

RESISTENCIA A LA EXPOSICIÓN AL OXÍGENO DE LODOS

ANAEROBIOS SUSPENDIDOS

Carlos Estrada-Vázquez, Hervé Macarie, Mario Takayuki Kato, Refugio Rodríguez-Vázquez y Héctor Mario Poggi-Varaldo*

RESUMEN

La tolerancia al oxígeno de una biomasa anaerobia suspendida en presencia o ausencia de un sustrato primario (sacarosa) se evaluó en términos de la recuperación de la actividad metanogénica acetilclástica específica (AME) de la biomasa anaerobia y un índice de inhibición 50% (II_{50}) asociado a la AME. Incubada en presencia de sacarosa, la biomasa anaerobia suspendida mostró

resistencia a la exposición al oxígeno; la recuperación de la AME fue >45% para $[O_2]$ iniciales <20% en el espacio gaseoso, y de 10 a 12% para $[O_2]$ iniciales >20% en el espacio gaseoso. Cuando fue incubada sin fuente de carbono, la biomasa suspendida fue mucho más inhibida después de la exposición al oxígeno para $[O_2]$ iniciales >20%. El efecto inhibitorio fue descrito por un II_{50}

Introducción

El tratamiento anaerobio metanogénico de aguas residuales municipales e industriales puede considerarse una tecnología establecida, tanto en países desarrollados como en algunos países subdesarrolla-

dos, particularmente con el advenimiento de los reactores de biomasa inmovilizada (Macarie, 2000; Monroy *et al.*, 2000; Ratusznei *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2000; Zaiat *et al.*, 2000; Frankin, 2001; Pérez *et al.*, 2001). Uno de los desprendimientos más interesantes del

tratamiento anaerobio convencional, consiste en el desarrollo de procesos biológicos de tratamiento de ambientes combinado, *i.e.*, con al menos dos aceptores de electrones presentes en el mismo reactor. Esta área ha recibido una considerable atención en los últimos

10 años (Guiot *et al.*, 1993; Field *et al.*, 1995; Lens *et al.*, 1995a; Zitomer y Shrout, 1997a; 1997b; Zitomer, 1998; Estrada *et al.*, 2000). Se ha publicado trabajos enfocados a diferentes ambientes combinados: metanogénico-aerobio (aceptores de electrones $CO_2/$

PALABRAS CLAVE / Actividad Metanogénica / Lodos Anaerobios Floculentos / Respiración Aerobia Heterótrofa /

Recibido: 23/07/2001. Modificado: 20/09/2001. Aceptado: 24/09/2001

Carlos Estrada-Vázquez. Ingeniero Bioquímico Industrial. Universidad Autónoma de México, Izta-palapa. M. en C. en Biotecnología, y Candidato a Doctor en Ciencias, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. CINVESTAV del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Grupo de Biotecnología Ambiental y Procesos Anaerobios, Apartado Postal 14-740, México D.F., 07000, México.

Hervé Macarie. Ingeniero Bioquímico y Doctor en Microbiología y Biología Celular, Universidad de Provenza, Marsella,

Francia. Investigador del Instituto De Investigación para el Desarrollo (IDR), Francia. Dirección: Laboratoire de Microbiologie IRD, Université de Provence et de la Méditerranée, ESIL case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, Francia.

Mario Takayuki Kato. Ingeniero Civil, Universidad Federal de Paraná. Diplomado en Administración de Empresas, Facultad Católica del Paraná. M.Sc., Escuela de Ingeniería de São Carlos, Universidad de São Paulo. Ph.D., Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda. Profesor

Investigador, Universidad Federal de Pernambuco, Brasil. Dirección: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Civil, Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n. 50740-530 Recife, Pernambuco, Brasil.

Refugio Rodríguez-Vázquez. Ingeniero Químico Industrial, ESIQIE-IPN, M. En C. en Química, CINVESTAV-IPN. Ph.D., Universidad Estatal de Colorado, EEUU. Profesora Investigadora Titular, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN.

* Héctor Mario Poggi-Varaldo. Ingeniero Químico, Universidad de la República Oriental del Uruguay. M. en Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México. Dr. en Ciencias, CINVESTAV-IPN. Profesor Investigador Titular, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN. Dirección: CINVESTAV del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Grupo de Biotecnología Ambiental y Procesos Anaerobios, Apartado Postal 14-740, México D. F., 07000, MEXICO. e-mail: hpoggi@mail.cinvestav.mx

elevado (28,6) en contraste con un bajo I_{50} (5,9) cuando se incubó en presencia de sacarosa. La tolerancia de la biomasa suspendida en este trabajo parece ser del mismo orden de la biomasa anaerobia inmovilizada (gránulos anaerobios) en condiciones de incubación en presencia de sustrato: los I_{50} fueron 5,9 para lodos anaerobios suspendidos (sacarosa) y 5,3 y 2,4 para lodos granulares incubados con acetato y etanol, respectivamente. La respiración aerobia heterótrofa de los lodos anaerobios floculentos incubados con sacarosa fue cerca de 4 veces mayor que la respiración basal, y la inhibición de la AME descrita por el I_{50} parece

seguir una relación inversa con la respiración aerobia heterótrofa. La relación inversa entre I_{50} y respiración aerobia heterótrofa se ajustó para datos de lodos granulares en la literatura y lodos floculentos de este trabajo, y sigue un modelo semi-empírico general, con un coeficiente de correlación de 0,82. Esta relación parece reforzar que uno de los mecanismos principales de protección de los consorcios anaerobios contra la inhibición por oxígeno es la respiración aerobia heterótrofa.

