



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

Título: Evaluación de características de inóculos en un reactor de Flujo Ascendente con Manto de Lodo (UASB).

**Tesis presentada en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología.
Mención Ambiental.**

Autor: *Lic. Adis Ivonne Terry Brown.*

**Tutores: Dra.C. Suyén Rodríguez Pérez
MSc. Maikel Fernández Boizán.**

Consultante: Dra.C. Rosa C. Bermúdez Savón

**2008.
“Año 50 de la Revolución**

Dedicatoria

A mi hijo por ser siempre mi mejor motivo, mi gran tesoro.

A mamá, por ser mi ejemplo, orgullo, el motor impulsor de cada uno de mis sueños.

A mis hermanitas, bastón de mi vida, sin ustedes nada sería posible.

A mis sobrinitos Grace y Enmanuel, por llenarme siempre de su amor.

A Jesús, por ser mi amigo fiel.

Agradecimientos

Son muchas las personas a quienes tengo que agradecerle el haberme acompañado a transitar por este camino, las que me han hecho sentir que jamás he estado sola a ellos **MUCHAS GRACIAS**.

- ❖ *A toda mi familia gracias porque siempre he podido contar con su apoyo, en especial a mi madre porque siempre me ha ayudado a creer que todo es posible y a mi hijo por comprender que mamita no podía estar cuando tanto me necesitaba.*
- ❖ *A mis tutores la Dra.C. Suyén Rodríguez y MSc. Maikel Fernández, por sus consejos y críticas, por ayudarme a materializar este sueño.*
- ❖ *A la Dra. Rosa Catalina Bemúdez Savón, por sus observaciones siempre oportunas, sus acertados consejos, por ser la eterna educadora.*
- ❖ *A mis fieles hermanos y amigos: Enrique, Ana Ibis, Wilber, Migdalia Emilio, Morris, Odalys, Amarilis, Katherin, Sufy, Yailletis, Patricia, Miguel, Roberto, Delys, Ifena y Teresa, por tenderme siempre su mano, por confiar en mí.*
- ❖ *A mis compañeras Isabel, Miladis, Rosa y Arelis, por poner a el servicio de éste trabajo sus experiencias, su mayor apoyo.*
- ❖ *A todos mis compañeros de la 5^a Edición de la Maestría por los momentos gratos y por los difíciles que compartimos juntos.*
- ❖ *A todos mis compañeros del CEBI, por que la frase o el gesto más sencillo puede convertirse en un acto solidario.*
- ❖ *A los profesores de la maestría, que siempre nos transmitieron sus mejores conocimientos, sus más ricas experiencias.*
- ❖ *A mí amado Jesús, porque hasta aquí me ha sostenido.*

Resumen.

En nuestro país los reactores de Flujo Ascendente con Manto de Lodos (UASB) empleados para el tratamiento anaerobio de residuos líquidos han sido poco estudiados, como consecuencia de ello aún se hace necesario implementar estrategias para reducir los tiempos de arranque y puesta en marcha de los mismos. Por tal motivo en el presente trabajo se hace un estudio de la influencia de la recirculación total del efluente en ciclos de 4 días, así como la adición de alginato de sodio en el mejoramiento de las características de un lodo anaerobio empleado como inóculo en el período de arranque de un reactor UASB tratando vinaza de destilería. Como resultado se observó que la recirculación favoreció la Actividad Metanogénica Específica (AME) de las bacterias acetoclásticas, al aumentar de un valor inicial de 0,062 hasta 0,211 kg DQO-CH₄ / kgSSV * d, alcanzándose una eficiencia de remoción de la DQO de 82,3 %. De igual manera la adición de alginato de sodio permitió el incremento de la AME hasta alcanzar un valor de 0,39 kg DQO-CH₄ / kg SSV * d con un 91,6 % de eficiencia de remoción de la DQO, además de mejorar el Índice Volumétrico de Lodo (IVL) del inóculo desde un valor inicial de 56,29 hasta 43 mL/g.

Summary.

In our country the upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) employees for wastewater anaerobic treatment has been few studies, for this reason is necessary employment the strategies to reduce the times of start-up and setting in march of its. In the present work is do a study of the influence of the recirculation of the effluent (in cycles of 4 days), as well as alginate addition, both in the improvement of the characteristics of the anaerobic sludge used as inoculum. UASB is used as reactor to the treatment of vinasse from rum distillery. As result it was observed that the recirculation favored the Specific Methanogenic Activity (AME) of the acetoclastic bacteria, when increasing of initial value of 0,062 up to 0,211 kg COD-CH₄ / kgSSV * d. Also in the experiment has being reached a efficiency of COD removal efficiency of 82,3%. In a same way the addition of alginate of sodium allowed the increment of the AME until reaching a value of 0,39 kg COD-CH₄ / kg SSV * d with 91,6% of efficiency of removal of the COD, besides improving the Sludge Volumetric Index (IVL) of the inoculum from an initial value of 56,29 up to 43 mL/g.

Leyenda.

AGV: Ácidos Grasos Volátiles.

AME: Actividad Metanogénica Específica

ASBBR: Reactor Anaerobio de Lote Secuencial.

BPOH: Bacterias Acetogénicas Productoras Obligadas de Hidrógeno.

BSA: Seroalbúmina Bovina.

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno.

DQO: Demanda Química de Oxígeno.

ECP: Polímeros Extracelulares.

EGSB: Reactores de Lecho Granular Expandido.

EPS: Exopolisacáridos.

FA: Reactor de Filtro Anaerobio.

FE: Estiércol porcino

IC: Reactores de Circulación Interna

IVL: Índice Volumétrico de Lodo.

LDA - CEBI: Lodo de digestión anaerobia

LG: Lodo Granular.

M: Mezcla de inóculos.

SST: Sólidos Suspendidos Totales

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles

TRH: Tiempo de Retención Hidráulica.

UASB: Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente con Manto de Lodos.

Índice

	Pág.
I. Introducción.	1
II. Revisión Bibliográfica	
II.1. Generalidades del Proceso de Digestión Anaerobia.	3
II.1.1. Etapas del Proceso de Digestión Anaerobia.	3
II.1.2. Parámetros que influyen en el proceso de Digestión Anaerobia.	4
II.2. Reactores anaerobios.	6
II.2.1 Reactor de Flujo Ascendente con Manto de Lodo (UASB).	6
II.3 Proceso de granulación anaerobia.	7
II.3.1 Factores que inciden en la granulación.	7
II.3.1.1 Microbiología del proceso.	7
II.3.1.2 Polímeros extracelulares (ECP)	9
II.3.1.3 Factores Biofísicos	12
III. Materiales y Métodos	
III.1 Caracterización y Selección de inóculos	13
III.1.1 Fuente de inóculo.	13
III.1.2 Caracterización.	13
III.1.2.1 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV).	13
III.1.2.2 Actividad Metanogénica Específica (AME).	13
III.1.2.3 Índice Volumétrico de Lodo (IVL).	14
III.2 Residual.	14
III.3 Ensayos para evaluar la degradación de la vinaza de destilería en sistema batch con recirculación.	14
III.3.1 Reactor y condiciones de arranque.	14
III.3.2 Parámetros Monitoreado.	15
III.3.2.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO).	15
III.3.2.2 pH.	15
III.3.2.3 Relación de alcalinidad.	15
III.4 Análisis Microbiológico.	16
III.4.1 Tinción de Gram	16
III.5 Determinación de la concentración de Polímeros Extracelulares (ECP).	16
III.5.1 Determinación de proteínas	16
III.5.2 Determinación de carbohidratos totales	16
III.5.3 Determinación de ácidos nucleicos.	17
III.6. Análisis estadístico de los resultados.	17
IV. Resultados y Discusión.	
IV.1 Características de la vinaza y de las fuentes de inóculos	18
IV.1.1. Caracterización y selección de inóculos.	19
IV.2 Arranque y funcionamiento del reactor UASB a escala de laboratorio.	21
IV.3. Arranque y funcionamiento del reactor UASB a escala de laboratorio en batch con recirculación con la adición de alginato de sodio	26
V. Conclusiones.	29
VI. Recomendaciones.	29
VII. Bibliografía	30

I. Introducción.

La tecnología de la digestión anaerobia de residuos responde a los principios básicos de la Biotecnología Ambiental, y constituye una de sus herramientas más importantes (Chávez y col., 2005). Con su aplicación se pretende degradar materiales orgánicos, que inciden desfavorablemente en el entorno, causando problemas de contaminación ambiental. En tal sentido, el aprovechamiento de las capacidades de las actividades metabólicas de los microorganismos anaerobios en la biodegradación de la carga contaminante de los residuos a través de la ingenierización de esos procesos biológicos, permite disminuir su impacto ambiental desfavorable.

El desarrollo actual de la biotecnología para el tratamiento de aguas residuales, señala a los reactores anaerobios de segunda generación como los más atractivos para su implementación a escala industrial (Bermúdez, 1995). Esto se debe a que los reactores de primera generación requieren de grandes volúmenes, los tiempos en que debe estar el residual en su interior para su biodegradación son mayores y no todos tienen eficiencias aceptables. Los de tercera generación se encuentran aún en etapas de desarrollo y existen pocas instalaciones a nivel industrial.

La explotación de los reactores de segunda generación constituye un campo promisorio a disposición de ingenieros e investigadores, para eliminar la contaminación de los acuatorios que sirven como cuerpos receptores (Mansur, 2000). La tecnología anaerobia es por tanto una opción viable, ofreciendo ventajas en términos de menores requerimientos de área, menores costos de operación y mantenimiento, y obtención de subproductos. Por lo explicado anteriormente, dicha tecnología cuenta con las características necesarias para un manejo integrado de los recursos hídricos (Elías y col., 1999).

Entre los beneficios que brinda la tecnología de la digestión anaerobia se destacan:

La disminución de la carga contaminante en los residuales que se vierten en los diversos ecosistemas, beneficiando así la biodiversidad posibilitando además la obtención de una fuente de energía renovable (biogás), permitiendo fortalecer la expectativa de disminuir la dependencia a los combustibles fósiles y la consiguiente disminución del consumo de recursos no renovables; lo que promueve la asimilación y desarrollo de tecnologías que amplían las ventajas de la aplicación de las fuentes renovables de energía.

El aprovechamiento de los residuales a partir de los cuales se obtienen lodos estabilizados, que pueden ser usados como bioabono y/o biofertilizantes, así como alimento animal (Speece, 1996).

A pesar de los aspectos favorables anteriormente mencionados, esta tecnología presenta limitaciones de naturaleza biológica, debido a la complejidad de la microbiología del proceso (diversas etapas y poblaciones bacterianas involucradas), la poca disponibilidad de inóculos de buena calidad en cantidad suficiente. Esta situación conlleva a períodos de arranque relativamente largos, que pueden ser acompañados de otras limitaciones según el diseño del reactor, de los parámetros fisicoquímicos y termodinámicos asociados a la tecnología anaerobia, que

determinan la ocurrencia del proceso (Elías y col., 1999).

