

ACTIVIDADES METANOGENICAS DE LODOS GRANULARES DE UN
DIGESTOR DE LECHO DE LODOS

J.P. GUYOT*(1), A. NOYOLA (2), F. RAMIREZ y O. MONROY

Departamento de Biotecnología, C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Apdo. Postal 55-535. Av. Michoacán y Purísima

Col. Vicentina, 09340 México, D.F.

- (1) ORSTOM: Instituto Francés de Investigación Científica
para el desarrollo en Cooperación.
(2) Adscripción actual: Instituto de Ingeniería - UNAM.

RESUMEN

Se calcularon actividades específicas de producción de metano (mmol/g SSV/h), de lodos granulares de reactor UASB, de 1.4 y 0.9 para el acetato y de 0.55 y 0.64 para el propionato. Se observó que el incremento de la biomasa está relacionado con el cambio de actividad de la microflora consumidora de propionato. Los lodos granulares tienen un $K'm$ para el acetato de 1.3 mM, lo que se encuentra en el rango de los valores biológicos calculados con cultivos puros. Hay evidencias de que por causa de problemas de transferencia de masa no hay concordancia estequiométrica entre la degradación del sustrato en la fase líquida y la producción de gas. La cinética de metanogénesis del formato está muy por debajo de los datos de la literatura. Esto se explica por el tipo de sustrato utilizado para alimentar el digestor (acetato y propionato) el cual seleccionó un tipo particular de bacterias.

Fonds Documentaire IRD

Cote: B*24920 Ex: *unqre*

Fonds Documentaire IRD



010024920

INTRODUCCION

El reactor anaerobio UASB (upflow anaerobic sludge blanket) es un proceso bien establecido para el tratamiento anaerobio de varios desechos líquidos. Sus altas eficiencias son debidas a la formación de un lecho de lodos granulares, con buenas características de sedimentación (Lettinga et al., 1980). La capacidad de decantación de estos lodos favorece un alto grado de retención de biomasa en el reactor que cuenta con una buena actividad metanogénica y permite lograr bajos tiempos de retención hidráulica con altos tiempos de retención de los microorganismos.

Actualmente, hacen falta estudios, a nivel básico, que caractericen los parámetros que controlan la formación de estos lodos, su composición microbiológica y su actividad metanogénica. Tal información es importante desde el punto de vista práctico, ya que servirá para manejar los digestores, determinar sus máximas potencialidades de tratamiento, conocer la evolución de sus actividades e identificar las etapas limitantes dentro del proceso.

Varios autores han trabajado con lodos granulares con el fin de caracterizar fenómenos de resistencia a la transferencia de masa (Dolfing, 1985), o para conocer la naturaleza y los procesos de formación de estos lodos (Dolfing et al., 1985; Mahoney et al., 1987; Wiegant y de Man, 1986; Wu et al., 1987), pero todavía no hay lineamientos generales que surjan de estos estudios. Como

parte de este esfuerzo, el objetivo del presente trabajo es el de caracterizar las actividades metanogénicas de lodos granulares, de un reactor UASB alimentado con un efluente sintético.

MATERIAL Y METODOS

- A) Reactor UASB. Un reactor de 4.5 litros fue alimentado con un efluente sintético, con ácido acético (3.5 g/l) y ácido propiónico (1 g/l), como fuente de carbono, y con los minerales siguientes (en mg/l): NH_4HCO_3 (1000), NaHCO_3 (600), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (250), K_2HPO_4 (130), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (200), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (14), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10), $\text{MnCl}_4\text{H}_2\text{O}$ (1), ZnCl_2 (1), $\text{CuCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05).
- B) Condiciones experimentales. Las técnicas anaerobias de Hungate (1969) y Balch et al., (1976), fueron utilizadas a lo largo de este estudio, tanto para la preparación de los medios de cultivo como para la transferencia de sustratos y las inoculaciones.
- C) Cinéticas. Los lodos granulares muestreados (1 mm a 2 mm de diámetro), fueron dejados 24 horas, en la pre-cámara de acceso a la cámara anaerobia marca Mac Coy, bajo un vacío de 20 mm de Hg, con objeto de agotar los sustratos residuales de la muestra, y dejar escapar el gas producido para así, reducir

al mínimo la influencia de los sustratos residuales presentes en las muestras frescas. Dentro de la cámara anaerobia fueron repartidos 10 ml de muestra por botella de 60 ml ("serum-bottles") conteniendo 10 ml de la solución mineral. Los sustratos fueron agregados al medio de reacción, por medio de jeringas, a partir de soluciones concentradas preparadas en anaerobiosis. El inicio de la cinética correspondió con el momento de agregar el sustrato. Se hicieron duplicados y un testigo sin sustrato.

