). "Medición de parámetros. 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. J1-J17.
- WHITMAN, W.B., Bowen, T.L. y Boone, D.R. (1992). "The Methanogenic Bacteria". En: *The Prokaryotes* 2nd edn. (Balows, A., Truper, Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H, Eds). Springer Verlag. New York (EUA), p. 719-167.
- WILLS, B. *et al* (2000). "Informe final de la investigación: Optimización de la etapa de arranque de reactores anaerobios, mediante el mejoramiento de la calidad de diferentes semillas en condiciones dinámicas de operación". Colciencias, contrato 178-96. Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Medellín (Colombia).
- WOLFE, R.S. y Higgins, I.J. (1979). "Microbial biochemistry of methane: a study in contrasts". *Int. Rev. Biochem.* 21: 267-350.
- WU, W.M.; Thiele, J.H.; Jain, M.K.; Pankratz, H.S. y Hickey, R.F. (1993). "Comparison of Rod - versus Filament type methanogenic granules: Microbial population and reactor performance". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 795-803.
- ZINDER, S.H. (1998). "Methanogens", capítulo 5. En: *Techniques in Microbial Ecology* (Burlage, R.S *et al*, eds.) Oxford University Press. New York (EUA), p. 113-135.

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES ANAEROBIAS

A. MEDIOS DE CULTIVO

ACTIVIDAD METANOGENICA

Para 1000 ml

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50 ml
Solución oligoelementos sin sulfatos	10 ml
K_2HPO_4	0.3g
Solución de resazurina (0.1%)	1.0 ml
Extracto de levadura	0.1g
Bio-tripcase (Peptona tripsica de caseína)	0.1g

Se completa volumen a 1l, se ajusta pH a 7.0 con NaOH 1N, agregar 10% en volumen de agua destilada adicional, hervir hasta llegar al volumen de 1 litro y enfriar bajo atmósfera de N_2 .

Cuando esté a temperatura ambiente agregar:

$NaHCO_3$	2.0g
Cisteína	0.5g

Dosificar bajo corriente de nitrógeno. Se gasea el frasco donde se va a servir con N_2 y se agrega el medio. Servir 13 mL en botellas de 60 mL, hacer intercambio de fase $N_2 - CO_2$ (80% - 20%) por un minuto, se debe retirar primero la aguja con la cual se está gaseando para que no haya una sobrepresión y luego la aguja de desalojo, llevar a autoclave durante 15 minutos (121°C - 15 psi), antes de utilizarlo agregar:

Na_2S (2.0%)	0.2 mL
Solución diluida de vitaminas de Balch	0.2 mL

Nota: El medio para la realización de la prueba de Biodegradabilidad es este mismo suprimiendo el extracto de levadura y Bio-tripticasa, estos compuestos aumentan la concentración de DQO en un bajo porcentaje y finalmente la concentración real no es la misma que se va a evaluar.

RECuento DE BACTERIAS ANAEROBIAS Estrictas (BAS)

Volumen 1 litro:

Solución mineral de <i>Balch</i> sin sulfatos	50ml
K_2HPO_4	0.30g
$Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$ (0.2%)	1.0ml
Solución de oligoelementos sin sulfatos	10.0ml
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.5g/L)	0.5ml
Azul de bromotimol (1.0%)	1.0ml
Extracto de levadura	2.0g
Bio trypcase (Peptona tripsica de caseína)	2.0g
Glucosa	10.0g

Se completa con agua destilada a 1000mL, se ajusta pH con NaOH 1N, agregar 10% en volumen de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno (N_2).

Cuando esté a temperatura ambiente agregar

$NaHCO_3$	5.0g
Cisteína	0.5g

Servir 5mL en tubos Hungate, hacer cambio de fase N_2/CO_2 (80%, 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos (121°C - 15 psi). Antes de utilizarlo agregar:

$Na_2S \cdot 9H_2O$ (2.0%)	0.05ml/5ml
Vitaminas diluidas de Balch	0.05ml/5ml

Después del autoclave el pH debe ser 7.1

RECUEENTO BACTERIAS FERMENTADORAS DEL LACTATO Y DE LA GLUCOSA (BFG Y BFL)

Volumen 1 litro:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50ml
Oligoelementos de Balch sin sulfato	10ml
K_2HPO_4	0.30g
$Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$ (0.2%)	1.0ml
$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$ (0.5g/L)	1.0ml
Azul de bromotimol (1.0%)	1.0ml
Extracto de levadura	2.0g
BIO tryptcase (Peptona tripsica de caseína)	2.0g
Selenito de sodio (1.73g/L)	1.0ml

Para las BFG tomar 500mL del medio anterior y agregar 5g de glucosa. Ajustar pH a 7.1. Después de hervir enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 y agregar:

Cisteína - HCl	0.25g
$NaHCO_3$ (10%)	2.5g

Para las BFL tomar los 500 mL de medio restantes y agregar 3.6 mL de lactato de sodio (60% en peso) ó 2.8 mL de ácido láctico. Ajustar el pH a 7.25. Después de hervir, enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 .