Los reactores anaerobios que más se han aplicado y se comercializan para el tratamiento de aguas residuales son los reactores de Filtro Anaerobio (FA) y los reactores de Flujo Ascendente con Manto de Lodos (UASB). Los mismos son altamente eficientes debido a los bajos tiempos de permanencia del residual en su interior (conocido como Tiempo de Retención Hidráulico) que permiten procesar en poco tiempo grandes volúmenes de agua residual.

La tecnología de la digestión anaerobia para el tratamiento de residuos biodegradables; de diferentes orígenes, constituye una de las principales líneas de investigación del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial desde sus inicios y dentro de ella, el empleo de reactores de flujo ascendente con manto de lodos (UASB) para el tratamiento biológico de los residuales líquidos, es una de las principales actividades desde el punto de vista investigativo. Estos reactores basan su principio de funcionamiento en la inmovilización de la biomasa en forma de gránulos sin el empleo de soportes, característica que lo identifica. Por su reconocida participación en la degradación de los más diversos sustratos y por los beneficios que proporcionan la digestión anaerobia, se exige un conocimiento más profundo de la microbiología del proceso, prestándose especial atención a los procesos microbiológicos que ocurren durante la granulación.

Entre las aguas residuales que han sido empleadas como sustratos para estudiar el proceso de granulación en reactores UASB, se encuentran las vinazas de destilería. (Harada y col. 1996; Castro y col. 2001). Las mismas son consideradas como un residual de alta carga por poseer valores elevados de DQO (entre 50-70 g/L), y son generadas en la producción de alcohol a partir de las mieles finales (melazas) que resultan de la producción de azúcar.

En Cuba no existen experiencias reportadas de granulación en instalaciones a escala real, por otro lado las características de las fuentes de inóculo disponibles no satisfacen los requerimientos para reducir el período de arranque, así como mantener un adecuado funcionamiento de reactores UASB, constituyendo esto una limitante para la aplicación de esta tecnología de tratamiento anaerobio de aguas residuales.

HIPÓTESIS

Si se establece una estrategia basada en la recirculación del efluente acompañada de la adición de polímeros sintéticos, entonces se verían favorecidas las características de un lodo no granular.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una estrategia de trabajo para el mejoramiento de las características de inóculos no granulares, con el empleo de reactores UASB.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar y seleccionar fuentes de inóculos no granulares.
- Evaluar el funcionamiento de un reactor UASB tratando la vinaza de destilería, durante la etapa de arranque con el inóculo seleccionado.
- Evaluar el efecto del alginato de sodio en el mejoramiento del inóculo seleccionado..

II. Revisión Bibliográfica.

II.1 Generalidades del Proceso de Digestión Anaerobia.

La digestión anaerobia es un proceso biológico realizado por grupos de microorganismos, que en ausencia de oxígeno transforman la materia orgánica en biogás; el cual está constituido fundamentalmente por: CH_4 , CO_2 y H_2S , y como resultado del crecimiento microbiano se generan los lodos de digestión. El proceso está enmarcado en una serie de etapas en las que participan de manera específica diferentes microorganismos (preferentemente bacterias), donde los productos metabólicos de una son empleados en la próxima, hasta obtener la completa reducción del material orgánico biodegradable presente (Soube y col., 1994; Montalvo y Guerrero, 2003).

II.1.1 Etapas del Proceso de Digestión Anaerobia.

Las etapas del proceso de digestión anaerobia implican varias reacciones metabólicas interdependientes, consecutivas y paralelas que requieren de un consorcio en el que participan diferentes especies bacterianas (Figura 1).

Fase de hidrólisis y acidogénesis.

En esta etapa participan bacterias hidrolíticas capaces de realizar la conversión de los polímeros naturales (proteínas, carbohidratos, lípidos) a sus respectivos monómeros (aminoácidos, azúcares, ácidos grasos). Estas bacterias poseen enzimas que se liberan al medio (exoenzimas) o pueden estar asociadas a la envoltura externa celular, siendo las encargadas de llevar a cabo la hidrólisis de los compuestos orgánicos, que luego deben penetrar al interior de las células para ser metabolizados. La velocidad de hidrólisis de polímeros como la celulosa o las grasas es menor que la velocidad de catabolismo de sus productos, por tanto esta fase podría ser la limitante del sistema.

Los productos de la hidrólisis (ácidos grasos de cadenas largas, azúcares y alcoholes) son metabolizados intracelularmente por bacterias hidrolíticas y no hidrolíticas. Los principales productos de la acidogénesis son acetato, propionato, butirato, H_2/CO_2 . En menor cantidad el formiato, lactato, valerato, metanol, etanol, butanodiol o acetona pueden ser producidos por bacterias fermentativas. Debido a que los ácidos grasos volátiles son el principal producto de la fermentación de estas bacterias, ellas son denominadas bacterias acidificantes o acidogénicas, por lo que estos organismos son resistentes a valores de pH tan bajos como 4.

Entre los géneros de microorganismos que participan en esta etapa se encuentran: *Clostridium*, *Proteus*, *Eubacterium*, *Propionobacterium*, *Bifidobacterium*, *Butyrovibrio* y *Ruminococcus* (Bermúdez, 1995; Castilla, 2006).

Fase de acetogénesis.

Los compuestos provenientes de la fermentación (mezcla de ácidos carboxílicos, alcoholes), son transformados hasta acetato (**acetogénesis**), CO_2 e H_2 mediante la acción de bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (BPOH), tales como: *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas bryantii*, etc. McNerney y col. (1981) reportan que la oxidación anaerobia de ácidos grasos de cadena larga es realizada por *Syntrophomonas. wolfei* mediante la β_- oxidación; rindiendo como producto el acetato; cuando los ácidos tienen número de carbono pares, mientras que si el número es impar se obtendrá propionato y acetato. Cuando existe una ramificación esta es mantenida en el ácido producido.

Para que este proceso sea favorecido se requiere de la asociación sintrófica con bacterias metanogénicas hidrogenotrofas capaces de utilizar el hidrógeno que se ha producido durante la acidogénesis y acetogénesis, el cual provoca la inhibición de las BPOH. Este consumo de hidrógeno se canaliza mediante la reducción del CO_2 a metano.

Fase metanogénica.

Es la última etapa de la degradación anaerobia, donde productos como el H_2 , CO_2 y acetato, son transformados por bacterias metanogénicas hasta CH_4 y CO_2 . De esta manera la transformación hasta metano puede realizarse a través de las bacterias metanogénicas que utilizan el acetato o acetoclásticas y las que utilizan el hidrógeno o hidrogenofilicas. Del metano formado un 70-75 % deriva del acetato y el resto del H_2 y CO_2 (Soube, 1994; Bermúdez, 1995; Vieira y col., 2001).

La reducción por la vía acetoclástica esta reducida al género *Methanosarcina*, entre las que se encuentran *M barkeri*, *M mazei*, *M. thermophila*, etc. y al género *Methanotrix*, actualmente conocido como *Methanosaeta*. En el caso de las bacterias hidrogenofilicas, donde el hidrógeno actúa como donador de electrones, están involucradas *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium hungate* y *Methanobrevibacter sp*, entre otros (Castilla, 2006)

II.1.2 Parámetros que influyen en el proceso de Digestión Anaerobia.

Los principales factores que influyen en un proceso anaerobio para el tratamiento de aguas residuales están relacionados con aquellos parámetros cuyo control permite un buen crecimiento de la biomasa y por consiguiente, una mayor eficiencia en la remoción de la materia orgánica y en la producción de biogás.

Nutrientes

La composición del agua residual tiene una gran importancia para el desarrollo del proceso de degradación anaerobia. Las materias primas ricas en carbono producen más biogás que las ricas en nitrógeno; sin embargo, es más rápida la producción de biogás a partir de materias nitrogenadas que las ricas en carbono. De manera que para lograr altos rendimientos de producción de biogás unida una velocidad de generación constante de mismo es necesario partir de sustratos con una adecuada relación de C/N, siendo considerada una relación de 20:1 hasta 30:1 como ideal.

De igual manera también son consideradas las concentraciones de DQO y DBO presentes en las aguas residuales, siendo ventajoso para el tratamiento anaerobio el incremento de la DQO como es el caso de residuales industriales como la vinaza de destilería.

La digestión anaerobia por ser precisamente un proceso biológico, requiere de la adición de ciertos nutrientes inorgánicos esenciales para el crecimiento microbiano (Tabla 1) (Zegers, 1987; Elías, 1992, Mai y col., 2002; Osuna y col., 2003). A lo largo de la evolución del tratamiento anaerobio de aguas residuales, diferentes sustancias químicas (carbonato y fosfato de calcio, cloruro férrico y de aluminio, cobalto, níquel) han sido utilizadas con el objetivo de mejorar la eficiencia del tratamiento o de contrarrestar algunas limitaciones que presenta dicha tecnología. Por lo que constituye objeto de investigación, la continuidad y concentración en que se han de adicionar los nutrientes necesarios al proceso (Torres y col., 2004).

Aunque la actividad microbiana depende de muchos factores, la falta de un solo micronutriente puede limitar la viabilidad de tratamiento. El efecto de la adición de elementos trazas en el diseño de bioreactores ha sido un campo de estudio importante en el proceso anaerobio. Un ejemplo de ello es el caso de metales relacionados con las actividades enzimáticas de las bacterias metanogénicas y acidogénicas, ejemplo el cinc, cobalto, hierro. En esta línea de trabajo existen interrogantes como lo es la medida de la concentración total de los metales trazas, pues esta no siempre proporciona la información adecuada sobre su viabilidad y su toxicidad. Además, la distribución de los metales en los diferentes fragmentos (orgánico e inorgánico, ión libre o asociado), determina su disponibilidad para la actividad metabólica de las poblaciones bacterianas involucradas en el proceso de digestión anaerobia (Uyanik, 2003).

pH

Los procesos de digestión anaerobia ocurren en un intervalo de pH entre 6,0 y 7,5. A pH menor de 6,0 la presencia de ácidos grasos volátiles en la forma no ionizada, provoca una severa inhibición de las bacterias metanogénicas. Cuando la capacidad metanogénica está continuamente sobrecargada y no se añade ningún alcalinizante para neutralizar los ácidos grasos volátiles presentes, el sistema de tratamiento se convertirá en un reactor de acidificación y entonces el pH de este efluente será próximo a 4,5–5,0. La actividad metanogénica también disminuye si el pH se incrementa por encima de 7,5 (Zegers, 1987; Elías, 1992).

Temperatura

En los ambientes anaerobios los microorganismos, de acuerdo a la temperatura, pueden dividirse en tres categorías: psicófilos (0°C a 20°C), mesófilos (20 °C a 45 °C) y termófilos (45°C a 65°C). Las bacterias que crecen en cada uno de estos intervalos de temperatura son organismos diferentes.

Montalvo y Guerrero (2003) han definido dos zonas óptimas de trabajo donde pueden efectuarse satisfactoriamente la anaerobiosis de aguas residuales, ellas son la mesófila y la termófila; con un

valor óptimo de 35 y 55°C respectivamente. La actividad y el crecimiento de las bacterias disminuyen en un 50% por cada 10° C de descenso por debajo de 35°C y no es aconsejable aumentar la temperatura por encima de 55°C, ya que a temperaturas más altas ocurre un rápido deterioro de los procesos metabólicos que ocurren en las bacterias (Zegers, 1987; Elías, 1992).