SUMMARY

Oxygen tolerance of anaerobic suspended cultures in the presence or absence of a primary degradable substrate (sucrose) was assessed in terms of the acetoclastic specific methanogenic activity (SMA) recovery of the cultures and an associated 50% inhibition index (I_{50}). The anaerobic suspended biomass, when incubated with sucrose, showed resistance to O_2 exposure. SMA recovery was >45% for initial $[O_2] < 20\%$ in the bottle headspace, and only 10%-12% for initial $[O_2] > 20\%$ in the bottle headspace. The suspended biomass was strongly inhibited after exposure to $[O_2] > 20\%$, when incubated without sucrose. The inhibitory effect was described by a high I_{50} of 28.6, in contrast to a low I_{50} of 5.9 under sucrose incubation. The resistance to oxygen exposure of the suspended sludge in this work seemed to be similar to that of anaerobic immobilized biomass (active anaerobic granules) under substrate incubation

conditions. The I_{50} were 5.9 for anaerobic suspended sludge incubated with sucrose, and 5.3 and 2.4 for granular sludge incubated with sodium acetate and ethanol, respectively. The aerobic heterotrophic respiration rate of the suspended sludge incubated with sucrose was almost 4-fold higher than the basal respiration, and the inhibition of the SMA described in terms of I_{50} seems to follow an inverse relationship with the aerobic respiration rate. A semi-empirical model depicting such an inverse relationship between I_{50} and respiration rate was fitted to pooled data of anaerobic granular sludges (from literature) and suspended sludge (this work) giving a general equation with a correlation coefficient of 0.82. These results strongly suggest that one of the main protective mechanisms of methanogenic consortia against oxygen exposure would be the aerobic heterotrophic respiration.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da concentração de O_2 no espaço gasoso de frascos sorológicos contendo biomassa anaeróbia suspensa, na presença de baixas concentrações de substrato primário (sacarose), sobre a tolerância de tal biomassa à exposição ao oxigênio. A tolerância foi avaliada em termos de recuperação da atividade metanogênica específica (AME) da biomassa anaeróbia e de um índice de inibição de 50% (I_{50}) associada à AME. A biomassa suspensa, quando incubada em presença de sacarose, mostrou uma significativa resistência à exposição ao oxigênio. A recuperação da AME foi superior a 45% para concentrações iniciais de oxigênio no espaço gasoso ($[O_2]_{i.e.g.} < 20\%$, e de apenas 10% a 12% para $[O_2]_{i.e.g.} > 20\%$. A biomassa suspensa foi fortemente inibida após a exposição ao oxigênio, quando incubada sem fonte de carbono, para $[O_2]_{i.e.g.} > 20\%$. Este efeito inibitório foi comprovado por um elevado valor de I_{50} (28,6), em contraste com um valor de apenas 5,9 para I_{50} quando a incubação ocorreu em presença da

sacarose. A tolerância da biomassa suspensa observada neste trabalho, parece ser da mesma ordem de grandeza à da biomassa imobilizada na forma de grânulos (dados de literatura), quando em presença de substrato: os valores de I_{50} foram 5,9 para lodos anaeróbios floculentos (sacarose), e 5,3 e 2,4 para lodos granulares incubados com acetato e etanol, respectivamente. A respiração aeróbia heterótrofa dos lodos anaeróbios floculentos incubados com sacarose foi cerca de 4 vezes maior que a respiração basal; e a inibição da atividade metanogênica, descrita pelo I_{50} , parece seguir uma relação inversa ao da respiração aeróbia heterótrofa. Esta relação inversa de I_{50} com a respiração aeróbia heterótrofa se ajustou tanto para os dados de literatura para lodos granulares, como para os dados obtidos neste trabalho com lodos floculentos, e segue-se um modelo semi-empírico geral. Esta relação parece reforçar a idéia de que um dos mecanismos principais de proteção de consórcios anaeróbios, contra a inibição por oxigênio, é a respiração aeróbia heterótrofa.

O_2 ; Kato *et al.* 1993a; Macarie y Guiot 1996), metanogénico-sulfato reductor (aceptores de electrones CO_2/SO_4^{2-} ; O'Flaherty *et al.*, 1998; Vidal-Alvarez *et al.*, 2000), metanogénico-desnitrificador (aceptores de electrones CO_2/NO_3^- ; Akunna *et al.*, 1992; Mosquera-Corral *et al.*, 2001), sulfatorreductor-aerobio (Lens *et al.*, 1995b) y recientemente sobre sulfato reducción-desnitrificación

(aceptores de electrones SO_4^{2-}/NO_3^- ; Kim y Son 2000).

El ambiente combinado metanogénico-aerobio parece ser muy promisorio para el tratamiento y pulido de aguas residuales diluidas convencionales, efluentes tóxicos (Tan y Field, 2000) y remediación de acuíferos (Estrada-Vázquez *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los consorcios metanogénicos anaerobios tienen una conside-

rable resistencia a la exposición al oxígeno. Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones se ha concentrado sobre el estudio de la tolerancia al oxígeno de biomasa anaerobia inmovilizada como son los gránulos anaerobios de reactores tipo manto de lodos [UASB por la sigla inglesa de *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*] (Kato *et al.*, 1993a; Macarie y Guiot, 1996; Shen y Guiot,

1996) y biopartículas de reactores de lecho fluidizado (Zitomer y Shrout, 2000). Por otro lado, se sabe menos sobre el potencial de lodos o biomasa anaerobia suspendida para soportar la exposición al oxígeno, así como el efecto de un sustrato primario (fácilmente degradable) sobre dicha resistencia. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la concentración de

O₂ en el espacio gaseoso de cultivos en lote de biomasa anaerobia suspendida y la adición de sacarosa a bajas concentraciones sobre la tolerancia de estos cultivos a la exposición a oxígeno. La tolerancia fue evaluada en términos de la recuperación de la actividad metanogénica específica (AME) de los cultivos y de un índice de inhibición (II₅₀) asociado a esta recuperación.