- D) Cuantificación de las bacterias. Las bacterias anaerobias fueron cuantificadas utilizando la técnica del número más probable (NMP), descrita por García et al., (1982). Los medios de Balch et al (1976) fueron utilizados para el cultivo de las bacterias metanogénicas. Para las bacterias OHPA (obligate hydrogen-producing acetogenic bacteria) (Mc Inerney y Bryant, 1981) se emplearon los mismos medios, excepto que los sulfatos fueron cambiados por cloruros.
- E) Técnicas analíticas. Los sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) se determinaron por los métodos estándares (1976). El acetato se cuantificó por medio de cromatografía de gas, utilizando un detector de ionización de flama, con nitrógeno como gas acarreador (60 ml/mn), y una columna de acero inoxidable empacada con Porapak QS 80-100 mesh. El metano

se determinó de la misma manera; las muestras de gas se tomaron por medio de una jeringa "pressure-lock" Hamilton.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dos series de experimentos fueron llevados a cabo con 8 meses de intervalo, la primera serie se inició 3 meses después del arranque del digestor UASB. Con las curvas de la Figura 1, se calcularon los parámetros cinéticos de metanogénesis a partir del acetato y propionato (Tabla 1, 1a serie).

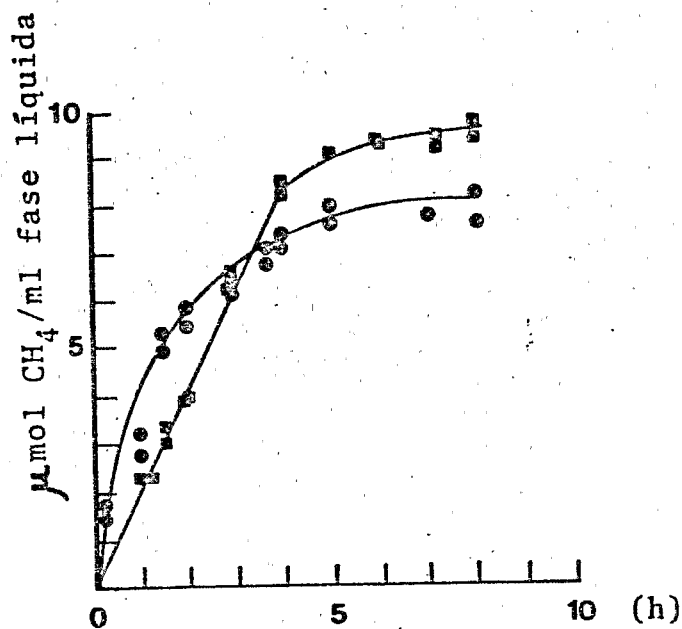


Figura 1. Producción de metano por lodos granulares a partir de acetato (●) y de propionato (■) después de tres meses de operación.

TABLA 1. PARAMETROS CINETICOS DE METANOGENESIS POR LODOS GRANULARES.

| | S_0 mM | SST g/l | SSV % | $V_{m\acute{a}x}$ mmol/l/h | $\bar{A}sp$ mmol/gSSV/h | $V_{max}/gSST$ |
|-------------|-------------|------------|----------|-------------------------------|----------------------------|----------------|
| Acetato: | | | | | | |
| 1a serie | 7.8 | 28.4 | 27 | 10.8 | 1.4 | 0.38 |
| 2a serie | 11.7 | 13 | 53 | 6.4 | 0.9 | 0.49 |
| Propionato: | | | | | | |
| 1a serie | 5.4 | 28.4 | 27 | 4.3 | 0.55 | 0.15 |
| 2a serie | 10 | 13 | 53 | 4.5 | 0.64 | 0.35 |