II.2 Reactores anaerobios.

El desarrollo de la tecnología de tratamiento anaerobio se enmarca en tres generaciones de reactores anaerobios: los reactores de primera, segunda y tercera generación. Los de primera generación son aquellos en los que la biomasa se encuentra sedimentada o en suspensión, con un mínimo de contacto con el sustrato. Los reactores de segunda generación se caracterizan porque los microorganismos son retenidos en el reactor, ya sea por la presencia de un soporte al que se adhieren (arcilla, zeolita, perlas de vidrio, aros de bambú o de algún plástico) o por sedimentación. Los de tercera generación se caracterizan por contener los microorganismos en forma de aglomerados o biopelículas adheridas a soportes, los cuales son expandidos o fluidificados (van Lier y col, 2001)

Los reactores de segunda generación son los que más se han aplicado y se comercializan para el tratamiento de aguas residuales por sus bajos tiempos de permanencia del residual en su interior que permiten procesar en poco tiempo grandes volúmenes. Dentro de esta generación se destacan los reactores UASB por ser los de mayor aplicación a escala real (Kleerebenzem y col., 2003).

II.2.1 Reactor de Flujo Ascendente con Manto de Lodo (UASB).

A partir de la década de los 70 del siglo XX, se comenzaron a emplear los reactores de Flujo Ascendente con Manto de Lodo (UASB) para el tratamiento de las aguas residuales (Lettinga, 1996, Uyanik, 2003), tanto industriales de alta carga, así como domésticas de baja carga (Torkian y col., 2003; Ghangrekar y col., 2007), y su funcionamiento y construcción es relativamente simple (Mai y col., 2002). Esta tecnología es relativamente poco costosa, por lo que se ha convertido en una alternativa prometedora para países desarrollados y en vías de desarrollo.

Entre las desventajas que ofrece el empleo de estos reactores, es la necesidad de un postratamiento para lograr una mayor reducción de los contaminantes presentes antes del vertimiento del agua residual. Por otro lado, sólo se logra la remoción parcial de agentes patógenos y huevos de helmintos, que quedan capturados en la cama de lodo. Otra desventaja a la que hay que prestar atención para su solución está dado en los largos tiempos de arranque, debido al lento crecimiento de los organismos metanogénicos (Seghezzo y col., 1998).

La formación y desarrollo de lodos granulares es de gran utilidad para continuar la generalización de la tecnología con UASB, al constituir el corazón de la misma (Field, 2003). Existen otros reactores que basan su funcionamiento en la formación de gránulos anaerobios como son los reactores de lecho granular expandido (EGSB) y los reactores de circulación interna (IC), los cuales pueden ser considerados como variantes de reactores UASB y que se encuentran en proceso de estudio su implementación a escala industrial.

II.3 Proceso de granulación anaerobia.

El lodo granular, variante particular de lodo anaerobio, se observó por primera vez en el año 1976 durante el funcionamiento de una planta piloto (Lettinga y col., 1991). Desde entonces, se le ha dado un enfoque especial al desarrollo del lodo granular en reactores UASB que tratan diferentes tipos de aguas residuales, por las ventajas que proporciona al sistema esta estructura al permitir retener altas concentraciones de lodo (Figura 2).

Un lodo granular es un agregado de microorganismos que se forma durante el tratamiento del agua residual en un ambiente con un régimen hidráulico de flujo ascendente constante, en ausencia de cualquier soporte de apoyo. Las condiciones de flujo crean un ambiente selectivo donde solo los microorganismos, capaces de adherirse entre sí, sobreviven y proliferan. Cada gránulo es una "metrópoli enorme de microbios" que contienen billones de células individuales y quizás de miles a millones de especies diferentes. Debido al gran tamaño de las partículas que forman (generalmente de 0.5 a 5 mm de diámetro), los gránulos resisten el lavado del reactor, permitiendo las altas cargas hidráulicas (Hulshoff y col., 2004, Ghangrekar y col. 2007). Adicionalmente, las biopelículas compactas de gránulos permiten altas concentraciones de microorganismos activos y también con ello, las altas cargas orgánicas que se manejan en reactores UASB y EGSB.

Uyanik (2003) ha definido el fenómeno de la granulación como el proceso donde una biomasa floculenta no definida, empieza a formar conglomerados que varían en dimensión y apariencia, según las características del agua residual y las condiciones del reactor, aunque generalmente tienen una geometría esférica. El mecanismo de la granulación de la biomasa en reactores anaerobios ha sido ampliamente estudiado con la esperanza de poder manipular el ritmo y la extensión de la formación del gránulo (Thaveesri, 1995).

La formación de esta estructura en un reactor UASB involucra procesos microbiológicos y fisicoquímicos entre las células, e interacciones de estas con los factores medioambientales (nutrientes, fuerzas hidráulicas debido al flujo y producción de gas, temperatura y pH).

La biomasa granular tiene varias ventajas ingenieriles con respecto a los lodos floculentos, como por ejemplo, un elevado tiempo de retención de sólidos, debido a su excelente velocidad de sedimentación, provee una máxima concentración de microorganismos en relación al espacio y la posibilidad de aplicar altas velocidades de carga orgánica. Además de observarse como una estructura estratificada bien definida (Ong y col, 2002; Ghangrekar y col. 2005) con elevada actividad metanogénica (Mirsepasi y col, 2006).

II.3.1 Factores que inciden en la granulación

II. 3.1.1 Microbiología del proceso

El fenómeno de la granulación es explicado por diferentes teorías, que de manera integrada muestran los principales factores microbianos de influencia en el proceso, aparejado a las

condiciones que prevalecen en el reactor (hidrodinámica, concentración del sustrato, temperatura, tiempo de retención de sólidos, etc.), los cuales contribuyen a una mayor comprensión de cómo ocurre la formación del gránulo anaerobio (Liu y col., 2003; Pires y col. 2005).

Desde este enfoque la granulación del lodo en reactores UASB se explica por el predominio de las bacterias *Methanothrix*. Por consiguiente, cuando la concentración relativa de poblaciones de estas no es lo suficientemente alta, se impone una fuerte selección alrededor de las bacterias. Para ello se usan bajas concentraciones de acetato durante la fase de arranque porque, las bacterias *Methanothrix* muestran una mayor afinidad por el acetato que las *Methanosarcina*, que también pueden estar presente. De manera que visto el proceso de granulación desde un ángulo ecológico, se ha propuesto la idea de la importancia del predominio de dos bacterias fundamentalmente en la formación del gránulo: *Methanothrix* y *Methanosarcina* (Hulshoff y col., 2004).

Según Wiegant (1987) quien propuso la Teoría del *Spaghetti*, la formación del gránulo se divide en:

1. Formación de los precursores
2. Crecimiento de los gránulos a partir de los precursores.

La primera etapa es considerada la parte más crucial de la formación del gránulo ya que inicialmente, las bacterias *Methanothrix* forman agregados muy pequeños debido a la turbulencia generada por la producción de gas, o por unión a la materia finalmente dispersada. En este caso la concentración de los sólidos suspendidos no debe ser muy alta. De manera que los agregados de *Methanothrix* funcionan como centro de nucleación que inician el desarrollo de los gránulos.

Desde el punto de vista fisiológico, la granulación depende de *Methanobacterium* AZ (Sam-Soon y col., 1988) un microorganismo que utiliza hidrógeno como fuente de energía y puede producir todos sus aminoácidos a excepción de la cisteína. En un medio de alta presión parcial de hidrógeno, es decir, exceso de este sustrato, se verá estimulado el crecimiento celular y la producción de aminoácidos. Sin embargo, como *Methanobacterium* AZ no puede producir el aminoácido esencial cisteína, la síntesis celular sería limitada a razón de dicho suministro. Adicionalmente, si el amonio está disponible, habrá una alta producción de otros aminoácidos, que *Methanobacterium* AZ excreta como polipéptidos extracelulares, que la unen a *Methanobacterium* AZ y otras bacterias, para formar los gránulos. Se admite además la posibilidad de que otras bacterias anaerobias puedan tener características similares a *Methanobacterium* AZ y contribuir a la formación del gránulo.

El desarrollo de las bacterias acidogénicas y sintróficas favorece el crecimiento de los gránulos. En principio ocurre un cubrimiento de los filamentos de las bacterias *Methanothrix* por las colonias de cocos o bastones (bacterias acidogénicas), formando microflóculos de 10–50 μm . Luego, estos filamentos debido a su morfología particular y propiedades de superficie, establecen puentes entre varios microflóculos formando los grandes gránulos (>200 μm). Los productores de acetato incluyendo los acetogénicos productores de hidrógeno podrían adherirse a este sistema, proporcionando sustrato a las bacterias *Methanothrix* que junto a organismos consumidores de

hidrógeno, forman una segunda capa alrededor del centro de formación. Las bacterias fermentativas adheridas a este pequeño agregado forman la capa externa del gránulo, que está en contacto con el sustrato de la solución. Este arreglo espacial de los diferentes grupos tróficos a manera de multicapas, propuesto inicialmente por MacLeod y col (1990) y Guiot (1992) garantiza un alto nivel de actividad acetogénica (Figura 3) y el sinergismo entre los grupos microbianos presentes (Speece, 1996).

La selección de los agregados ocurre cuando se impone una velocidad de flujo creciente y una vez que los precursores se forman y se mantienen las características apropiadas, la granulación es inevitable. El crecimiento de las bacterias individuales y el atrapamiento de las bacterias no ligadas, estará dirigido al crecimiento de las partículas precursoras para formar los gránulos; que debido a las fuerzas hidráulicas constantes que provocan el ascenso del biogás adquieren una forma esférica. En esta fase los gránulos todavía presentan una apariencia filamentosa, formada por filamentos muy largos de las bacterias *Methanothrix* que forman envoltorios.

Esta etapa de crecimiento solo es detenida cuando el área de interfase entre las bacterias y el líquido disminuye a un nivel crítico respecto a la hidrólisis y fermentación inicial que tiene lugar en la superficie del gránulo.

En la maduración del gránulo, las colonias bacterianas originales continúan creciendo mientras otras bacterias dispersas pueden adherirse al gránulo embrionario. La transferencia de intermediarios metabólicos determina la distribución de las microcolonias, conduciendo a un agregado bacteriano mejor estructurado como gránulos maduros. Por otro lado, la multiplicación de células bacterianas es controlada por la restricción de espacio. Además, los polímeros extracelulares (ECP) son producidos en grandes cantidades (Weili y col., 2007), causando la hidratación de la superficie del gránulo, protegiéndolo de la presión constante del flujo y de la adhesión a las burbujas de gas evitando la pérdida de la biomasa por flotación, debido a la alta afinidad de los ECP con el agua (hidrofílicos) y la alta hidrofobicidad de las burbujas de gas.

II.3.1.2 Polímeros extracelulares (ECP)

En ambientes acuáticos naturales los microorganismos se organizan en forma de biopelículas, como estrategia de sobrevivencia. Esas biopelículas están constituidas por una comunidad de células adheridas a una superficie inerte (abiótica) o una viva (biótica), seguida por interacciones células_ células para formar capas múltiples de estructura tridimensional, incluyendo canales de agua a través de las cuales ocurre un flujo de nutrientes y metabolitos producidos por los microorganismos. Estas biopelículas son sistemas heterogéneos en las cuales las células bacterianas son embebidas por una matriz de sustancia polimérica extracelulares, parecidas a gel (Costerton y col, 1995; Prescott, 2004; Medigan, 2005).