Cuando está a temperatura ambiente agregar:

Cisteína - HCl	0.25g
$NaHCO_3$ (10%)	2.5g

Servir 5mL en tubos Hungate, bajo atmósfera de nitrógeno, hacer cambio de fase N_2/CO_2 (80% / 20%) durante un minuto. Llevar al autoclave durante 15 minutos (121°C - 15 psi).

Antes de utilizarlo agregar:

$Na_2S \cdot 9H_2O$ (2.0%)	0.05ml/5ml
Vitaminas diluidas de Balch	0.05ml/5ml

RECuento DE BACTERIAS SULFATOREDUCTORAS DEL ACETATO Y LACTATO (BSRLAC Y BSRAC)

Volumen 1 litro:

KH_2PO_4	0.2g
NH_4Cl	0.5g
Na_2SO_4	3.0g
NaCl	1.2g
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.36g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15g
Extracto de levadura	1.0g
Oligoelementos P.W. sin sulfato	1.0ml
Solución de resazurina (0.1%)	1.0ml

Para las bacterias sulfato reductoras del acetato se toman 500mL del medio anterior y agregar 1.5g de acetato de sodio. $3\text{H}_2\text{O}$. Ajustar pH a 6.7.

Después de hervir, enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 y agregar antes de servir 2.5g NaHCO_3

Para las bacterias reductoras del lactato tomar los 500mL de medio restantes y agregar 4.25ml de lactato de sodio (60%). Ajustar el pH a 6.8. Después de hervir, enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 .

Cuando está a temperatura ambiente agregar antes de servir 2.5g

NaHCO_3

Servir 5mL en tubos Hungate, bajo atmósfera de nitrógeno, hacer cambio de fase N_2/CO_2 (80% / 20%) durante un minuto, llevar al autoclave durante 15 minutos (121°C, 15 psi).

Antes de utilizarlo agregar:

Cisteína HCl (2.5%)	0.1 ml/5ml
Vitaminas P.W. diluidas	0.05ml/5ml

RECuento DE BACTERIAS METANOGÉNICAS HIDROGENOFÍLICAS. (BMH₂)

Volumen 1 litro:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50ml
Solución oligoelementos de Balch sin sulfatos	10ml

K_2HPO_4	0.30g
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.5g/L)	0.5ml
Selenito de sodio (1.73g/L)	1.0ml
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.2%)	1.0ml
Resazurina (0.1%)	1.0ml

El medio no contiene SO_4 con el fin de evitar el crecimiento de bacterias autotróficas, cuando se requiere el medio para aislar bacterias hidrogenofilicas, con el fin de evitar la contaminación del cultivo, no se agregan vitaminas, extracto de levadura, Bio-trypcase , ni jugo de rumen.

Cuando se requiere el medio para identificar crecimiento de bacterias hidrogenofilicas se agregan:

Extracto de levadura	0.5g
Bio- trypcase	0.1g

Ajustar el pH a 7.2 - 7.4 con NaOH 1M, agregar 10% en volumen y hervir hasta evaporar el exceso, enfriar bajo corriente de nitrógeno, cuando esté a temperatura ambiente agregar:

Cisteína - HCl	0.5g
$NaHCO_3$ (10%)	5.0g

Servir 5mL en tubos Hungate, bajo atmósfera de nitrógeno, hacer cambio de fase H_2/CO_2 (80%/20%) durante un minuto, llevar al autoclave durante 15 minutos (121°C- 15 psi).

Renovar el cambio de fase H_2/CO_2 cada 2 ó 3 días después de inocular.