Materiales y Métodos

Lodo anaerobio suspendido

La biomasa utilizada en las pruebas provino de una serie de digestores anaerobios de mezcla completa de 2,5 l de volumen útil inoculados inicialmente con una mezcla de inóculos no anaerobios, un tercio en peso de cada uno de excreta vacuna, suelo y lodos activados (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997a). Estos reactores operados a 35°C, un tiempo de residencia hidráulica de 25 días y una carga orgánica de 0,9 g DQO/l d (DQO: Demanda Química de Oxígeno) eran alimentados con un agua residual sintética de composición siguiente en g/l: sacarosa 17,5; ácido acético glacial 1,5; NH₄Cl 1,5; K₂HPO₄ 3,5; FeSO₄·7H₂O 0,2; y 1 ml/g DQO de una solución de oligoelementos (en g/l: EDTA-Na₂H₂O 0,5; FeCl₂·4H₂O 2,0; NiCl₂·6H₂O 0,1; CoCl₂·6H₂O 0,15; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,05; ZnCl₂ 0,06; CuCl₂·2H₂O 0,04; AlCl₃ 0,03; MnCl₂·4H₂O 0,03). Además se suplementó el agua residual sintética con NaHCO₃ comercial y Na₂CO₃ para proveer alcalinidad y amortiguarlo a un pH cercano a la neutralidad. Al momento del muestreo, los reactores presentaban una remoción de DQO superior a 95%, y una producción de metano así como un pH estables, indicando que habían alcanzado un estado estacionario.

Ensayos de toxicidad al oxígeno

La prueba de toxicidad fue realizada en botellas serológicas

cas de 160 ml siguiendo un procedimiento en dos fases similar al descrito por Kato *et al.* (1993a). La primera fase consistió en poner la biomasa en contacto con oxígeno (con y sin sacarosa) durante 3 días y la segunda fase en medir su actividad metanogénica acetoclástica específica (AME) remanente.

Se aplicó un diseño experimental factorial con dos factores: la concentración inicial de oxígeno en el espacio gaseoso de las botellas ([O₂]_{i, e.g.}) a seis niveles (0, 5, 10, 20, 50, 70% v/v) y la fuente de carbono a dos niveles (1 g DQO/l de sacarosa y sin sacarosa). Las variables de respuesta fueron la recuperación (R) de la actividad metanogénica y el índice de inhibición media (II₅₀). R se definió como

$$R = (AME_f / AME_i) \cdot 100 \quad (1)$$

donde AME_f: actividad metanogénica acetoclástica específica de los cultivos después de 3 días de incubación expuestos a concentraciones variables de oxígeno; AME_i: actividad metanogénica acetoclástica específica de los cultivos después de 3 días de incubación en condiciones anaerobias en presencia o no de 1 g DQO/l de sacarosa (control).

La concentración de inhibición media IC₅₀, la cual corresponde a la concentración de oxígeno inicial en el espacio gaseoso ([O₂]_{i, e.g.}) que reduce la actividad metanogénica específica de los cultivos a la mitad de la correspondiente del control anaerobio estricto, se obtuvo por interpolación en las gráficas de R vs. [O₂]_{i, e.g.}. Dado que el valor de IC₅₀ tiene una relación inversa con la inhibición provocada por la exposición al oxígeno se expresó el resultado numérico en términos de un índice de inhibición II₅₀, basado en el IC₅₀ (Campos-Velarde *et al.* 1997):

$$II_{50} = 100 / IC_{50} \quad (2)$$

El II₅₀ sigue una relación directa con la inhibición, p.e.,

a valores altos de II₅₀ será fuerte el efecto inhibitorio del tóxico. Esta relación se puede considerar análoga al concepto de unidades de toxicidad (TU).

De manera más detallada, el ensayo de exposición al oxígeno consistió en colocar en las botellas serológicas, bajo condiciones anóxicas (en cabina anóxica), 60 ml de una mezcla de la biomasa de los digestores inoculadores con una solución de minerales (modificado de Owen *et al.*, 1979), mezcla que tenía una concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) del orden de 1,2 g/l. Las botellas que debían ser incubadas con sustrato fueron adicionadas con 1 ml de una solución stock de sacarosa con lo que se logró una concentración de 1 g DQO-sacarosa/l en la botella. La concentración de oxígeno en el espacio gaseoso de las botellas se fijó por inyecciones controladas de O₂ (grado cromatográfico). Las botellas fueron luego incubadas a 35°C y 80 rpm, en oscuridad, por 3 días. Se determinó el contenido de O₂, CH₄ y CO₂ en su espacio gaseoso cada 24 horas. La (DQO) filtrada del sobrenadante se determinó al inicio y final del periodo de incubación.

Después de los tres días de contacto de la biomasa con O₂, su actividad metanogénica acetoclástica remanente fue determinada según Sørensen y Ahring (1993). Para esto, se cambió el medio líquido por un medio que contenía acetato de sodio 30 mM y solución de minerales, y se cambió la atmósfera de cada botella por N₂. Las botellas fueron incubadas durante 1 día a la misma temperatura y condiciones de agitación que para la fase de exposición al O₂. La prueba consistió en seguir la producción de metano con respecto al tiempo y el contenido de SSV de cada botella al final del experimento.