Los ECP son reconocidos por tener una amplia implicación en la adhesión de las células a las superficies, agregación de las bacterias en flóculos o biopelículas, de manera que son esenciales en la iniciación, formación y estabilidad de los gránulos en un reactor (Hullebusch y col., 2005). Las sustancias poliméricas extracelulares (ECP) han mostrado ser una rica matriz de

exopolisacáridos (EPS), proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos y ácidos húmicos. Debido a que los EPS son el principal componente de las células que conforman los flóculos y biopelículas, se ha sugerido la hipótesis de que estos juegan un papel central en la formación de todos los tipos de biopelículas, incluyendo la granulación (Veiga y col., 1997; McSwain y col., 2005; Miqueleto, 2006; Ratusznei, 2003).

Los ECP participan en el proceso de granulación, pues intervienen tanto en la cohesión como en la adherencia de las células, jugando un papel crucial en el mantenimiento estructural de la integridad de la matriz microbiana, de manera que el bloqueo metabólico de la síntesis de exopolímeros provocaría afectaciones en la agregación microbiana (Figura 4). Por otro lado los polímeros extracelulares pueden cambiar la carga superficial negativa de las bacterias, permitiendo la unión de dos células físicamente próximas, así como con partículas inertes, mediante interacciones más débiles pero no menos efectivas.

Chen y col. (1993), observaron que con el aumento de la carga orgánica se logra un aumento de *Methanosarcina* de forma significativa, así como un incremento de la excreción de ECP con el fin de formar agrupaciones más grandes, con una tendencia ser rellenas por *Methanothrix*. Los polímeros extracelulares bacterianos contribuyen a la adhesión entre las diferentes especies de bacterias metanogénicas y sintróficas acetogénicas presentes en los gránulos.

Otras funciones atribuidas a los agregados celulares son, la formación de una barrera de protección que aumenta la resistencia contra efectos considerados agresivos a las células, retención de agua, absorción de compuestos orgánicos exógenos para la acumulación de nutrientes que provienen del medio, aumento de actividades enzimáticas, así como la digestión de macromoléculas exógenas para adquisición de nutrientes. (Liu y col., 2003; Uyanik, 2003; Mahmoud y col., 2003; Liu y col., 2004).

Un nuevo acercamiento a conceptualizar el papel de los EPS es que ellos permiten una cooperación y una comunicación (*quorum sensing*) entre células y agregados microbiológicos. El sistema de *quorum sensing*, es un mecanismo de regulación que depende de la acumulación en el medio ambiente de una molécula que constituye una señal autoinductora que le permite a la bacteria reconocer una densidad poblacional existente (Laspidou y col., 2002).

La estructura y composición del EPS, depende de muchos factores, tales como especies microbianas presentes, naturaleza del sustrato y condiciones de fermentación. Es importante señalar que la cantidad de EPS sintetizado en una biopelícula esta fuertemente influenciada por la disponibilidad de carbono presente en el sustrato y con balance de masa entre el carbono y el resto de los nutrientes limitantes. La presencia de carbono disponible en exceso y limitaciones de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio promueve la síntesis de EPS (Miqueleto, 2006).

Polímeros sintéticos y naturales.

Liu y col. (2003), han reportado el uso que de forma extensa se hace de polímeros sintéticos en la floculación de las impurezas del agua, lo cual puede promover significativamente la

aglomeración de las partículas. Igualmente, los polímeros sintéticos pueden usarse para acelerar el desarrollo de los gránulos. Por ejemplo, la utilización del quitosano, el cual posee una estructura similar a los polisacáridos, mejoró significativamente la formación de gránulos anaerobios en reactores UASB (El-Mamouni, 1998; Show y col., 2004).

Otro de los polímeros utilizados es el alginato, el cual es extraído fundamentalmente de tres especies de algas marrones. Estas incluyen *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. Otras incluyen *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima* y *Lesonia negrescens*.

El alginato es un copolímero natural de ácido (1-4) β -D-manurónico (D) y α -L-gulurónico (G) (Figura 5), unidos por enlaces glucosídicos y es un polisacárido lineal no ramificado, con una elevada masa molecular que se extrae de las algas pardas (Coradin y col. 2003). La composición y extensión de las secuencias sacarídicas y el peso molecular, determinan las propiedades físicas de los alginatos².

Las unidades G y M se unen en bloques y, como tales, se pueden encontrar tres tipos de bloques: bloques G homopolímeros (GG), bloques M homopolímeros (MM) y bloques heteropolímeros con secuencias alternantes (MG). Las zonas de ácido manurónico son casi planas, con una estructura semejante a una cinta, mientras que las de ácido gulurónico presentan una estructura con entrantes y salientes.

La reactividad con el calcio y la consiguiente capacidad para la formación de geles es una función directa de la longitud de cadena media de los bloques G. Por lo tanto, los alginatos que contienen las fracciones de GG mayores presentan la más alta capacidad para la formación de geles. Esto se deriva inicialmente de la capacidad del catión calcio divalente para ajustarse en las estructuras gulurónicas dando ambos fuerza y flexibilidad. Por consiguiente, esto une las cadenas de alginato mediante la formación de zonas de unión, lo que conduce a la gelación de la solución y a la formación de gránulos.

Las ventajas principales de estos polímeros naturales se deben a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, sin producir toxicidad. Por lo tanto, el alginato se emplea como una matriz de captura para células y enzimas, así como para aditivos farmacéuticos y alimentarios (Bregni y col., 2000; Rossi - Alva y col., 2003 y Sankalia y col., 2004).

II.3.1.3 Factores Biofísicos

Las superficies de las bacterias está cargada negativamente, lo cual no favorece el proceso de granulación en reactores UASB. Una de las posibles vías para favorecer este proceso bajo condiciones de pH adecuadas es la introducción de un ión positivo multivalente, como por ejemplo: el calcio, hierro, aluminio o magnesio, de tal manera que permita reducir la repulsión electrostática entre las bacterias y acelerar el proceso granulación.

La teoría de Derjaguin-Landau y Verwey-Overbeek (DLVO) (Liu y col., 2003; Mahmoud y col., 2003) muestra que cuando dos superficies llevan una misma carga, hay una barrera entre ellos

como una fuerza repulsiva. Esta fuerza podría evitar el acercamiento de una célula a otra. El ión positivo añadido al lodo neutralizaría parcialmente las cargas negativas en las superficies bacterianas, por tanto la repulsión eléctrica entre las bacterias disminuiría, es decir este ión podría comenzar la interacción célula-a-célula que es un paso firme hacia la granulación (Figura 6). También podría comprimir la capa doble para promover la agregación celular y promover a su vez la granulación del lodo uniéndolo a los ECP.

En el proceso de granulación anaerobia se ha propuesto que las partículas de lodo están en continua selección. El modelo de presión de selección sugiere que la agregación microbiana en el reactor UASB puede ser la estrategia de protección eficaz contra las altas presiones de selección. En el reactor UASB, la presión de selección está generalmente creada por el flujo ascendente. La ausencia de granulación anaerobia ha sido observada cuando la presión de selección hidráulica era muy débil.

En condiciones de alta presión de selección, el lodo disperso es lavado, mientras que los componentes pesados pueden ser retenidos en el reactor como se muestra en la Figura 7. Así, el crecimiento del lodo finalmente disperso se minimiza y el crecimiento bacteriano está dirigido a un número limitado de núcleos en crecimiento, que pueden consistir en materiales inorgánicos y orgánicos inertes o a pequeños agregados bacteriano presentes en el lodo. Este aumento del crecimiento de los núcleos es hasta un determinado tamaño, luego las partes separadas del gránulo producen una nueva generación de núcleos en crecimiento. Los gránulos filamentosos existen en las fases iniciales del proceso de granulación y se vuelven densos debido al envejecimiento del proceso. Por otro lado, en condiciones de baja presión de selección el crecimiento tendrá lugar principalmente como biomasa dispersada. En reactores anaerobios, los microorganismos predominantes son *Methanothrix*, que puede formar filamentos muy largos que oscilan entre 200-300 μm (Montalvo y Guerrero, 2003). Cuando estos organismos crecen sin la adhesión a una partícula de soporte sólido para que tenga lugar la unión, entonces será obtenido un entrelazado débil de la estructura de los filamentos, con muy pobres características de sedimentación y el lodo incluso tiende a flotar (Hulshoff, 2004).

III. Materiales y Métodos

En el presente capítulo se expondrán los materiales y las metodologías utilizadas para este trabajo. Para el desarrollo experimental del mismo se utilizaron los materiales y equipos de los laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial y del laboratorio de Medio Ambiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales en la Universidad de Oriente.

III.1 Caracterización y Selección de inóculos

III. 1.1 Fuente de inóculo:

- Lodo de digestión anaerobia (LDA-CEBI): proveniente de un reactor anaerobio convencional de 1.2 m³ del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente, alimentado con estiércol vacuno fresco proveniente de la Finca Clotilde.
- Lodo Granular (LG): donado por los investigadores del Laboratorio de Tratamiento de Aguas de la Universidad Autónoma Metropolitana de México, utilizado solo para comparar con algunas de las características mostradas por el inóculo ensayado en continuo.
- Estiércol porcino (FE): tomado de la laguna de estabilización de una granja porcina, en el municipio Salvador en Guantánamo.
- Mezcla de inóculos (M): LDA-CEBI con lodo de la laguna de estabilización de una despulpadora de café, en la proporción 1 parte de lodo de laguna: 2 partes de lodo digerido (LDA-CEBI).

III.1.2 Caracterización

III.1.2.1 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV).

La determinación de los sólidos suspendidos (SSV) es un método indirecto para estimar la concentración de la biomasa. Se filtró al vacío un volumen determinado de muestra, empleando papel de filtro de lanas de vidrio, luego se secó en una estufa a 105 °C hasta lograr un peso constante, para cuantificar de este modo los sólidos suspendidos totales. Posteriormente las muestras se calcinaron a 550 °C por 30 minutos, repitiendo hasta peso constante, para conocer el contenido de sólidos fijos. La concentración de sólidos suspendidos volátiles se obtuvo de la diferencia entre los totales y los fijos (APHA, 1998).

III.1.2.2 Actividad Metanogénica Específica (AME).

Para evaluar la actividad metanogénica de los inóculos, se realiza una cinética en botellas serológicas con un volumen de 500 mL (Anexo 1). Para ello se adicionó en las botellas 50 mL de inóculo y 450 mL de medio de cultivo reportado por Balch y col. 1979, usando como fuente de carbono: acetato de sodio/NaOH para determinar la actividad de las bacterias metanogénicas acetoclásticas, glucosa/NaOH para bacterias metanogénicas totales y glucosa/H₂O para evaluar la actividad de la población microbiana total productora de biogás.