Antes de utilizarlo agregar:

$Na_2S \cdot 9H_2O$ (2.0%)	0.05ml/5ml
Vitaminas diluidas de Balch	0.05ml/5ml

RECUESTO DE BACTERIAS METANOGÉNICAS ACETOCLÁSTICAS (BMA)

Volumen 1 litro:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50ml
K_2HPO_4	0.30g

Solución oligoelementos de Balch sin sulfatos	10.0ml
Fe SO ₄ · 7H ₂ O (0.2%)	1.0ml
Selenito de sodio (1.75g/L)	1.0ml
Extracto de levadura	0.5g
Bio - tripcase	0.1g
Resazurina (0.1%)	1.0ml
Acetato de sodio	8.0g

Para el aislamiento de bacterias metanogénicas del metanol, se utiliza este medio adicionando 0.63mL de metanol a cambio del acetato.

Ajustar el pH a 7.1-7.2. Agregar 10% del volumen final de agua destilada, enfriar bajo atmósfera de N₂/CO₂ (80% - 20%), cuando esté a temperatura ambiente agregar:

Cisteína - HCl	0.5g
Na HCO ₃ (10%)	5.0g

Servir 5mL en tubos Hungate, bajo atmósfera de nitrógeno, hacer cambio de fase N₂/CO₂ (80% - 20%) durante un minuto, llevar al autoclave durante 15 minutos (121°C - 15 psi).

Antes de utilizarlo agregar:

Na ₂ S · 9H ₂ O (2.0%)	0.05ml/5ml
Vitaminas diluidas de Balch	0.05ml/5ml

RECuento DE BACTERIAS SINTRÓFICAS DEL PROPIONATO / BUTIRATO (BSP Y BSB)

Volumen 1 litro:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50ml
Solución oligoelementos de Balch sin sulfatos	10ml
K ₂ HPO ₄	0.3g
Fe SO ₄ · 7H ₂ O (0.2%)	1.0ml
Selenito de sodio (1.75g/L)	1.0ml
NiCl ₂ (0.05%)	0.5ml
Extracto de levadura	0.1g
Bio - tripcase	0.1g
Resazurina (0.1%)	1.0ml

Se toman 500ml para preparar el medio de bacterias sintróficas del propionato, agregando 0.5g de propionato de sodio ($C_3H_5O_2Na$)

Los 500ml restantes se utilizan para el medio de bacterias sintróficas del butirato, se agregan 0.5g de butirato de sodio ($C_4H_7O_2Na$) o 4.5ml de ácido butírico 1M.

Agregar 10% en volumen de agua destilada en exceso, enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 (80% - 20%), cuando esté a temperatura ambiente agregar:

Cisteína - HCl	0.5g
$NaHCO_3$ (10%)	5.0g

Servir 5mL en tubos de Hungate, bajo atmósfera de nitrógeno, hacer cambio de fase N_2/CO_2 (80% - 20%) durante un minuto, llevar al autoclave durante 15 minutos (121°C - 15 psi).

Antes de utilizarlo agregar:

$Na_2S \cdot 9H_2O$ (2.0%)	0.05ml/5ml
Vitaminas diluidas de Balch	0.05ml/5ml

B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN MINERAL DE BALCH

	Con sulfatos	Sin sulfatos *
KH_2PO_4	6.0g	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	6.0g	
NH_4Cl		5.0 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$		2.1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.6g	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.16g	0.16 g
NaCl	12.0 g	12.0 g

* Para evitar inhibición por la presencia de bacterias sulfato-reductoras.

Diluir en 1litro de agua destilada., preparara en aerobiosis, almacenar en refrigerador a 4°C.

SOLUCIÓN OLIGOELEMENTOS SIN SULFATOS

	Con sulfatos	Sin sulfatos*
Ácido nitrilotriacético**	1.5g	1.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0g	
MgCl ₂ ·6H ₂ O		2.5 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.5g	
MnCl ₂ ·4H ₂ O		0.6 g
NaCl	1.0g	1.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g	
FeCl ₂ ·4H ₂ O		0.1g
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.1g
CoSO ₄ ·6H ₂ O	0.1g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1g	0.1g
ZnCl ₂		0.1g
ZnSO ₄	0.1g	
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.01g	
CuCl ₂ ·2 H ₂ O		0.01g
ALK(SO ₄) ₂	0.01g	
ALCl ₃		0.01g
H ₃ BO ₃	0.01g	0.01 g
NaMoO ₄ ·2 H ₂ O	0.01g	0.01 g

* Para evitar inhibición por la presencia de bacterias sulfato reductoras.

**Se disuelven 1.5g de ácido nitrilotriacético con KOH 10N ó 1N hasta pH 6.5.

La solución se prepara en aerobiosis. Después de adicionar todo, ajustar el pH a 7.0 con KOH 1N, almacenar en el refrigerador a 4°C.