Se observó que la velocidad máxima de metanogénesis (V_{max}) y la actividad específica ($Asp = V_{max}/SSV$) es mayor en el caso del acetato. Dolfing (1985) calculó actividades más bajas, de 0.3 a 1.14 mmol/g SSV/h para el acetato y 0.36 a 0.42 mmol/g SSV/h para el propionato, pero las cifras obtenidas son del mismo orden de magnitud. En sus resultados también se observa que la actividad de la microflora acetoclástica es mayor que aquella que utiliza el propionato. Los lodos de Dolfing provinieron de un reactor UASB industrial holandés, alimentado con aguas residuales de una industria productora de azúcar a partir de remolacha. De ambas series de datos, obtenidos en lugares y condiciones diferentes, se puede observar que en los lodos se desarrolló una microflora acetoclástica dominante, como lo prueban las actividades determinadas. Los mismos parámetros fueron calculados en la segunda se-

rie de experimentos, ocho meses después de la primera serie, a partir de las figuras 2 y 3.

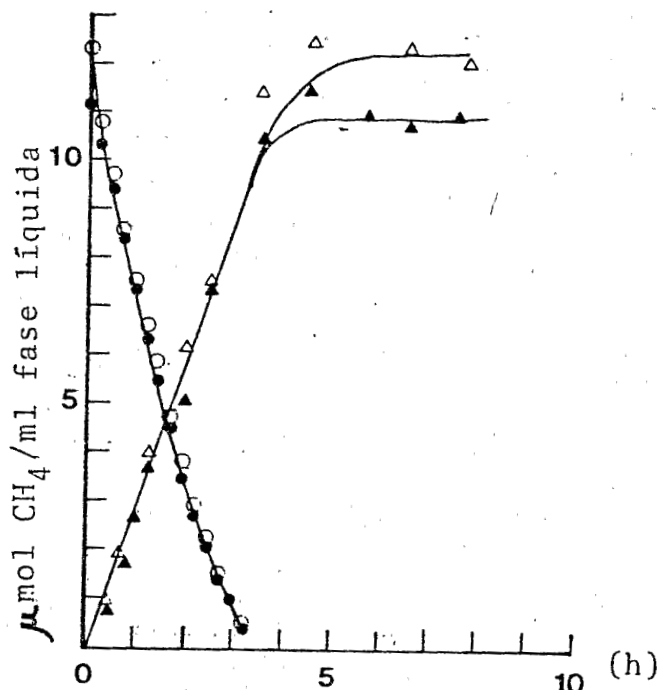


Figura 2. Cinética de degradación del acetato y de producción de metano por lodos granulados después de 11 meses de operación. Para una concentración inicial de acetato de 11 mM: Acetato (●), metano (▲). Para una concentración inicial de acetato de 12.3 mM: Acetato (○), metano (Δ).

Los parámetros obtenidos (Tabla 1, 2a serie) conservaron la tendencia dominante de la reacción acetoclástica pero, si se examina la evolución de los SSV en relación con la evolución de estos parámetros, se constata lo siguiente: en 8 meses los SSV pasaron de un 27% a 53% de los SST, es decir que se duplicó la biomasa. Por otro lado las V_{max} calculadas por gramo de SST se incre

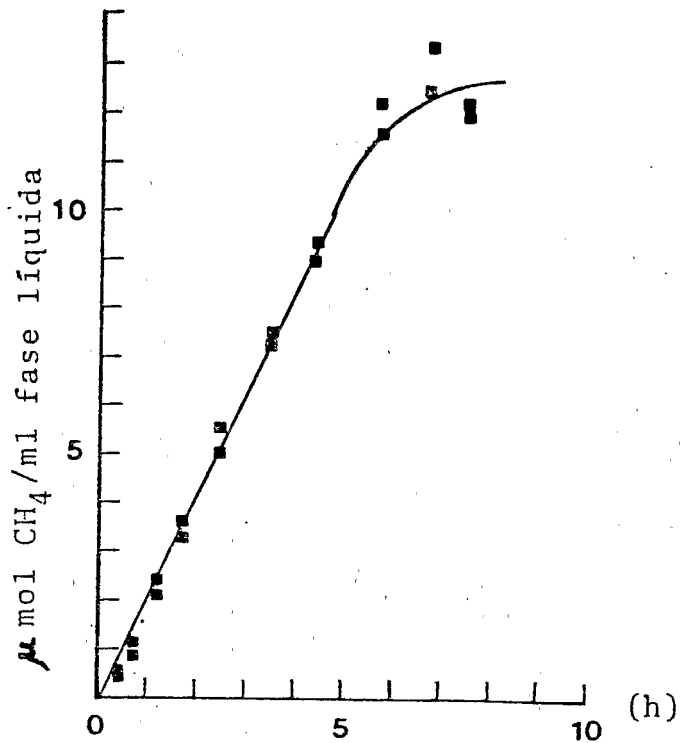


Figura 3. Producción de metano a partir de propionato (10 mM) después de 3 meses de operación