Los perfiles de concentración de O₂ y de CH₄ obtenidos durante las 2 fases del experimento y la concentración final de SSV fueron em-

pleados para calcular la velocidad inicial específica de consumo de O₂ (p) de la biomasa o respiración aerobia heterotrófica, y la actividad metanogénica. La p fue correlacionada con una concentración total de oxígeno inicial en la botella (C_{O₂}) la cual fue calculada considerando el O₂ total como si estuviera disuelto en la fase líquida, es decir, el O₂ inicial en el espacio gaseoso más el O₂ disuelto en la fase líquida, todo dividido entre el volumen de la fase líquida (Kato *et al.*, 1993a). En esta cinética se tomaron en cuenta todas las concentraciones iniciales de O₂ en el espacio gaseoso (0, 5, 10, 20, 50 y 70%). Todas las pruebas fueron realizadas en cuadruplicado.

Análisis

La demanda química de oxígeno (DQO), los sólidos suspendidos volátiles (SSV), el oxígeno disuelto (OD) y el pH fueron determinados según APHA-AWWA-WPCF (1981). El O₂, CO₂ y CH₄ en el espacio gaseoso de las botellas fueron determinados por cromatografía de gases con detector de conductividad térmica (CG-DCT) (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997b). Para la determinación de contenido de O₂ se utilizó un cromatógrafo Gow Mac Series 580 DCT (Gow Mac Instrument Co., Bridgewater, NJ., USA.) y las condiciones fueron: temperatura del detector, 103°C; temperatura de la columna, 35°C; columna CTR-1 (All Tech); corriente, 125 mA; flujo del gas acarreador, 55 ml Helio/min; volumen de la muestra, 0,5 ml. Para la determinación de CH₄ y CO₂ se usó un cromatógrafo Gow Mac Series 350 DCT y las condiciones fueron: temperatura del detector, 200°C; temperatura del inyector, 150°C; temperatura de la columna 100°C; columna de acero inoxidable empacada con Carboxsphere; corriente, 160 mA; flujo del gas acarreador, 30 ml Helio/min; volumen de la muestra, 0,5 ml.

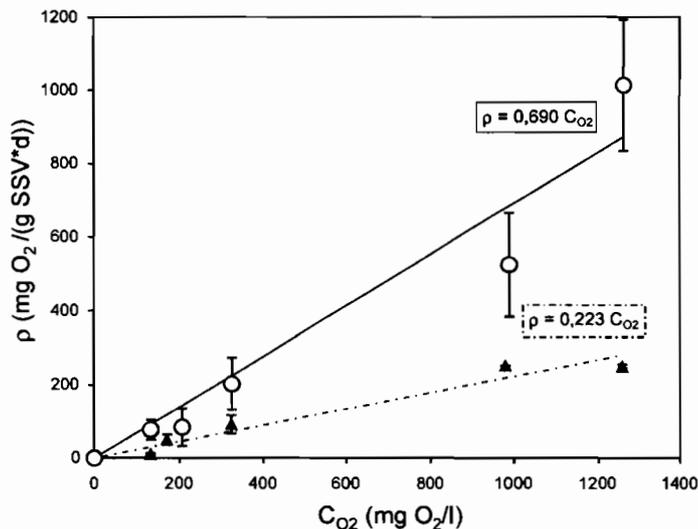


Figura 1. Cinética de consumo de oxígeno de lodos anaerobios de digestor de mezcla completa. Círculos: en presencia de 1g DQO-sacarosa/l. Triángulos: respiración basal. C_{O_2} : Concentración total equivalente de O_2 en las botellas. ρ : Tasa de respiración aerobia heterotrofa máxima específica.

Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestra cómo evoluciona la velocidad de consumo de oxígeno de los lodos anaerobios expuestos a diferentes condiciones iniciales de oxígeno. Se observa que, cualquiera que sea el valor de $[O_2]_i$, e.g., esta velocidad es mayor por un factor promedio de 3,7 cuando el experimento se llevó a cabo en presencia de sustrato en el medio, en vez de su ausencia. Esta respuesta sería esperable tomando en consideración que la primera serie tiene un donador de electrones (la sacarosa) que estimula la respiración aerobia heterótrofa, mientras que la segunda serie expresa su respiración basal.

Las cinéticas de respiración parecen ser de primer orden en concentración de oxígeno y muestran una correlación razonablemente buena (coeficientes de determinación de 0,934 y 0,955 con y sin sacarosa respectivamente). Apparently los cultivos en ambas condiciones de incubación no llegan a saturación. Esto se podría explicar en términos de una cinética de tipo interactiva en concentración de sustrato y de oxígeno (Grady *et al.*, 1999):

$$\rho = k_s \frac{S}{(K_s + S)} k_c \frac{C}{(K_c + C)} \quad (3)$$

donde k_s : velocidad máxima específica de consumo de la fuente de carbono y energía; K_s : constante de afinidad de la fuente de carbono y energía; k_c : velocidad máxima específica de consumo de oxígeno; K_c : constante de afinidad para el oxígeno; y S y C son las concentraciones de la fuente de carbono y de oxígeno respectivamente.

Sin embargo, también pudiera deberse a una limitación del consumo de oxígeno por transferencia de masa desde la fase gaseosa a la fase líquida, la cual sigue una cinética de primer orden (Bailey y Ollis, 1986). Esto último es discuti-

ble porque los ensayos se realizaron en condiciones similares de agitación a las de Kato *et al.* (1993a; 1993b), quienes no reportaron limitaciones en la transferencia de oxígeno y además encontraron cinéticas de consumo de oxígeno de tipo Michaelis-Menten (hiperbólicas). Más aún, si la respiración estuviera limitada por transferencia de masa, las ρ deberían haber sido iguales para los lodos anaerobios incubados con y sin sacarosa, y no es así (Figura 1).