En todos los casos las determinaciones se hacen por triplicado y se mantienen a temperatura entre 27-30 °C. Se toma como variable de respuesta la producción de metano en el tiempo, la cual se mide por el volumen desplazado de una solución de NaOH al 5 %. Este parámetro generalmente se expresa como kg DQO/ kg SSV * d. y se calcula a través de la siguiente expresión (Suyén y col, 2000b):

$$AME = \left(\frac{(R * 24)}{(FC * V * SSV)} \right) \quad (1)$$

Donde: R= velocidad de producción de metano CH₄/h

24= h/d

FC= Factor de conversión en (0.382 L CH₄/g DQO)

V= Volumen efectivo líquido en el digestor (L)

SSV= Concentración del lodo (g /L)

III.1.2.3 Índice Volumétrico de Lodo (IVL).

Para su determinación se emplea la metodología propuesta por Montalvo y Guerrero (2003). El IVL es igual al volumen de lodo sedimentado dividido por los sólidos suspendidos totales (SST).

III.2 Residual

El agua residual empleada para el trabajo experimental fue la vinaza de destilería. La misma proviene del proceso de fermentación de las mieles finales o melasas para obtención de alcohol, en la destilería Cubaron SA de la Provincia Santiago de Cuba.

III.3 Ensayos para evaluar la degradación de la vinaza de destilería en sistema batch con recirculación.

III.3.1 Reactor y condiciones de arranque.

El experimento se desarrolló en prototipos de reactores UASB de 1.84 L que se muestra en la Figura.8, diseñado por investigadores del CEBI y construido en los Talleres de Inversiones de la Universidad de Oriente con acrílico transparente. El mismo consiste en un recipiente cilíndrico que es alimentado por un orificio situado en la base del cilindro. En la parte superior del reactor existe un embudo de plástico que realiza la separación gas-sólido-líquido. Las burbujas de gas y los sólidos arrastrados, son desviados hacia el separador mediante un deflector en forma de anillo colocado en todo el perímetro interno a 1cm por debajo del separador. En esta sección el agua fluye entre el separador y la pared del reactor.

En estos prototipos de laboratorios se desarrollan los estudios de selección y adaptación del inóculo y el seguimiento de estrategias de tratamiento, con el fin de seleccionar las mejores condiciones para favorecer el proceso de granulación. Se garantizó que la concentración de inóculo dentro del reactor, superara la concentración mínima recomendada de 10-20 g SSV/L (Montalvo y col,

2003) en la zona de lodos. El reactor fue alimentado con vinaza de destilería y una vez cargado, se mantuvo en batch (sin recirculación) durante un tiempo de dos semanas hasta que se alcanzara un porcentaje de remoción de la DQO superior al 60 %. También se controló diariamente el pH del medio. Pasado este tiempo fueron fijados algunos parámetros para el trabajo en batch con recirculación de todo el efluente, los cuales se describen a continuación:

- _ Temperatura: 25 - 30 °C
- _ pH de trabajo: 7 (ajustado con NaHCO_3).
- _ Velocidad Ascensional: 0.4_0.5 m/h

Para calcular el % de remoción de la DQO usando la siguiente expresión:

$$\% R_{DQO} = 100 * (DQO_i - DQO_f) / DQO_i \quad (2)$$

Donde: DQO_i : DQO del residual al comienzo
 DQO_f : DQO del residual al final

III.3.2 Parámetros Monitoreados

III.3.2.1 Demanda Química de Oxígeno

La DQO es la medida del oxígeno requerido para oxidar todos los compuestos tanto orgánicos como inorgánicos presentes en aguas contaminadas. Su determinación se realiza a través de la acción de agentes fuertemente oxidantes y en medio ácido. En esta experimentación se utilizó la técnica de digestión por reflujo cerrado (APHA, 1998).

III.3.2.2 pH

El pH se midió diariamente tanto en el influente como en el efluente con el empleo de pH- metro (MLW AT3)

III.3.2.3 Relación de alcalinidad

La relación de alcalinidad es una relación entre los ácidos grasos volátiles (AGVs) formados durante la digestión anaerobia y los carbonatos empleados para amortiguar el pH del reactor (Rodríguez, 2000). En la alcalinidad contribuyen principalmente los iones carbonatos CO_3H^- , carbonato CO_3^- y oxidrilo OH^- (APHA, 1998). Para su determinación se tomaron 25 mL del efluente y se añadió una solución de 0.02 N de H_2SO_4 hasta un pH de 5.75 y posteriormente hasta pH 4.3. Luego se midieron en bureta los volúmenes consumidos lo que permitió calcular la relación de alcalinidad, con el empleo de la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{\text{Alc.}(\text{HCO}_3^-)_{5.75}}{\text{Alc.}(\text{Total})_{4.3}} \quad (3)$$

Donde:

Alc (HCO₃⁻)_{5.75}: mL de ácido consumido para llevar el pH inicial a 5.75

Alc (total)_{4.3}: mL de ácido consumido para llevar el pH inicial a 4.3

III.4 Análisis Microbiológico.

El análisis microbiológico permitió la observación de los tipos morfológicos presentes en el inóculo. Para ello fueron empleados un microscopio óptico (NOVEL); y un microscopio estereoscópico (ZEISS) con cámara digital acoplada. Las muestras fueron observadas en láminas de vidrio cubiertas con una fina película de agar al 2 %.

III. 4 .1 Tinción de Gram

El análisis de la coloración de Gram se basa en la composición química y la integridad de la célula, para ello se siguió la metodología descrita en Martínez y col.(1985).

III.5 Determinación de la concentración de Polímeros Extracelulares (ECP).

Para la extracción de los polisacáridos y proteínas extracelulares a partir de los inóculos, se siguió una modificación del método descrito por Grotenhuis y col. (1991) el cual se describe a continuación: Las muestras de inóculo extraídas del reactor fueron lavadas minuciosamente para eliminar vestigios del residual. Luego de sedimentado el lodo, se eliminó el agua restante y se tomaron muestras para su análisis

La extracción de los exopolisacáridos extracelular y proteínas solubles, presentes en el inóculo se realizó a partir de la toma de un volumen de muestra de 10 mL, el cual se diluyó con un volumen de 40 mL de agua a una temperatura de 40 °C. Las muestras fueron suavemente homogenizadas con el uso de una jeringuilla de 10 mL de capacidad, a través de continuos procesos de aspiración y eyección de la suspensión, durante un tiempo de 3 minutos. Parte de la suspensión (10 mL), fue centrifugada durante 15 min a 4000 rpm y el sobrenadante se utilizó para determinar los componentes extracelulares (Fracción 1).

III.5.1 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas solubles se realizó empleando el método de Lowry y col.(1951), usando Seroalbúmina Bovina (BSA) como patrón. Este método se basa en la combinación de los enlaces peptídicos y los iones cúpricos que reaccionan entre sí formando un complejo coloreado azul. Con este método los grupos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano reaccionan con el reactivo de Folin -Ciocalteau para formar el complejo.

III.5.2 Determinación de carbohidratos totales

Para la determinación de los carbohidratos totales, se empleó el método del Fenol - Sulfúrico descrito por Dubois y col. (1956); el cual se fundamenta en la deshidratación e hidrólisis de los

anillos furanósicos y piranósicos constituyentes de los carbohidratos, los cuales reaccionan con el fenol dando un complejo de color amarillo anaranjado.

III.5.3 Determinación de ácidos nucleicos.

El análisis del contenido de ácidos nucleicos fue determinado en las muestras secas maceradas y sin macerar, siguiendo la metodología descrita por Otero (1985) y se calculó con el empleo de la siguiente expresión:

$$\% \text{ de Ácidos Nucleicos} = \frac{250 \text{ (mL)} * D * 100 * 100}{16.3 * PM \text{ (g)} * 1000 * MS \text{ (g)}} \quad (4)$$

Donde: D = diferencia de lectura $DO_{270} - DO_{290}$

1000 = Conversión de mL a L

PM = Peso inicial de la muestra

100 = Para expresar en % los ácidos nucleicos

100 = % de materia seca

16.3 = Factor de conversión

III.6. Análisis estadístico de los resultados

Para la realización del procesamiento estadístico de los datos obtenidos, se empleó el programa computacional Statgraphics Plus sistema para Windows. La comparación de dos muestras fue realizada a través de un Test t de Student y en el caso de muestras múltiples se utilizó un ANOVA de Clasificación simple (Tipo I) y una comparación de medias *a posteriori* a través de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Para todos los casos se utilizó un $\alpha = 0.05$.

IV. Resultados y Discusión.

IV.1 Características de la vinaza y de las fuentes de inóculos

Los sistemas de depuración biológica, que emplean el metabolismo anaerobio, son los más recomendables para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica (Rivera y col, 2002, Montalvo y col, 2003). Dentro de ellos los reactores UASB son a los que más se recurren pues la formación de flóculos o gránulos en el interior de este permite aumentar el contacto entre los microorganismos y el agua residual a tratar, además de disponer de una alta concentración de biomasa y una elevada diversidad microbiana (Pires y col., 2005).

La caracterización de un residual es el punto de partida para la comparación de tratamientos, establecimiento de estrategias basadas en procedimientos ya conocidos o nuevas propuestas; así como, la comparación con normas existentes, que permiten evaluar el daño que pueden provocar (Rodríguez, 2006).

Las aguas residuales de destilería de alcohol constituyen una importante fuente de contaminación y se caracterizan por ser un líquido brillante, con partículas en suspensión, olor característico a miel de caña y sabor a malta. Como se puede observar en la Tabla 2, este residual presenta valores de pH muy bajos, sólidos en concentración apreciable y la materia orgánica por encima de 5 g/L de DQO, considerada como alta.

El hecho de presentar casi toda su DQO en forma soluble, la hacen susceptible de ser biodegradada por vía anaerobia, amén de las altas cargas que presenta que hacen el tratamiento aerobio muy costoso (Rodríguez, 2000).

La selección del inóculo constituye uno de los primeros pasos para realizar un tratamiento biológico a un agua residual y de ello depende mantener las condiciones de estabilidad operacional del reactor. Las características intrínsecas del inóculo, como la presencia de un consorcio bacteriano balanceado que le permita su adaptación al medio sin mayores cambios, son de vital importancia para llegar a la formación de gránulos activos y estables en reactores UASB; además de lograr la consecuente disminución de la carga orgánica contaminante durante el tratamiento.

El hecho de seleccionar un lodo proveniente de fuentes naturales como inóculo, aunque reduce los costos, exige conocer la composición del mismo para detectar y eliminar aquellos elementos que puedan afectar el proceso de tratamiento y aprovechar las ventajas que nos brinde el consorcio microbiano que posea.

Entre las fuentes de inóculo con mayor disponibilidad en nuestra región se encuentran: el estiércol vacuno, los lodos de sistema de tratamiento de estiércol porcino y los lodos provenientes de las lagunas de estabilización de residuales agroindustriales

El estiércol vacuno posee un alto contenido de bacterias anaerobias metanogénicas; lo que constituye una característica muy favorable. Sin embargo el mismo posee la desventaja de tener un alto contenido de material lignocelulósico, lo que tiende a flotar dentro del reactor provocando problemas operacionales a causa de obstrucciones en el sistema. Otro aspecto es que las bacterias metanogénicas predominantes en este tipo de inóculo, son las hidrogenofílicas que provienen del sistema digestivo de rumiantes. Por esto es recomendable no tomar dicho inóculo directamente del medio natural, sino proveniente de un digestor que esté en funcionamiento alimentado con dicho estiércol; lo que proporcionará un inóculo con microorganismos adaptados y con la menor cantidad de material lignocelulósico (Terry y col., 2008).