mentaron 1.3 veces en el caso del acetato, y de 2.3 veces en el caso del propionato. Si admitimos que las V_{max} son directamente proporcionales a la concentración en biomasa, entonces el incremento de los SSV está relacionado con el aumento de la V_{max} de metanogénesis a partir del propionato, lo cual implica que prácticamente no creció la población acetoclástica. Como consecuencia, la Asp de la microflora que utilizó el propionato, debe ser prácticamente igual para la primera y la segunda serie de experimentos. Al contrario, la Asp de la microflora acetoclástica debe disminuir, puesto que se calcula con base en la biomasa to-

tal. Lo anterior se puede comprobar con la Tabla 1.

El hecho que no crecieran las bacterias acetoclásticas, se podría explicar por un desfaseamiento entre el anabolismo (síntesis de material celular) y el metabolismo energético. Sería interesante investigar en el futuro esta hipótesis. Otra consecuencia de este fenómeno, relacionado con la operación del digestor, es que al crecer la población utilizadora de propionato se podría llegar a invertir la etapa limitante del proceso de transformación de los sustratos en metano, en el caso de una sobrecarga orgánica. Es decir, que en vez de registrar una acumulación de propionato sería el acetato el que se acumularía en primer lugar.

Dolfing (1985) calculó las actividades de degradación del acetato y del propionato a partir de las curvas de producción de metano. Su trabajo se enfocó sobre los problemas de limitación de transferencia de masa del sustrato al grano de lodo, pero no tomó en cuenta el problema de difusión del metano a partir del grano hacia el medio líquido, y finalmente hasta la atmósfera (Figura 4).

Lo anterior significa que el retraso provocado por la difusión del gas a la atmósfera induce una cinética aparente de producción de metano, que no podría ser directamente correlacionada con la cinética de degradación del sustrato en el medio líquido. Esta consideración implica que no serían válidos los cálculos estequiométricos utilizados para deducir los parámetros cinéticos de de-

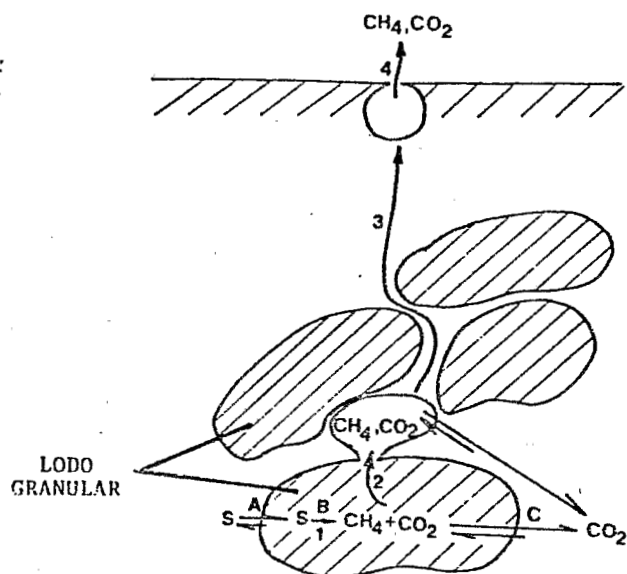


Figura 4. Representación simplificada de los fenómenos de transferencia de masa que ocurren en un lecho de lodos granulares, y que implican:

1. Formación de metano y dióxido de carbono en el grano de lodo
2. Acumulación de los gases y formación de burbujas
3. Liberación y ascensión de la burbuja a través del lecho de lodos y de la fase líquida
4. Paso del gas a la fase gaseosa.

Para el caso específico de un grano se tiene:

- A. Difusión del sustrato (S) hacia el grano de lodo
- B. Transformación del sustrato en metano y CO_2
- C. Difusión del CO_2 a la fase líquida.