Puede observarse en la Tabla I que la tasa máxima específica de respiración de los lodos anaerobios cultivados en presencia de sacarosa de este trabajo es comparable a las de lodos activados (proceso aerobio, Ramalho, 1977) y a la de lodos granulares anaero-

TABLA I
TASAS DE RESPIRACIÓN DE DIFERENTES CONSORCIOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS

Tasa máxima de respiración ^a	Tipo de biomasa	Observaciones	Ref.
10813	Lodos granulares anaerobios de gran actividad (Nedalco)	Reactor comercial; TRC ^b NR ^c Gránulos incubados con 1g DQO-etanol/l; cinética Michaelis-Menten	1
1293	Lodos granulares anaerobios de actividad baja-moderada (Latenstein)	Reactor comercial Ibidem	1
743	Lodos granulares anaerobios de actividad baja (Bennekorn)	Reactor comercial Ibidem	1
269 a 1298 típico: 640	Lodos activados	Reactores de laboratorio, TRC=9 d, Agua residual Municipal, 300mg DBO ₅ /l, cinética orden cero	2
230-324	Biopelícula de filtro percolador	Reactores comerciales, TRC NR, Aprox 30mg/l DBO ₅	3
245	Biopelícula de biodisco aerobio	Reactor comercial, TRC NR Aprox 30mg/l DBO ₅	3
150	Biopartículas de lecho fluidizado aerobio	Reactor de laboratorio, TRC > 30 d Biopartículas ensayadas con agua sintética (150mg glucosa + 150mg ácido glutámico)/l, Cinética orden cero	4
33	Biopartículas de lecho fluidizado aerobio	Reactor de laboratorio, TRC > 30 d Biopartículas ensayadas en efluente anaerobio, aprox 10mg DBO ₅ /l, Cinética orden cero	4
1050	Lodos anaerobios suspendidos	Reactor de laboratorio 1g DQO-sacarosa/l; 25 d TRC cinética de primer orden	5

Notas: ^a mg O_2 /(gSSV·d), ^b TRC: Tiempo de retención celular o de sólidos; ^c NR: No Reportado; 1 Kato *et al.* (1993a); 2 Ramalho (1977); 3 Lens *et al.* (1995b); 4 Campos-Velarde *et al.* (1997); 5 Este trabajo.

bios de actividad moderada baja (Kato *et al.*, 1993a), y significativamente superior a las de biomasa aerobia de filtros percoladores y biodiscos aerobios (Lens *et al.*, 1995a), así como de biopartículas de un lecho fluidizado aerobio dedicado al postratamiento de un efluente anaerobio (Campos-Velarde *et al.*, 1997). En este último caso, la baja tasa respiratoria reportada pudiera deberse a la baja concentración de sustrato remanente alimentada al reactor y al largo tiempo de retención celular en el reactor de lecho fluidizado aerobio (Campos-Velarde *et al.*, 1997).

Sin embargo, la respiración de los lodos anaerobios suspendidos de nuestro experimento resultó ser 90% menor que la correspondiente a la de lodos anaerobios granulares de gran actividad provenientes de un reactor UASB a escala comercial que trata vinazas (Kato *et al.*, 1993a).

La Figura 2 muestra la recuperación (R, ecuación 1) de la AME después de la exposición al oxígeno de lodos anaerobios floculentos y de gránulos anaerobios de un reactor UASB tratando efluentes de destilería (lodo granular Nedalco, Kato *et al.*, 1993a). Comparando las dos curvas para lodos anaerobios suspendidos (cuadrados, con sacarosa; círculos, sin sacarosa), se aprecia que el efecto de la sacarosa como sustrato primario en la incubación fue un factor importante para promover resistencia a la exposición al oxígeno. R estuvo en el rango de 45% a 60% para $[O_2]_{i, e.g.} < 20\%$, mientras que para $[O_2]_{i, e.g.} > 20\%$ R tuvo valores entre 10 a 12%. Los lodos anaerobios floculentos incubados sin sacarosa mostraron una recuperación de sólo 25 a 30% para $[O_2]_{i, e.g.} < 20\%$, mientras que no mostró recuperación para $[O_2]_{i, e.g.} > 20\%$.

Estos resultados sugieren que las bacterias metanogénicas de los consorcios anaerobios usados en este trabajo pueden tener una baja resistencia intrínseca al oxígeno, y que cuando la resistencia au-

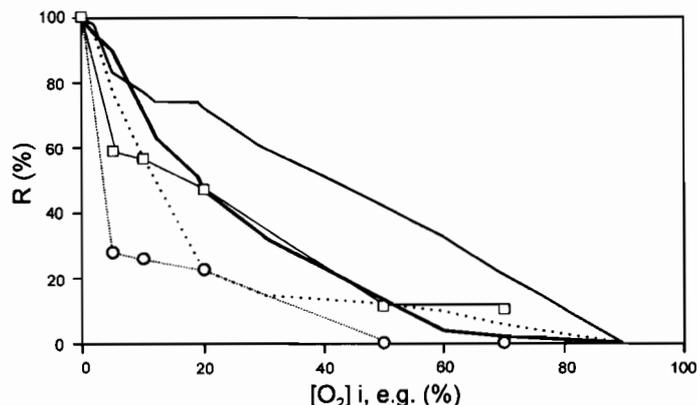


Figura 2. Recuperación (R) de la actividad metanogénica específica aceticláctica de lodos anaerobios después de incubación con 1g DQO-sacarosa/l (cuadrados), sin sacarosa (círculos); y gránulos de reactores UASB (de Kato *et al.* 1993a) después de incubación con 1g DQO-etanol/l (línea continua fina), 1g DQO-acetato/l (línea continua gruesa) o sin sustrato (línea punteada).

menta puede deberse principalmente a la protección ejercida por las bacterias facultativas que reducen la concentración de oxígeno disuelto vía metabolización de la sacarosa agregada al medio, es decir, vía respiración aerobia heterótrofa (Macarie y Guiot, 1996; Kato *et al.*, 1993a y b). La protección vía un efecto de barrera física (típica en el caso de biomasa inmovilizada y que contribuye a la formación de gradientes de O_2 y micronichos anóxicos) parece ser poco significativa para los lodos suspendidos de este trabajo. Los perfiles de consumo de oxígeno por botella (resultados no presentados aquí) mostraron que para concentraciones menores o iguales a 20% de oxígeno inicial en el espacio gaseoso la desaparición del O_2 fue completa al segundo día de incubación en presencia de sacarosa. Esto implica que la biomasa suspendida estuvo menos expuesta al efecto tóxico del oxígeno. Por consiguiente las recuperaciones (R) obtenidas para estas botellas correlacionan bien con los perfiles de consumo de oxígeno durante la incubación.