Los lodos de sistemas de tratamiento de estiércol porcino, pudieran ser tomados de una laguna de estabilización de una granja porcina. Además, debido a que en estos momentos se ha establecido una estrategia por parte del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente que exige la construcción de lagunas de estabilización asociadas a cualquier centro porcino, permite una mayor disponibilidad de esta fuente.

Los lodos provenientes de las lagunas de estabilización de residuales agroindustriales, como es el caso de la industria azucarera y la cafetalera, también pueden ser empleados para este proceso. Con mayor preferencia se escogen aquellas en las cuales se ha tratado el mismo residual, en todos los casos, la recolección del inóculo debe realizarse asegurando las condiciones de anaerobiosis para evitar el efecto tóxico que el oxígeno molecular pudiera ejercer sobre las bacterias anaerobias. La toma del inóculo no debe realizarse muy cercano a los límites de la laguna pues existe la probabilidad de arrastrar el material inerte (arcilla y arena), los cuales contribuyen de igual manera al mal funcionamiento del reactor, recomendando las lagunas que posean algún sistema de impermeabilización (Terry y col., 2005).

El proceso de digestión anaerobia se puede mejorar empleando mezclas de inóculos que asegurarían presentar una mayor diversidad microbiana adaptada a diversos sustratos; lo que garantiza la disminución del período de arranque y puesta en marcha del reactor, así como la disminución del tiempo requerido para la granulación. Por lo que el empleo de mezclas de inóculos tal como lo sugieren Weiland y col. (1991), es recomendable para mejorar la eficiencia del proceso.

En este estudio se trabajó, teniendo en cuenta los criterios anteriores con tres inóculos: Estiércol vacuno digerido en un reactor anaerobio de primera generación (LDA-CEBI), Estiércol porcino (FE) y Mezcla de inóculos provenientes de una laguna de estabilización y estiércol digerido (M).

IV.1.1. Caracterización y selección de inóculos.

Entre los parámetros indispensables que se deben tener en cuenta para conocer la calidad de los inóculos, se encuentran el Índice Volumétrico de Sedimentación (IVL) y la Actividad Metanogénica Específica (AME). El primero de ellos muestra características propiamente físicas y el segundo, expresa las características metabólicas de los microorganismos presentes.

Para la determinación de ambos parámetros es necesario conocer el contenido de los sólidos suspendidos presentes en las muestras, lo que también puede ser empleado como criterio de selección de un inóculo. Según Elías (1992), para el iniciar el arranque de un reactor UASB se debe cargar con la cantidad de lodos necesaria que asegure una concentración mínima de sólidos suspendidos volátiles de alrededor de 10-20 Kg SSV/m³ en la zona de lodos. En general, mientras más inóculo se utilice, mayor será la carga de arranque de los reactores con lodo no granular, lo que no debe sobrepasar el 50 % del volumen útil del reactor.

Las concentraciones de sólidos suspendidos observadas en las variantes de inóculo FE, M y LDA-CEBI, son representadas en la Tabla 3. Como se puede observar la variante de inóculo M posee la mayor concentración de SSV, siendo el mismo de 53,16 g/L. Sin embargo las otras dos fuentes ensayadas poseen valores que no alcanzan los requerimientos en cuanto a la concentración de sólidos suspendidos, necesaria para el adecuado arranque de un reactor UASB. De manera que se necesita el doble del volumen de inóculo si se emplearan FE o LDA – CEBI, comparado con M; reduciendo el volumen útil del reactor.

Es importante conocer la relación de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST) presentes en el inóculo, debido a que una mayor concentración de SSV, nos da indicio de la presencia de microorganismos; los cuales son el núcleo del proceso de granulación. Todos los inóculos presentan valores superiores a 0,5 constituyendo un aspecto favorable en sus características. El LDA – CEBI, muestra un valor significativamente superior al resto, lo que puede estar influenciado por la presencia de material lignocelulósico aún sin degradar.

Ghangrekar (2005), observó que la proporción de sólidos suspendidos volátiles con respecto a la cantidad de sólidos suspendidos totales superiores a 0,4 favorece la granulación, cuando se trabaja con un lodo no granular. El mismo autor recomienda que se establezca un equilibrio para este factor puesto que la presencia de material sólido inerte favorece los procesos anaerobios debido a que permiten que los microorganismos se adhieran a estos, formándose aglomeraciones de bacterias que van a actuar sobre la materia orgánica presente en el agua residual y que además, estos sólidos permitan el atrapamiento de parte del material orgánico a biodegradar, exponiéndolos más a la acción de los microorganismos presentes.

La actividad metanogénica es el parámetro fundamental a la hora de seleccionar un inóculo. La misma representa la capacidad que posee la población de metanógenos de transformar la materia orgánica presente en el residual hasta metano. Este parámetro fue evaluado en las tres fuentes de inóculo (Tabla 3). El análisis estadístico arrojó no existencia de diferencias significativas, por lo que los tres inóculos poseen similares actividades.

Para el arranque de un reactor anaerobio, es conveniente contar con lodos granulares proveniente de un reactor en funcionamiento, ya que presentan valores de actividad metanogénica elevados, en un rango de 0,3–1,5 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d (Ghangrekar y col., 2007), aunque Hulshoff y col (2004), reportaron actividades de hasta 2 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d.

En nuestro país no contamos con plantas industriales del tipo UASB que permitan la obtención de una “semilla” para el arranque, por lo que se hace necesario emplear fuentes naturales no granulares lo que refuerza la importancia de la realización de estudios a escala de laboratorio y el diseño de una estrategia adecuada. Los valores de AME determinados, se encuentran por debajo del valor recomendado para el arranque de un reactor (0,2 - 0,5 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d), lo que requiere de la estimulación del inóculo antes de ser utilizado. No obstante, los valores obtenidos coinciden con los reportados por Elías (1992), quien establece un rango de actividad para lodos desde 0,001 hasta 0,08 para estiércol porcino, lagunas anaerobias y estiércol digerido.

Debido a que la sedimentabilidad es una característica que permite medir la capacidad de retención del lodo, el índice volumétrico de lodo (IVL) es una variable importante en la evaluación de la calidad de los lodos anaerobios. Las propiedades de sedimentación del lodo determinan la concentración del lodo en la zona dispersa del reactor. Los mejores valores de índice volumétrico de lodos reportados, se encuentran en un rango de 10–20 mL/g (Montalvo y col., 2003; Ghangrekar y col., 2007). Estas características son mostradas en la Tabla 3.

El IVL se define como el volumen que ocupa 1g de licor mezclado o líquido en un reactor. Mientras menores sea su valor, permitirá aumentar el caudal de alimentación; es decir, trabajar con altas velocidades ascendentes, sin correr el riesgo de que el inóculo pueda ser arrastrado. Aún cuando la variante de inóculo M (mezcla de LDA - CEBI con lodo de la laguna de estabilización de una despulpadora de café) posee el menor valor de IVL, ninguno de los valores observados se encuentra comprendido en el rango favorable para un reactor UASB; el que se encuentra entre 10 - 20 mL/g para un lodo granular (Montalvo y col., 2003).

Haciendo un resumen de las evaluaciones realizadas se confirmó que las fuentes de inóculo evaluadas, las cuales son representativas de las existentes en el territorio, no poseen las características adecuadas para el funcionamiento de un reactor UASB.

Estos resultados sugieren la necesidad del empleo de estrategias de trabajo que permitan mejorar las características de sedimentación de los inóculos, así como mejorar la AME; siendo este último un criterio selectivo mucho más riguroso para la selección de un inóculo. Además de la adición de un sustrato que favorece la metanogénesis, otras variantes a desarrollar son la recirculación de la biomasa y la adición de polímeros sintéticos

IV. 2 Arranque y funcionamiento del reactor UASB a escala de laboratorio.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente planteado, se seleccionó el LDA – CEBI para continuar el estudio al ser el que presenta los peores resultados en la caracterización, permitiendo evaluar la eficacia de la estrategia que se diseñe.

Para el arranque del reactor UASB se estableció un régimen de funcionamiento en batch con recirculación del volumen total del efluente por un tiempo de ciclo de 4 días.

El prolongado tiempo de duplicación de las bacterias metanogénicas constituye la causa por la que, en sus comienzos, el proceso de degradación anaerobia estuvo limitado en sus aplicaciones.

Esta es la razón principal de la importancia del desarrollo de métodos de retención de biomasa en reactores anaerobios. El tiempo de duplicación de estas bacterias es de 2 a 4 días en rango de temperatura mesofílico, cuando la temperatura aumenta el valor es menor. Para lograr una operación estable del reactor se requieren tiempos de retención hidráulica aproximadamente dos veces el tiempo de duplicación de los microorganismos, de lo contrario esto puede provocar el lavado de las bacterias metanogénicas pues el proceso transcurre más rápido que lo que ellas pueden regenerarse (Lawrence, 1980).

La recirculación del efluente desde el punto de vista operacional en un reactor UASB, se recomienda cuando se tienen aguas residuales con altas concentraciones y el objetivo es la dilución del nivel de DQO a valores por debajo de 15 g/L. Con la misma también se ha logrado la disminución de la toxicidad de ciertos compuestos, pues se mejora el contacto del lodo con el agua residual que contiene el tóxico y se favorece la granulación y adaptación del lodo. Otra importante ventaja de la recirculación es que se aprovecha en la corriente de entrada la alcalinidad producida por el mismo reactor, lo que contribuye a una mayor estabilidad del proceso, resistencia a choques de pH y de carga orgánica, además de reducir los posibles consumos de reactivos alcalinos (Rodríguez, 2000a).

Las experiencias de [Nadai y col. \(2006\)](#) indican que la recirculación de efluentes tiene efectos beneficiosos si es aplicada durante el período de la estabilización en reactores UASB, observándose un aumento de la metanización cuando los mismos son inoculados con lodos floculentos. En reactores inoculados con lodos pocos sedimentables es necesario reducir la pérdida de biomasa en el efluente, lo que puede lograrse con la recirculación de más de 2/3 de efluente, permitiendo el aumento de la biomasa y la asociación de la misma en contacto con las partículas inertes.

De igual forma, Ramos y col. (2003) con el empleo de recirculación interna de la fase líquida en la transferencia de masa de un reactor anaerobio de lote secuencial (ASBBR), operado a 30° C utilizando ciclos de 8 h para tratar agua residual sintética con una DQO de 0,5 g/L, lograron un aumento de la eficiencia de remoción a un 87 %.