En esta representación se considera despreciable la solubilidad del metano.

gradación de los sustratos, a partir de las curvas de producción de metano. Robinson y Tiedje (1982) mostraron que hay un retraso de transferencia de masa de la fase gas a la fase líquida, cuando se utiliza hidrógeno como sustrato, lo que puede dar falsas cinéticas de consumo. Tomando en cuenta estas observaciones, se

cuantificó la degradación del acetato en la fase líquida en comparación con la producción de metano para la misma corrida "batch" (Figura 2), y se calcularon los parámetros cinéticos y el K_m aparente (K'_m) para el consumo del acetato, utilizando un método de linearización por integración de la fórmula de Michaelis-Menten: $(\ln S_0/S_t)/t = (-1/K'_m) \cdot (S_0 - S_t)/t + V_{max}/K'_m$, con S_0 como la concentración de sustrato al tiempo inicial y S_t como la concentración del sustrato al tiempo t (Robinson y Characklis, 1984). Se seleccionó el acetato en función de: (i) su importancia como principal precursor del metano (Smith y Mah, 1966); (ii) su estequiometría simple que lo relaciona con la producción de metano (un mol de acetato produce un mol de metano) (Mc Inerney y Bryant, 1981); e (iii) para tratar de caracterizar la población metanogénica en relación con el K'_m . Los resultados dan un valor V_{max} de degradación del acetato de 9.5 mmol/l/h (Tabla 2).

TABLA 2. Parámetros cinéticos de degradación del acetato por los dos granulares. (*) Datos convertidos en mmol/g SSV/h, a partir de valores en $\mu\text{mol/g SSV/mn}$.

| | Este estudio UASB 4.5 L | Reactor convencional Kaspar y Wurhmann (1978) | UASM industrial Dolfing (1985) |
|---------------------------|----------------------------|---|-----------------------------------|
| V_{max} , A mmol/l/h | 9.5 | 0.63 | - |
| Asp , A mmol/gSSV/h | 1.4 | — | 0.3 a 1.14 (*) |
| K'_m mM | 1.3 | 0.32 | 0.5 a 1 |

La V_{max} de metanogénesis correspondiente es de 6.4 mmol/l/H (Tabla 1, 2a serie), lo que da una diferencia de 48.4% entre los datos. Si no existieran problemas de transporte del gas desde el grano hasta la atmósfera, los valores deberían ser casi iguales dada la estequiometría de la reacción. Este fenómeno se observa claramente a nivel experimental. Cuando los granos ascienden es porque se han saturado de gas y la formación de pequeñas burbujas se ha iniciado en su periferia. Al liberarlas, el grano sedimenta de nuevo. La formación de burbujas implica una acumulación previa de gas disuelto al interior del grano. Si se comparan la A_{sp} de degradación del acetato (Tabla 2) con los datos de Dolfing (1985), el valor obtenido aquí es más alto pero del mismo orden de magnitud. Consecuentemente, esta diferencia se puede explicar a partir de los problemas de transferencia del sustrato, por la manera directa o indirecta de calcular esta actividad. El valor de $K'm$ obtenido en este estudio es 1.3 mM (Tabla 2). En este sentido, Dolfing (1985) encontró un rango de $K'm$ de 0.5 a 1 mM, según el tamaño de los granos, mientras que Kaspar y Wuhrmann (1978), calcularon un valor de 0.32 mM para lodos no granulares provenientes de un digestor convencional de tipo mezclado. Los datos publicados de valores de K_m , para cultivos de bacterias metanogénicas acetoclásticas, son de 0.7 mM para Methanothrix soehngenii (Huser et al, 1984), 1.2 mM para Methanothrix concelii (Patel, 1984) y 0.5 mM para Methanosarcina barkeri (Smith y Mah, 1978). Esto significa que el valor encontrado aquí se encuentra dentro del intervalo para estas bacterias. Sin embargo, al examinar tubos de NMP para cuantificar las bacterias acetoclásticas,

se observó únicamente bacterias del tipo Methanosarcina. Wu et al, (1987) observaron la presencia de Methanosarcina sp., a partir de lodos granulares de un digestor UASB. Dolfing et al, (1985) observaron la presencia de bacterias semejantes a Methanorix, en granos provenientes de sus reactores UASB. Aún falta determinar cuales son los factores que favorecen la presencia de uno u otro grupo de bacterias metanogénicas acetoclásticas.