Los IC_{50} interpolados para cada curva en la Figura 2 se usaron para calcular los II_{50} (ecuación 2), que se presentan en la Tabla II.

Bajo condiciones de ausencia de sacarosa, el efecto inhibitorio del oxígeno sobre la biomasa suspendida fue casi 5 veces más alta que para condiciones de incubación con sacarosa (II_{50} de 28,6 y 5,9 respectivamente, con un incremento de 380%); esto es, la resistencia al oxígeno se redujo drásticamente. La tolerancia al oxígeno de la biomasa suspendida es del mismo orden que para los gránulos, cuando son incubados con sacarosa y acetato, respectivamente (II_{50} de 5,9 y 5,3), aunque los gránulos cultivados con etanol manifiestan aún una mayor resistencia al oxígeno (II_{50} de 2,4). En contraste, bajo condiciones de incu-

bación sin sustrato, la biomasa suspendida fue mucho más inhibida que los gránulos (II_{50} de 28,6 y 8,0 respectivamente, con un incremento de 260% en la inhibición). Más aun, el efecto inhibitorio del oxígeno sobre los gránulos, comparando condiciones de incubación con sustrato (acetato) y sin sustrato, se incrementó en sólo aproximadamente 61% (y un incremento de 135% considerando gránulos cultivados en etanol), sugiriendo que los gránulos tienen una probable protección adicional por una barrera física a la penetración de oxígeno bajo condiciones de ausencia de sustrato como se mencionó arriba (Field *et al.*, 1995). Esta protección física parece no ser importante en el caso de lodos floculentos, pues la inhibición en ausencia de sustrato fue muy alta (II_{50} de 28,6), y tiene sentido dado que la difusión de oxígeno en biopelícula es mucho más lenta y de menor alcance, entre 10 y 100 μm de profundidad (Rebsvech *et al.*, 1989) que la difusión de oxígeno en flóculos biológicos.

Por otro lado, comparando la Figura 1 con la Tabla II se aprecia que en tanto la tasa específica de consumo de oxígeno de lodos floculentos aumenta con la presencia de sacarosa el índice de inhibición disminuye para las mismas condiciones. En otras palabras, con la presencia de sustrato primario la respiración

TABLA II
INDICE DE INHIBICIÓN II_{50} A LA EXPOSICIÓN AL OXÍGENO DE BIOMASA ANAEROBIA

Incubación	Biomasa anaerobia	
	Lodos suspendidos ^a	Gránulos ^b
Con sustrato	5,9 ^c	5,3 ^d 2,4 ^e
Sin sustrato	28,6	8,0 8,0

^a: Lodos de un digestor anaerobio de mezcla completa, mesofílico, operado a un tiempo de residencia hidráulico de 25 d. ^b: Gránulos anaerobios de un reactor comercial UASB tratando efluentes de destilería (lodo Nedalco, Kato *et al.*, 1993a). ^c: Al final de la incubación con 1g/l sacarosa-DQO. ^d: Al final de la incubación con 1g/l acetato-DQO (Kato *et al.*, 1993a). ^e: Al final de la incubación con 1g/l etanol-DQO (Kato *et al.*, 1993a).

es mayor en tanto que disminuye el efecto inhibitorio del oxígeno al que fueron expuestos los lodos anaerobios de este trabajo, añadiendo sustento a la protección de la metanogénesis via respiración aerobia heterótrofa, encontrado por otros investigadores (Guiot *et al.* 1992; Field *et al.*, 1995; Shen y Guiot, 1996).

Si bien lo que sigue debe tomarse con cautela, la tasa de respiración de los lodos anaerobios floculentos parece seguir una relación inversa con los Π_{50} esto es:

$$\frac{\rho_{CS}}{\rho_{SS}} = \frac{1050}{250} = 4,02; \dots \frac{\Pi_{50SS}}{\Pi_{50CS}} = \frac{28,6}{5,9} = 4,85 \quad (4)$$

donde cs: con sacarosa, y ss: sin sacarosa.

La ecuación 4 parece sugerir la existencia de una relación más general de tipo inverso entre la respiración aerobia heterótrofa y la inhibición por exposición al oxígeno de los consorcios anaerobios. Para evaluar esta idea, se tomó los resultados reportados para diversos lodos suspendidos (Kato *et al.*, 1993a) y los resultados experimentales de este trabajo para lodos floculentos, y se postuló un modelo inverso entre Π_{50} y la tasa de respiración máxima aerobia heterótrofa ρ (resultados con y sin sustrato) de tipo

$$\Pi_{50} = a \cdot \rho^n + b \quad (5)$$

donde a , n y b son parámetros empíricos, con $n < 0$ y cercano a -1 .