Al poseer los inóculos disponibles valores de Actividad Metanogénica Específica (AME) muy bajos, así como valores de IVL, que no se encuentran en el rango recomendado la etapa de arranque y puesta en marcha de un reactor UASB en continuo, se empleó como estrategia de trabajo la siguiente:

- Utilizar concentraciones de DQO no mayores de 3,5 g/L, tiempo de permanencia del residual dentro del reactor de 4 días persiguiendo la adaptación del inóculo y velocidad ascensional (velocidad con que el residual pasa a través del reactor) de 0,5 m/h, valor que se encuentra en el rango recomendado para favorecer la granulación de inóculos no granulares en reactores UASB; el cual es de 0,5 a 1 m/h (Brito y col, 1997; Torkian y col, 2003).

Bajo las condiciones anteriormente descritas se realizó el seguimiento del comportamiento del LDA – CEBI, en cuanto a pH, remoción de la DQO y relación de alcalinidad. Cabe mencionar que estos son uno de los parámetros más empleados para el seguimiento de un reactor UASB.

Considerando que en reactores UASB para el desarrollo de agregados microbianos se requieren tiempos entre los 2 a 8 meses (Yu Liu y col., 2003; Weili y col., 2007), se estimó un tiempo de 4 meses de trabajo para evaluar la calidad del inóculo obtenido en base a la AME final y el IVL.

El principal problema que se presenta durante el arranque de reactores UASB, es la acidificación. En reactores acidogénicos el producto de la fermentación más abundante son los AGV. Sin embargo, esto no se presentó durante las diferentes fases en que se operó el reactor con el uso del LDA _ CEBI, lo cual se puede deber a que la relación de alcalinidad (α) del influente es alta, siendo superior a 0,7 (Figura. 9). Según López y col. (2000) consideran este valor de α como recomendable para la estabilidad del proceso anaerobio y muestra la capacidad amortiguadora que tiene el sistema. El 70 % de la relación de alcalinidad está representado por los iones carbonatos, determinándose a partir del volumen de ácido sulfúrico consumido para llevar el pH inicial de la muestra hasta 5.3 unidades y el restante 30 % de α esta representado por los ácidos grasos volátiles, pudiendo ser evaluado midiendo el volumen de ácido consumido para llevar el pH de 5,3 a 4,75.

Se hace conveniente destacar que la relación de alcalinidad no es un parámetro dependiente del pH del medio, sin embargo es de gran importancia su determinación, pues con el se prevé la posible acidificación del reactor, proceso que por demás puede ocurrir bruscamente y que contribuye al deterioro absoluto del inóculo.

Con esta variante de inóculo LDA _ CEBI, se alcanzó un 82,3% de remoción de la DQO al emplear cargas orgánicas de 2,6 g/L observándose en el efluente una concentración de la DQO de 0,47g/L, resultado que van en correspondencia con el bajo valor de AME inicial mostrado por este inóculo, de manera que no es recomendable utilizar concentraciones superiores a 2,6 g/L, pues estudios previos realizados (datos no mostrados) arrojaron que disminuye la eficiencia de remoción en el reactor al tener un efecto de sobrecarga.

Características del inóculo.

De igual manera al final de la experimentación se evaluaron los grupos fisiológicos de mayor incidencia en el tratamiento anaerobio de la vinaza, al emplear como sustratos el acetato de sodio; principal fuente de carbono para bacterias metanogénicas del tipo acetoclástica y la glucosa, sustrato de fácil degradación que permite evaluar la actividad metanogénica global o total, donde participan tanto bacterias metanogénicas acetoclástica como hidrogenofilicas.

Durante el ensayo se observó que la población de bacterias metanogénicas del tipo acetoclástica representa aproximadamente el 74 % de la población de las bacterias metanogénicas, siendo sus valores respectivos de AME de 0,211 y 0,286 kgDQO - CH₄/ kgSSV*d. Estas últimas representan el 75 % de la población microbiana anaerobia total presente en el inóculo con un valor de actividad de 0,38 kgDQO - biogás/ kgSSV*d, lo que indica que del biogás producido más de 60 % está formado por metano, aspecto este de gran importancia desde el punto de vista operacional que permite evaluar el comportamiento del reactor e incluso la diversificación de la

tecnología, ya que para que el biogás sea combustible es necesario que exista más del 55 % en forma de CH₄.

A pesar de que los valores finales de AME alcanzados pueden ser considerados como buenos para lograr un exitoso arranque de un reactor UASB en continuo, aún el Índice Volumétrico de Sedimentación no es el recomendado para este fin, siendo el valor final de 54.27 mL/g SST

Una vez transcurrido el tiempo estimado para evaluar las características microbiológicas de las poblaciones microbianas desarrolladas durante el funcionamiento del reactor, se comenzó el análisis microbiológico a través de la microscopía óptica, observándose bacilos Gram negativos con extremos curvos, bacilos largos y con gránulos intracelulares (Figura 10). Esto sugiere la presencia en el inóculo de bacterias del género *Methanothrix*, las cuales se caracterizan por poseer forma bacilar, lo cual contribuyen a la formación de agregados filamentosos en las primeras etapas de formación de gránulos o flóculos microbianos (Pires y col., 2005).

El predominio de este grupo morfológico de bacterias Gram negativas en el inóculo luego del tratamiento de la vinaza de destilería; residual con un alto contenido de carbohidratos, se corresponde con los criterios establecidos por Lasa y col. (2005) quienes comentan que proceso de formación de las biopelículas es controlado por una cascada completa de reguladores, donde el sistema de *quórum sensing* depende de la acumulación en el cultivo de una molécula señal inductora, que permite a las bacterias responder a la densidad poblacional existente. Para que haya una prevalencia de bacterias Gram negativas el principal inductor es la acil homoserinolactona, sin embargo cuanto las moléculas autoinductora son péptidos, hay una elevada concentración de bacterias Gram positivas. De tal manera que en el medio extracelular se acumula una cantidad de autoinductor, este activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando distintos fenotipos.

La observación al microscopio estereoscopio reveló la formación de agregados, aún con una estructura dispersa no granular, la cual se muestra en la Figura 11 lo cual indica que para inóculos dispersos con tan malas características se hace necesario mayor tiempo de exposición a presiones selectivas dentro del reactor, que favorezcan el mejoramiento de las características del inóculo.

Determinación de Polímeros Extracelulares (ECP) y Ácidos nucleicos

Los polímeros extracelulares están constituidos por una mezcla compleja de sustancias poliméricas excretadas por los microorganismos, productos de hidrólisis y de lisis celular, así como compuestos orgánicos importantes adsorbidos a partir del agua residual. El papel exacto de formación de ECP y las funciones de cada componente no son aún bien conocidos, pero estudios anteriores (Wilén y col., 2003) señalan que las proteínas, sustancias húmicas e hidratos de carbono afectan la carga superficial, la hidrofobicidad y la viscosidad.

Por otro lado, debido a que la mayoría de los componentes de ECP contiene muchos grupos funcionales (Guibaud y col., 2003), ellos proporcionan gran cantidad de sitios de formación de complejos con metales, formando una gran red polimérica en el que las bacterias o las colonias bacterianas son incluidas. Delia (2003) encontró que la composición de ECP y la cantidad de

sitios de formación de complejos depende del tipo de agua residual y las condiciones operacionales impuestas en el reactor. Reportándose por Liu y Fang (2002), la presencia de carbohidratos como constituyentes predominantes en las sustancias poliméricas extracelulares.

Como se puede apreciar entre las características de la vinaza (Tabla 2) está la presencia de iones metálicos multivalentes, como por ejemplo: Ca, Co, Mg, lo cual pudiera favorecer al la agregación microbiana cambiando la carga superficial de las bacterias a través de la formación de enlaces coordinados entre estos iones, así como entre ellos y los grupos funcionales de los macromoléculas estructurales de las bacterias. Lo cual favorece la formación de una red, que ayudaría al atrapamiento de células aisladas y la formación de agregados celulares.

Según Miqueleto (2006), la cantidad de Exopolisacáridos (EPS) sintetizados por una biopelícula es dependiente de la disponibilidad de carbono en el residual y del balance de masa entre el carbono y otros compuestos limitantes. En presencia de carbono en exceso y limitaciones de nutrientes como nitrógeno, potasio y fósforo, se promueve la síntesis de EPS

Una vez obtenida la Fracción 1; sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación de la muestra de inóculo tratada con agua a 40 °C donde se encuentran los exopolímeros solubles en agua, se procedió a la evaluación de de las concentraciones de carbohidratos y proteínas existentes.

Como resultado se observó que la concentración de carbohidratos superaba a la concentración de proteínas en el LDA, aunque por las características propias de este inóculo la cantidad de carbohidratos presentes es tres veces inferior a la del lodo granular empleado como control durante el ensayo (Tabla 4). Sin embargo a pesar de que la concentración de carbohidratos y proteínas en el Lodo Granular supera la concentración existente en el LDA – CEBI, es apreciable que la relación Carbohidratos / Proteínas para cada una de estos inóculos es básicamente la misma (24:1).

La determinación del contenido de ácidos nucleicos, es considerada como una medida indirecta de la cantidad de células microbianas presentes. En la variante de inóculo LDA - CEBI la población microbiana presente es comparable con la del Lodo Granular pues se observaron valores de 0,013 y 0,012 % de ácidos nucleicos respectivamente, sin embargo por los resultados obtenidos en base a la AME que el mismo expresa, así como la morfología de los agregados celulares observados

A partir de todos los resultados obtenidos fue considerada la posibilidad de evaluar el efecto de la adición de un polímero sintético; en las características del inóculo y su incidencia en el funcionamiento operacional del reactor UASB a escala de laboratorio, pues solo con la recirculación del efluente se logró mejorar las características de la población microbiana presente el inóculo con un incremento de la AME hasta un valor de 0,286 kgDQO - CH₄ / kgSSV * d, pero sin embargo las características de sedimentación no son aún favorables.

IV.3. Arranque y funcionamiento del reactor UASB a escala de laboratorio en batch con recirculación con la adición de alginato de sodio.

Ha sido evaluado por muchos autores la adición de polímeros sintéticos o naturales para favorecer la biomasa granular, variando el tiempo requerido para la formación de biogránulos de la biomasa desde los 5 días (Jeong y col., 2005) hasta los 50 días (Show y col, 2004). La principal función de los aditivos poliméricos es la de neutralizar la carga superficial de la biomasa y eliminación de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre las partículas cercanas o próximas. En ausencia de fuerzas electrostáticas repulsivas, la adhesión entre las partículas pudiera tener lugar debido al incremento de las fuerzas de Van de Waals o de atracción. Esto pudiera reducir el IVL indicando una reducción del volumen de inóculo en el interior del reactor a causa de una condensación debido a la adhesión (Ghangrekar y col., 2007).

Durante el desarrollo de esta etapa experimental, se adicionó durante la alimentación de cada ciclo el alginato de sodio, el mismo fue añadido en una concentración de 1ppm. Dicha concentración fue utilizada tomando como referencia los resultados obtenidos por Ong y col. (2002). Además se tomó una carga contaminante en la alimentación no superior a los 2,6 gDQO/L. y manteniendo las mismas condiciones operacionales de tiempo de retención hidráulica (4 días) en cada ciclo de trabajo y velocidad ascensional de 0.5 m/h

Como se puede apreciar en la Figura 12, inicialmente los valores de relación de alcalinidad fueron demasiados bajos (0,2), lo cual indica que el inóculo no mostró suficiente capacidad para amortiguar la carga y evitar la acidificación del inóculo. El monitoreo del reactor permitió considerar la necesidad de una etapa de estabilización del inóculo en batch sin recirculación, observándose que a partir de los 6 días del reactor en batch sin recirculación la relación de alcalinidad aumento a valores permisible (0,5), pudiendo ser mantenidas las condiciones inicialmente establecidas durante de recirculación.