Los resultados de la cuantificación de los diferentes grupos de bacterias anaerobias se presentan en la Tabla 3. Sin embargo, como en el estudio de Dolfing et al, (1985), las bacterias acetoclásticas representan 10% de la población hidrogenofílica, lo que asegura una presencia relativamente importante de estas bacterias, y la capacidad para amortiguar un incremento eventual en la concentración de hidrógeno. En este sentido, Kaspar y Whuhrmann (1978) mostraron que en digestores convencionales, la población hidrogenofílica estaba lejos de ser saturada.

TABLA 3. CUANTIFICACION DE LOS DIVERSOS GRUPOS MICROBIANOS EN LOS LODOS GRANULARES, UTILIZANDO EL NMP CON 4 TUBOS POR DILUCION

| | No. microorganismos | |
|----------------------------------|---------------------|----------------|
| | por g SSV | por ml |
| Bacterias fermentativas | $3 \cdot 10^6$ | $2 \cdot 10^7$ |
| Metanógenas acetoclásticas | $3 \cdot 10^5$ | $3 \cdot 10^6$ |
| Metanógenas hidrogenofílicas | 10^6 | 10^7 |
| OHPA utilizadoras del propionato | $2 \cdot 10^5$ | $6 \cdot 10^6$ |

Por otra parte, se calcularon los parámetros cinéticos para el formato (Tabla 4). Estudios anteriores, señalaron el papel importante que podría tener la microflora metanogénica que utiliza el formato (Guyot y Brauman, 1987) dado que este sustrato, al igual que el hidrógeno, es un intermediario metabólico de la digestión anaerobia. Sin embargo, pocos estudios se han hecho para conocer su papel en los digestores anaerobios. La actividad específica encontrada es muy baja en comparación con los datos de Dolfin (1985). Es posible que el tipo de efluente utilizado, constituido por una mezcla de acetato y de propionato, no era adecuado para seleccionar una microflora activa. El $K'm$ calculado para los lodos granulares es muy alto en comparación con los valores obtenidos por Schauer et al, (1982), para cultivos puros de bacterias metanogénicas (Tabla 4). Esto se puede explicar por la muy alta resistencia a la transferencia de masa, que se caracterizó en el caso del formato y también por el tipo de microflora que se ha seleccionado en relación con el medio de alimentación del digestor.

TABLA 4. PARAMETROS CINETICOS DE DEGRADACION DEL FORMATO POR LODOS GRANULARES.

| | Asp mmol/g SSV/h | K_m mM | Referencias |
|----------------------|---------------------|-------------|-------------------------------|
| <u>M. formicicum</u> | 37 | 0.58 | Schauer <u>et al</u> , (1982) |
| <u>M. hungatei</u> | 44 | 0.22 | Schauer <u>et al</u> , (1982) |
| Este estudio | 3 | 11 | ----- |

Para concluir, se puede decir que este trabajo permitió tener un mejor conocimiento de los parámetros cinéticos de la metanogénesis para lodos granulares, así como de diferenciar la microflora del reactor y su evolución. Los parámetros encontrados, permiten estimar las capacidades intrínsecas máximas de metanogénesis y las etapas limitantes en el reactor. Por otra parte, hace falta todavía tomar en cuenta el efecto que la acumulación del biogás en los granos de lodos tiene sobre la cinética global de producción de metano; esto con el fin de poder determinar indirectamente, pero con precisión, las cinéticas de degradación de los sustratos en la fase líquida.

AGRADECIMIENTOS: Parte de este trabajo fue financiado con fondos de CONACYT, PRONAES-SEP, y O.E.A.. La valiosa colaboración de la Ing. Juana Hernández es ampliamente agradecida.

BIBLIOGRAFIA

Balch, W.E., and R.S. Wolfe. 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanolsulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere. Appl. Environ. Microbiol. 32:781-791.

Balch, W.E., G.E. Fox, L.J. Magrum, C.R. Woese, and R.S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43: 260-296.

Dolfing, J. 1985. Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrate concentrations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 77-81.

Dolfing, J., A. Griffioen, A.R.W. van Neerven, and L.P.T.M. Zevenhuizen. 1985. Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. 31: 744-750.

Garcia, J.L., J.P. Guyot, B. Ollivier, M. Trad, and C. Paycheng. 1982. Ecologie de la digestion anaerobie. Cha. ORSTOM, ser. Biol. 45: 3-15.