Se aplicó este modelo por medio de regresiones logarítmicas $\text{Ln}(\Pi_{50})$ vs $\text{Ln}(\rho)$ a los datos de lodos granulares solos (Kato *et al.*, 1993a) y a los datos anteriores más los resultados de lodos anaerobios suspendidos, y se obtuvo ecuaciones con parámetros muy similares y con coeficientes de correlación de 0,80 ($P < 0,039$) y 0,82 ($P < 0,0073$) respectivamente:

$$\Pi_{50} = 4,011\rho^{-0.680} + 2,20 \quad (6a)$$

para datos de lodos granulares solamente, y

$$\Pi_{50} = 4,495\rho^{-0.763} + 2,20 \quad (6b)$$

para datos de lodos granulares más datos de lodos floculentos.

El ajuste de dichas ecuaciones se muestra en la Figura 3, y puede concluirse que fue muy bueno dada la diversidad de tipos de lodos y de tipos de sustratos. Estos resultados parecen reforzar la idea de que uno de los mecanismos principales de protección de consorcios anaerobios contra la inhibición por oxígeno es la respiración aerobia heterótrofa (Field *et al.*, 1995).

Conclusiones

- Los lodos anaerobios suspendidos, cuando se incubaron con sacarosa, mostraron una importante resistencia a la exposición al oxígeno. Las recuperaciones de la actividad metanogénica específica estuvieron en el rango de 45% a 60% para $[\text{O}_2]_{i.e.g.} < 20\%$ en el espacio gaseoso de las botellas, y entre 10% a 12% para $[\text{O}_2]_{i.e.g.} > 20\%$.

- Los lodos suspendidos resultaron fuertemente inhibidos después de la exposición al oxígeno cuando se incubaron en condiciones de ausencia de sacarosa. El efecto inhibitorio está descrito por un valor muy alto para Π_{50} de 28,6 mientras que, en contraste, hay un bajo valor para Π_{50} de 5,9 bajo condiciones de incubación con sacarosa.

- La resistencia al oxígeno de los lodos anaerobios en este trabajo parece ser similar a la de la biomasa anaerobia inmovilizada (gránulos anaerobios activos, datos tomados de literatura) bajo condiciones de incubación con sustrato. Los Π_{50} fueron 5,9 para lodos suspendidos incubados con sacarosa, y de 5,3 y 2,4 para

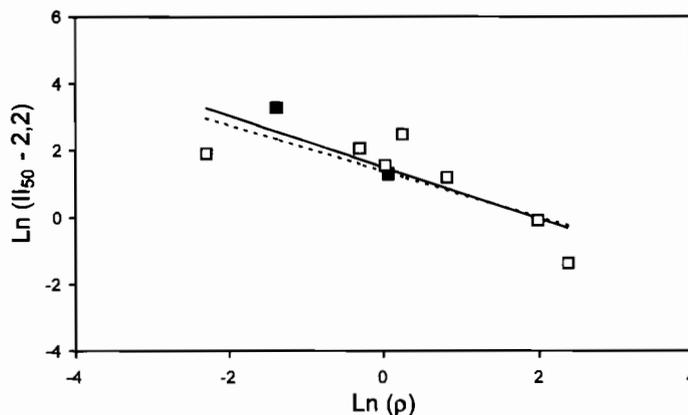


Figura 3. Relación entre el índice de inhibición Π_{50} y la tasa máxima de respiración específica de lodos anaerobios. Cuadrados vacíos: lodos granulares (Kato *et al.*, 1993a). Cuadrados negros: lodos floculentos; línea llena: regresión con todos los puntos (ecuación 6a en el texto). Línea punteada: regresión con resultados de lodos granulares solamente (ecuación 6b en el texto).

lodos granulares con acetato y etanol, respectivamente

- La respiración aerobia heterótrofa de los lodos anaerobios suspendidos incubados con sacarosa fue cerca de 4 veces mayor que la correspondiente a la respiración basal, y la inhibición de actividad metanogénica descrita por Π_{50} parece seguir una relación inversa con la respiración aerobia heterótrofa.

- La relación inversa entre Π_{50} y respiración aerobia heterótrofa se ajustó para datos de lodos granulares de literatura y lodos suspendidos de este trabajo y parece seguir un modelo semi-empírico general, descrito por la ecuación 6b. Esta relación parece reforzar la idea de que uno de los mecanismos principales de protección de consorcios anaerobios contra la inhibición por oxígeno es la respiración aerobia heterótrofa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica de Elvira Ríos Leal y Cirino Rojas (Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN) con los análisis de cromatografía de gases, el apoyo económico concedido por el CONACYT (beca para estudios de doctorado para CE-V), y por el CINVESTAV-IPN, el préstamo de material por parte

del IRD-Francia, a Fernando Esparza-García y Jaime García-Mena por sus comentarios y valiosas sugerencias sobre el diseño experimental de este trabajo, y a J. Angel Báez-Limón, por su ayuda con los ensayos de actividad metanogénica.

REFERENCIAS

- Akunna JC, Bizeau C, Moletta R (1992) Denitrification in anaerobic digesters: possibilities and influence of wastewater COD/NOx ratio. *Environmental Technol.* 13: 825-836.
- APHA-AWWA-WPCF (1981) *Standard methods for the examination of waters and wastewaters*. APHA-AWWA-WPCF. 15th edition. Washington, DC. USA.
- Bailey JE, Ollis DF (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals* 2nd Edition. McGraw-Hill. Singapore. pp 459-467.
- Campos-Velarde D, Poggi-Valardo H M, Ríos-Leal E, López-Mercado V, Fernández-Villagómez G (1997) Chlorophenol and phenol contaminated water treatment in biological fluidized beds. En Leeson A, Alleman BC (Eds.) *In situ and On site Bioremediation Vol. 3*. Battelle Press. Columbus, OH. USA. pp. 273-278.
- Estrada-Vázquez C, Poggi-Valardo HM, Macarie H, Kato M (2000) Biological reactors of combined environments and their potential for bioremediation of groundwaters. *Proc. 2nd Cong. Mexican Soc. for Remediation of Soils and Waters-SORESCA*. Puebla, Pue., México. (CD-ROM).