SOLUCIÓN DILUIDA DE VITAMINAS DE BALCH

Volumen 1 litro:

Biotina (vitamina H)	2mg
Ácido p-aminobenzóico (PABA)	5mg
Cianocobalamina (vitamina B12)	0.1mg

Tiamina HCl (vitamina B1)	5.0mg
D.L. Pantotenato de Ca	5.0mg
Ácido nicotínico	5.0mg
Piridoxina - HCl (vitamina B6)	10.0mg
Acido fólico	2.0mg
Riboflavina (vitamina B2)	5.0mg
Ácido lipoico (thioico)	5.0mg

Esterilizar por filtración en membranas de 0.22mm en anaerobiosis

Almacenar protegido de la luz en refrigerador a 4°C.

Se preparan en frascos de 60mL con cambio de fase de N_2/CO_2 y estériles.

SOLUCIÓN MINERAL DE PEENNIG ET WIDDEL (SIN SULFATO)

Volumen 1 litro:

KH_2PO_4	0.2g
NH_4CL	0.5g
NaCl	1.2g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.15g
KCl	0.5g

SOLUCIÓN DE OLIGOELEMENTOS DE PFENNIG Y WIDDEL

(MODIFICADO)

Volumen 1 litro:

HCL a 25% (6.75N)*	10ml
--------------------	------

* Acidificar el hierro antes de disolverlo en el agua, los oligoelementos se disuelven en el siguiente orden:

$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	1.5g
H_3BO_3	60mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	100mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	120mg
$ZnCl_2$.anhidro	70mg

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15mg
AlCl_3 anhidro	50mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25mg
Na_2SeO_3	3mg

SOLUCIÓN DE VITAMINAS DE PFENNIG Y WIDDEL

Volumen 1 litro:

Biotina (vitamina H)	1mg
Acido para-Amino benzoico (PABA)	5mg
Cyanocobalamina (vitamina B_{12})	5mg
Thiamina, HCl	10mg
DL panthotenato de Ca	5mg
Acido nicotínico	5mg
Pyridoxamina (Pyridoxina HCl)	10mg

Nota: Esterilizar por filtración, en anaerobiosis. Almacenar a 4 °C y protegido de la luz.

SOLUCIÓN DE RESARZURINA (0.1%)

Volumen 50 ml:

Resarzurina	0.05g
-------------	-------

Se disuelven en 50 mL de agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente, proteger de la luz con papel aluminio

SOLUCIÓN DE SULFITO DE SODIO (2.0%)

Volumen 20ml:

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.4g
---	------

Se disuelven en 20mL de agua anóxica

Realizar el cambio de fase N_2/CO_2 y después esterilizar

Se almacena a temperatura ambiente

AGUA ANÓXICA

Se toma el volumen a preparar más un 10% de agua destilada, se hierve hasta evaporar el 10% en exceso, luego se enfría bajo atmósfera de nitrógeno.

Previamente se pesan los compuestos a diluir y se agrega la cantidad de agua anóxica necesaria, se realiza el cambio de fase N_2/CO_2 (80%- 20%) durante 1- 2 minutos y se lleva autoclave durante 15 minutos (121°C - 15 psi).

SOLUCIÓN DE CISTEÍNA - HCl (2.5% EN PESO)

Volumen 100ml:

Cisteína - HCl (sigma) 2.5g

Se disuelven en 100ml de agua anóxica

Realizar el cambio de fase N_2/CO_2 y después esterilizar.

Uso : 0.1ml/5ml.

SOLUCIÓN $NaHCO_3$ (10% EN PESO)

Volumen 50ml:

$NaHCO_3$ 5g

Se disuelven en 50ml de agua anóxica.

Realizar el cambio de fase N_2/CO_2 y después esterilizar.

Uso : 0.25ml/5ml.

SOLUCIÓN DE $NiCl_2$ (0.5G/l)

Volumen 50ml:

$NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025g

Se disuelven en 50ml de agua anóxica.