Guyot, J.P., and A. Brauman. 1986. Methane production from formate by syntrophic association of Methanobacterium bryantii and desulfovibrio vulgaris JJ. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1436-1437.

Hungate, R.E. 1969. A root-tube method for the cultivation of strict anaerobes. p. 117-132. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed.) Methods in microbiology, vol. 3B. Academic Press. Inc. New-York.

Huser, B.A., K. Wuhrmann, and A.J.B. Zehnder. 1982. Methanothrix soehngeni gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch. Microbiol. 132: 1-9.

Kaspar, H.F., and K. Wuhrmann. 1978. Kinetics parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. Appl. Environ. Microbiol. 36: 1-7.

Lettinga, G, A.F.M van Nelsen, S.W. Hobma, W. de Zeeuw, and A. Klapwijk. 1980. Use of Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, specially for anaerobic treatment. Biotechnol. Bioeng. 22: 699-734.

Mahoney, E.M., L.K. Varangu, W.L. Cairns, N. Kosaric and R.G.E. Murray. 1987. The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactors start-up. Wat. Sci. Tech. 19: 249-260.

Mc Inerney, M.J., and M.P. Bryant. 1981. Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. p. 277-296. In S.S. Sofer and O.R. Zaborsky (ed.) Biomass conversion process for energy and fuels. Plenum publishing

corporation.

Patel, G.B. 1984. Characterization and nutritional properties of Methanothrix concilii sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen. *Can. J. Microbiol.* 30: 1383-1396.

Robinson, J.A., and J.M. Tiedje. 1982. Kinetics of hydrogen consumption by rumen fluid, anaerobic digester sludge and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1374-1384.

Robinson, J.A., and W.G. Characklis. 1984. Simultaneous estimation of V_m , K_m , and the rate of endogenous substrate production (R) from substrate depletion data. *Microb. Ecol.* 10:165-178.

Schauer, N.L., D.P. Brown, and J.G. Ferry. 1982. Kinetics of formate metabolism in Methanobacterium formicicum and Metanospirillum hungatii. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:549-554.

Smith, M.R., and R.A. Mah. 1978. Growth and methanogenesis by Methanosarcina strain 227 on acetate and methanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 870-879.

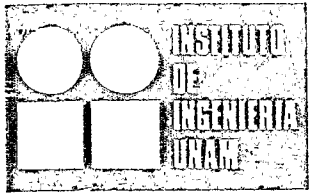
Smith, P.H., and Mah R.A. 1966. Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.* 14: 368-371.

Standard methods for the examination of water and wastewater.
1976. 14 th Edition, American Public Health Association.
Washington, D.C.

Wiegant, W.M., and A.W.A. de Man. 1986. Granulation of biomass
in thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors treating
acidified wastewaters. Biotechnol. Bioeng. 28: 718-727.

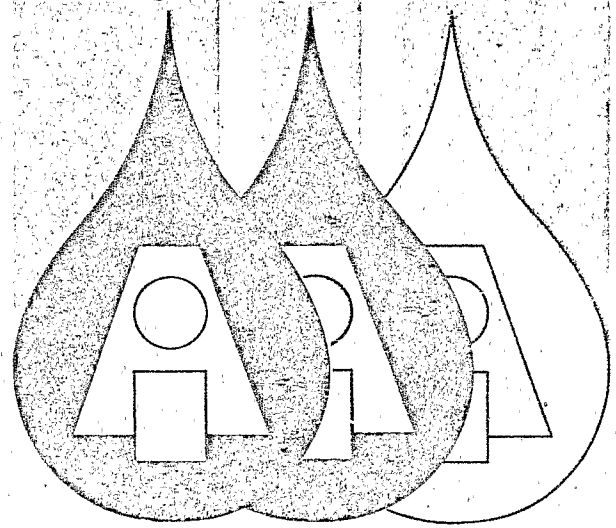
Wu, W., J. Hu, X. Gu, Y. Zhao, H. Zang, and G. Gu. 1987. Cultivat
tion of anaerobic granular sludge in UASB reactors with aerobic
activated sludge as seed. Wat. Res. 21: 789-799.

Article 1



por me de H2

**MEMORIAS
I SIMPOSIO NACIONAL
SOBRE
INGENIERIA AMBIENTAL**



MEXICO, DF *Fevrier* 1988