- Field JA, Stams AJM, Kato M, Schraa G (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 47-77.
- Frankin J (2001) Full scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater. *Proc. Farewell Seminar of Prof. Gatzke Lettinga, Anaerobic Digestion for Sustainable Development*, Wageningen, 29-30 March 2001. pp. 2-8.
- Grady Jr CPL, Daigger GT, Lim HC (1999) *Biological Wastewater Treatment*. 2nd Edition. Marcel Dekker. New York, USA. 85 pp.
- Guiot SR, Pauss A, Costerton JW (1992) A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Sci. Tech.* 25(7): 1-10.
- Guiot SR, Frigon JC, Darrah B, Landry MF, Macarie H (1993) Coupled aerobic and anaerobic treatment of toxic wastewaters. *Proc. 7th. Forum Applied Biotechnology* 58(4a): 1761-1769. Gent, Belgium. 30/9-1/10/93.
- Kato M, Field JA, Lettinga G (1993a) High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 1360-1366.
- Kato M, Field JA, Lettinga G (1993b) Methanogenesis in granular sludge exposed to oxygen. *FEMS Microbiol. Letters* 114: 317-324.
- Kim IS, Son JH (2000) Impact of COD/N/S ratio on denitrification by the mixed cultures of sulfate reducing bacteria and sulfur denitrifying bacteria. *Water Sci. Technol.* 42(3-4): 69-76.
- Lens P, De Poorter MP, Cronenberg CC, Verstraete WM (1995a) Sulfate-reducing and methane-producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. *Water Res.* 29: 871-880.
- Lens P, Massone A, Rozzi A, Verstraete WM (1995b) Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed film biofilm reactor. *Water Res.* 29: 857-870.
- Macarie H (2000) Overview of the application of anaerobic treatment to chemical and petrochemical wastewaters. *Water Sci. Technol.* 42(5-6): 201-213.
- Macarie H, Guiot S (1996) Pentachlorophenol degradation using a simultaneous anaerobic-aerobic process: a new technology for wastewater treatment. En Galindo E (Ed.) *Frontiers of Biotechnology and Bioengineering*. Mex. Soc. Biotechnol. Bioeng. (SMBB). México DF, México. pp. 317-324.
- Monroy O, Famá G, Meraz M, Montoya L, Macarie H (2000) Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. *Water Res.* 34: 1803-1816.
- Mosquera-Corral A, Sánchez M, Campos JL, Méndez R, Lema JM (2001) Simultaneous methanogenesis and denitrification of pre-treated effluents from a fish canning industry. *Water Res.* 35: 411-418.
- O'Flaherty V, Lens P, Leahy B, Colleran E (1998) Long term competition between sulphate reducing and methane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. *Water Res.* 32: 815-825.
- Owen WF, Stuckey DC, Healy JB, Young LB, McCarty P (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13: 485-492.
- Pérez M, Romero LI, Sales D (2001) Organic matter degradation kinetics in an anaerobic thermophilic fluidised bed bioreactor. *Anaerobe* 7: 25-35.
- Poggi-Valardo HM, Valdés L, Fernández-Villagómez G, Esparza-García F (1997a) Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids, and municipal solid waste. *Water Sci. Technol.* 35(2-3): 197-204.
- Poggi-Valardo HM, Rodríguez-Vázquez R, Fernández-Villagómez G, Esparza-García F (1997b) Inhibition of mesophilic solid substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 284-291.
- Ramalho R S (1977) *Introduction To Wastewater Treatment Processes*. Academic Press, New York. USA. 199 pp.
- Ratusznei SM, Rodrigues JAD, Camargo EFM, Zaiat M, Borzani R (2000) Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. *Bioresources. Technol.* 75: 127-132.
- Revsbech NP, Christensen PB, Nielsen LP, Svrensen J (1989) Denitrification in a trickling filter biofilm studied by a microsensor for oxygen and nitrous oxide. *Water Res.* 23: 867-871.
- Shen CF, Guiot SR (1996) Long-term impact of dissolved O₂ on the activity of anaerobic granules. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 611-620.
- Sørensen AH, Ahring BK (1993) Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 427-431.
- Tan NCG, Field JA (2000) Biodegradation of sulfonated aromatic compounds. En Lens P, Hulshoff-Pol L (Eds.) *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: Principles and Engineering*. IWA Publishing. London, U.K. pp. 377-392.
- Vidal-Alvarez R, Aspé E, Urrutia H (2000) Colonization of supports by methanogenic and sulfate reducing bacteria in anaerobic filter-type reactors. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44: 177-180.
- Vidal G, Carvalho A, Méndez R, Lema JM (2000) Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresources Technol.* 74: 231-239.
- Zaiat M, Passig FH, Foresti E (2000) Treatment of domestic sewage in horizontal flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor. *Environmental. Technol.* 21: 1139-1145.
- Zitomer DH (1998) Stoichiometry of combined aerobic and methanogenic COD transformation. *Water Res.* 32: 669-676.
- Zitomer DH, Shroul JD (1997a) Kinetics of COD biotransformation under methanogenic, limited-aeration conditions. *Proc. WEFTEC'97 Water Environment Federation 70th. Annual Conference and Exposition*. Chicago, IL. October 18-22. 1: 53-56.
- Zitomer DH, Shroul JD (1997b) Feasibility and benefits of methanogenesis under oxygen-limited conditions. *Proc. 52nd Annual Purdue Industrial Waste Conference*. West Lafayette, IN, USA. pp. 348-354.
- Zitomer DH, Shroul JD (2000) High sulfate, high chemical oxygen demand wastewater treatment using aerated methanogenic fluidized beds. *Water Environ. Res.* 72: 90-97.