Se utiliza 1ml/litro de medio

SOLUCIÓN DE $FeSO_4$ (0.2%)

Volumen 50ml:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g

Se disuelven en 50ml de agua anóxica. solución fresca

Se utiliza 1ml/litro de medio

SOLUCIÓN DE AZUL DE BROMOTIMOL (1.0%)

Volumen 100ml:

Azul de bromotimol	1.0g
NaOH 1N	100ml

Se utiliza 1ml/litro de medio

SOLUCIÓN DE AGUA REDUCIDA

Volumen 1litro:

K_2HPO_4	0.3g
Solución mineral de Balch sin sulfato	50ml
Resarzurina	1ml

Se completa el volumen a un litro y agregar el 10% adicional de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando esté a temperatura ambiente agregar:

$NaHCO_3$	5g
Cisteína . HCl	0.5g

Servir según necesidad 4.5ml , 9.0ml ó 13.5ml en tubos Hungate, hacer cambio de fase N_2/CO_2 (80%- 20%) por un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos (121°C, 15lb/pulg²).

Antes de usar agregar:

$Na_2S \cdot 9H_2O$ (2%)	0.05ml/5ml
--------------------------	------------

ANEXO 2

RECuento TOTAL DE BACTERIAS

A. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se filtra la dilución del lodo seleccionada en un filtro nucleopore de $0.2\mu\text{m}$, las bacterias son retenidas por el filtro y son teñidas con una solución de naranja de acridina, con la luz de epifluorescencia se realiza el conteo directo del número de bacterias por retícula en un campo visual, este procedimiento se repite al menos tres veces, luego se promedia el resultado y extrapolando el promedio al área total del filtro.

B. REACTIVOS Y EQUIPOS

- Solución de Naranja de Acridina

Se prepara la solución A y B de la siguiente manera:

Solución A, disolver 2.76g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100ml de agua destilada

Solución B, disolver 3.56g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100ml de agua destilada

Se disuelven 100mg de Naranja de Acridina en 28.25ml de la solución A y 21.75ml de la solución B, completando el volumen de esta mezcla a 100ml .

- Filtros

Se requiere de filtros Millipore de $0.45\mu\text{m}$ para filtrar el agua de preparación de la Naranja de Acridina y el agua de lavado, la filtración de la muestra se realiza sobre un filtro Nucleopore de $0.2\mu\text{m}$; para realizar ambos procesos se utilizan soportes de filtración que se unen a un erlenmeyer donde se aplica vacío.

- Microscopio con luz de epifluorescencia

C. PROCEDIMIENTO

- Filtrar el agua de lavado en filtro Millipore de $0.45\mu\text{m}$
- Coloración de las bacterias con Naranja de Acridina
 - Colocar el filtro sobre la filtra del portafiltro con el lado brillante hacia arriba, armando el equipo de filtración.

- Tomar con jeringa 5ml de la dilución en estudio (generalmente 10^{-3} o 10^{-4}) purgando la jeringa con N_2 y agitando muy bien el tubo antes de tomar la muestra
- Agregar los 5ml de muestra por las paredes del tubo de carga del sistema de filtración, filtrar en presencia de vacío.
- Detener el vacío y agregar 1ml de la solución de Naranja de Acridina, dejar actuar el colorante durante 15 minutos en la oscuridad.
- Eliminar el colorante lavando profusamente en presencia de vacío.
- Retirar el filtro y colocarlo en una caja de petri, cubriéndola con papel aluminio para protegerla de la luz.
- Conteo
 - Dividir el filtro en cuatro partes iguales, montar un cuarto de filtro sobre un portaobjetos, agregando una gota de aceite de inmersión y colocando el cubreobjetos
 - La lectura se realiza con el objetivo 100X.
 - Se enciende la lámpara de epifluorescencia.
 - Se cuentan las bacterias presentes en la retícula, las bacterias se identifican porque tienen un color verde fluorescente, se repite el conteo en varios campos visuales y se promedia
 - El cálculo se realiza con la siguiente ecuación, teniendo en cuenta que la retícula del microscopio tiene un área de 0.0064mm^2 y el área del filtro es de 227mm^2 :

$$N. \text{Bact.}/gSSV = 35469 \times (\text{Promedio de los conteos}/\text{Dilución})/(5\text{ml} \times SSV \text{ del lodo})$$

ANEXO 3

RECuento DE LOS GRUPOS TRÓFICOS POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

A. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se realizan diluciones seriadas del lodo en estudio, con las diluciones seleccionadas se inoculan cinco tubos Hungate por dilución; se identifican los tubos positivos de acuerdo con las características de cada grupo bacterial (Tabla 5.6) realizando los cálculos del número más probable con base en la tabla 6.1

B. REACTIVOS Y EQUIPOS

- Medios de cultivo y agua reducida, según especificaciones del Anexo 1.
- Tubos Hungate
- Cámara de anaerobiosis para realizar la primera dilución
- Incubadora a 35°C.
- Cromatógrafo de gases para la detección de metano

C. PROCEDIMIENTO

- La muestra de lodo se introduce en la cámara de anaerobiosis para realizar la primera dilución, la muestra se homogeneiza utilizando un homogeneizador de tejidos estéril: se diluye 1ml de lodo homogeneizado en 9ml de agua reducida.
- Las diluciones seriadas se realizan fuera de la cámara de anaerobiosis, agregando 1ml de la dilución anterior a 9ml de agua reducida utilizando una jeringa purgada con nitrógeno previamente y trabajando con las normas de asepsia para evitar la contaminación de las diluciones.
- La inoculación de los tubos se realiza con jeringas, bajo flujo de nitrógeno, con los cuidados necesarios, para evitar la contaminación de los medios flamear tapones y trabajar cerca de la llama, los medios se inoculan con 0.2ml por tubo de la dilución correspondiente, se inocu-

lan cinco tubos por dilución, exceptuando los grupos de las bacterias sintróficas para los cuales se inoculan tres tubos y dos controles (sin sustrato) por dilución.

- La incubación se realiza a 35°C durante el periodo recomendado para cada grupo trófico (Tabla 5.6)
- El Número más Probable se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$NMP/gSSV = No. Bacterias (tabla 6.1) \times máxima dilución positiva \times 5000 / gSSV$$

Cálculo del NMP según Mac Grady para 5 tubos por dilución

Combinación de tubos positivos para tres diluciones consecutivas	Número de bacterias	Combinación de tubos positivos para tres diluciones consecutivas	Número de bacterias	Combinación de tubos positivos para tres diluciones consecutivas	Número de bacterias
000	0.0	231	1.4	451	5
001	0.2	240	1.4	500	2.5
002	0.4	300	0.8	501	3
010	0.2	301	1.1	502	4
011	0.4	302	1.4	503	6
012	0.6	310	1.1	504	7.5
020	0.4	311	1.4	510	3.5
021	0.6	312	1.7	511	4.5
030	0.6	313	2	513	8.5
100	0.2	320	1.4	520	5
101	0.4	321	1.7	521	7
102	0.6	322	2	522	9.5
103	0.8	330	1.7	523	12
110	0.4	331	2	524	15
111	0.6	340	2	525	17.5
112	0.8	341	2.5	530	8
120	0.6	400	1.3	531	11
121	0.8	401	1.7	532	14
122	1	402	2	533	17.5
130	0.8	403	2.5	534	20
131	1	410	1.7	535	25
140	1.1	411	2	540	13
200	0.5	412	2.5	541	17
201	0.7	420	2	542	25
203	1.2	421	2.5	543	30
210	0.7	422	23	544	35
211	0.9	430	2.5	545	45
212	1.2	431	3	550	25
220	0.9	432	4	551	35
221	1.2	440	3.5	552	60
222	1.4	441	4	553	90
230	1.2	450	4	554	160

ANEXO 4

PREPARACIÓN AZUL DE METILENO

COMPOSICIÓN:

- A. Tris (tris-(hydroxymethyl)-amonimethane), 60% en agua hervida (para mantener la alcalinidad del indicador)
- B. Glucosa(agente que se reduce) 4% en agua
- C. Azul de metileno, 0.02% en agua.

Se mezcla partes iguales de A, B y C a temperatura ambiente, el pH de la solución indicadora es de 12. El indicador debe ser protegido de la luz y almacenado en refrigeración Holdeman., *et al.*, 1977. La solución es utilizable por dos semanas (*Catálogo Cabina de Anaerobiosis 1025 Forma Scientific*).

Este libro se terminó de imprimir
en el mes de agosto de 2002

Universidad Nacional de Colombia
UNIBIBLOS
unibiblo@dnic.unal.edu.co

Bogotá, Colombia

Los autores conscientes de la importancia de la *Digestión Anaerobia* en el tratamiento de aguas residuales, han querido dar a los profesionales que trabajan en el área de tratamiento de aguas, un libro donde desde un punto de vista interdisciplinario, se consignan los fundamentos teóricos y algunas experiencias prácticas logradas en el manejo y la aplicación de esta tecnología.

Dado que no existe en el mercado un texto donde se consignan todos estos elementos, esperamos que éste pueda ser una guía importante para abordar esta temática, además de contribuir a una mejor aplicación de la misma en el país.

ISBN 958-701-196-1



9789587011968