En el relación al pH (Figura 12), el mismo mostró valores favorables para el proceso de degradación anaerobia, pues se encontró generalmente en el rango óptimo (6,5 – 7,5), con un ligero aumento a partir del día 48 que no supera el rango permisible para que se desarrolle el proceso de digestión anaerobia es decir 6,5 – 8 (van Lier y col., 2001).

Características del inóculo.

Al final del tratamiento de la vinaza de destilería con la adición de alginato, se logró un aumento de la AME total (0,39 kg DQO/ kg SSV*d), con respecto a la AME total del tratamiento sin la adición del polímero (0.29 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d), siendo las misma significativamente superior al se comparados los valores medios de actividad de las dos muestras bajo un *Test t* con un nivel de confianza del 95 %. Este resultado se corresponde además, con el incremento de la eficiencia de remoción de la carga orgánica contaminante (91,6 %) al ser medida la DQO en el efluente, mostrando un valor de 0,11 g/L bajo el tratamiento con la adición de alginato. Este resultado supera los valores de eficiencia de remoción alcanzados inicialmente (82,3 %).

De igual manera bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas, al evaluar el tipo morfológico de bacterias presente en el inóculo una vez culminado el tratamiento, se observaron bacterias Gram negativas la cual coincide con la población inicialmente encontrada en el inóculo luego, resultado que es lógico pues la vinaza tiene un alto contenido de carbohidratos lo que favorece el predominio de este tipo morfológico de bacteria.

La observación al microscopio estereoscopio mostró resultados muy similares entre el tratamiento con la adición de alginato y sin éste, observándose solamente la formación de agregados celulares dispersos. (Figura 13).

Determinación de Polímeros extracelulares (ECP) y Ácidos Nucleicos luego de la adición de alginato

Los resultados arrojaron un incremento de la concentración de carbohidratos en el inóculo, el cual es de 96 mg/L. Este valor es tres veces superior al observado en el tratamiento de la vinaza sin la adición de alginato de sodio (64 mg/L) e igual al Lodo Granular empleado como control (96 mg/L). Por otro lado la concentración de proteínas presente fue de 2,09 mg/L, mostrando una ligera disminución con relación al valor observado inicialmente de 2,67 mg/L cuando el reactor fue operado sin la adición de alginato. Como es posible apreciar la relación Carbohidratos / Proteínas supera la observada inicialmente (24:1), siendo la concentración de carbohidratos 46 veces mayor que la de proteína.

Estos resultados pudieran ser considerados favorables para el proceso de agregación microbiana, pues según los y pudieran estar relacionados con las características propias de la vinaza por ser un agua residual con elevado contenido de carbohidratos, además de la adición de alginato de sodio durante la alimentación del reactor. Por otra parte también se corresponden con lo planteado por Miqueleto (2006), quien asegura que durante el tratamiento de residuales la cantidad de EPS sintetizado en una biopelícula está fuertemente influenciada por la disponibilidad de carbono presente en el sustrato.

Otro de los parámetros determinados en esta etapa experimental fue el torciendo de ácidos nucleicos en la muestra de inóculo, como medida indirecta de la población microbiana presente, siendo su valor de 0,012 lo cual indica que la población se mantuvo básicamente estable.

Los resultados obtenidos en esta etapa de adición de polímeros como estrategia de trabajo para mejorar las características de la biomasa, y por consiguiente el mejoramiento del reactor desde el punto de vista operacional, indican que la adición del mismo mejora las características de la biomasa en cuanto a la AME, la producción de ECP y la eficiencia de remoción de la carga orgánica contaminante, pero sin embargo a pesar de que se logra mejorar el IVL del inóculo el cual es de 43 mL/g, el mismo no alcanza los valores que requiere esta tecnología. Esto indica que este proceso de formación de agregados celulares depende mayormente de las características y la selección del inóculo, así como de las condiciones operacionales impuestas en el reactor.

Tales resultados también fueron observados por Ghangrekar (2008) y col. al evaluar el efecto de la adición de cationes poliméricos en la granulación de la biomasa, así como en la eficiencia de remoción de la carga orgánica durante el tratamiento de aguas residuales de baja fuerza (DQO 300–630 mg/L) ha sido estudiado por y col. en reactores UASB a escala de laboratorio, observando que la formación de un lodo granular a partir de un lodo espeso, depende más de la carga orgánica impuesta en el reactor y la selección del inóculo, que de la propia adición de un polímero catiónico.

Según Ramírez (2008), para lograr la formación de agregados microbianos a manera de gránulos; los cuales poseen las características de sedimentación más favorables para este propósito, también es necesario la presencia de una concentración adecuada de bacterias fermentativas que ayuden a la formación de la capa externa de los gránulos y que suplen de nutrientes a las bacterias metanogénicas. Esto sugiere la no presencia en las cantidades necesarias de este grupo de bacterias por la procedencia del LDA – CEBI, siendo conveniente el uso de una mezcla de éste inóculo con otro proveniente de una planta de tratamiento aerobio, o a partir de sedimentos de un río.

V. Conclusiones

1. Los inóculos ensayados no poseen las características para ser usados directamente en el arranque de un reactor UASB, por lo que deben ser mejorados.
2. Con el establecimiento de la recirculación de la vinaza de destilería como estrategia de trabajo, se alcanzó hasta un 82,3 % de eficiencia de remoción de la carga orgánica, empleando como inóculo el LDA – CEBI, lo cual se corresponde con el aumento de la

AME hasta un valor aproximadamente tres veces superior con respecto a la actividad inicial observada en el inóculo.

3. La adición del polímero sintético de alginato de sodio incrementa la AME hasta un valor de 0,39 kgDQO-CH₄ / kgSSV *d, así como las características de sedimentación del inóculo aunque la misma no alcanza el valor necesario.

VI. Recomendaciones

- Establecer un mayor tiempo de trabajo del reactor para favorecer la formación de agregados.
- Mejorar el diseño de los reactores UASB, de manera que permita evaluar la producción de gas que se genera.

IV. Resultados y Discusión.

IV.1 Características de la vinaza y de las fuentes de inóculos

Los sistemas de depuración biológica, que emplean el metabolismo anaerobio, son los más recomendables para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica (Rivera y col, 2002, Montalvo y col, 2003). Dentro de ellos los reactores UASB son a los que más se recurren pues la formación de flóculos o gránulos en el interior de este permite aumentar el contacto entre los microorganismos y el agua residual a tratar, además de disponer de una alta concentración de biomasa y una elevada diversidad microbiana (Pires y col., 2005).

La caracterización de un residual es el punto de partida para la comparación de tratamientos, establecimiento de estrategias basadas en procedimientos ya conocidos o nuevas propuestas; así como, la comparación con normas existentes, que permiten evaluar el daño que pueden provocar (Rodríguez, 2006).

Las aguas residuales de destilería de alcohol constituyen una importante fuente de contaminación y se caracterizan por ser un líquido brillante, con partículas en suspensión, olor característico a miel de caña y sabor a malta. Como se puede observar en la Tabla 2, este residual presenta valores de pH muy bajos, sólidos en concentración apreciable y la materia orgánica por encima de 5 g/L de DQO, considerada como alta.

El hecho de presentar casi toda su DQO en forma soluble, la hacen susceptible de ser biodegradada por vía anaerobia, amén de las altas cargas que presenta que hacen el tratamiento aerobio muy costoso (Rodríguez, 2000).

La selección del inóculo constituye uno de los primeros pasos para realizar un tratamiento biológico a un agua residual y de ello depende mantener las condiciones de estabilidad operacional del reactor. Las características intrínsecas del inóculo, como la presencia de un consorcio bacteriano balanceado que le permita su adaptación al medio sin mayores cambios, son de vital importancia para llegar a la formación de gránulos activos y estables en reactores UASB; además de lograr la consecuente disminución de la carga orgánica contaminante durante el tratamiento.

El hecho de seleccionar un lodo proveniente de fuentes naturales como inóculo, aunque reduce los costos, exige conocer la composición del mismo para detectar y eliminar aquellos elementos que puedan afectar el proceso de tratamiento y aprovechar las ventajas que nos brinde el consorcio microbiano que posea.

Entre las fuentes de inóculo con mayor disponibilidad en nuestra región se encuentran: el estiércol vacuno, los lodos de sistema de tratamiento de estiércol porcino y los lodos provenientes de las lagunas de estabilización de residuales agroindustriales

El estiércol vacuno posee un alto contenido de bacterias anaerobias metanogénicas; lo que constituye una característica muy favorable. Sin embargo el mismo posee la desventaja de tener un alto contenido de material lignocelulósico, lo que tiende a flotar dentro del reactor provocando problemas operacionales a causa de obstrucciones en el sistema. Otro aspecto es que las bacterias metanogénicas predominantes en este tipo de inóculo, son las hidrogenofílicas que provienen del sistema digestivo de rumiantes. Por esto es recomendable no tomar dicho inóculo directamente del medio natural, sino proveniente de un digestor que esté en funcionamiento alimentado con dicho estiércol; lo que proporcionará un inóculo con microorganismos adaptados y con la menor cantidad de material lignocelulósico (Terry y col., 2008).

Los lodos de sistemas de tratamiento de estiércol porcino, pudieran ser tomados de una laguna de estabilización de una granja porcina. Además, debido a que en estos momentos se ha establecido una estrategia por parte del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente que exige la construcción de lagunas de estabilización asociadas a cualquier centro porcino, permite una mayor disponibilidad de esta fuente.

Los lodos provenientes de las lagunas de estabilización de residuales agroindustriales, como es el caso de la industria azucarera y la cafetalera, también pueden ser empleados para este proceso. Con mayor preferencia se escogen aquellas en las cuales se ha tratado el mismo residual, en todos los casos, la recolección del inóculo debe realizarse asegurando las condiciones de anaerobiosis para evitar el efecto tóxico que el oxígeno molecular pudiera ejercer sobre las bacterias anaerobias. La toma del inóculo no debe realizarse muy cercano a los límites de la laguna pues existe la probabilidad de arrastrar el material inerte (arcilla y arena), los cuales contribuyen de igual manera al mal funcionamiento del reactor, recomendando las lagunas que posean algún sistema de impermeabilización (Terry y col., 2005).

El proceso de digestión anaerobia se puede mejorar empleando mezclas de inóculos que asegurarían presentar una mayor diversidad microbiana adaptada a diversos sustratos; lo que garantiza la disminución del período de arranque y puesta en marcha del reactor, así como la disminución del tiempo requerido para la granulación. Por lo que el empleo de mezclas de inóculos tal como lo sugieren Weiland y col. (1991), es recomendable para mejorar la eficiencia del proceso.

En este estudio se trabajó, teniendo en cuenta los criterios anteriores con tres inóculos: Estiércol vacuno digerido en un reactor anaerobio de primera generación (LDA-CEBI), Estiércol porcino (FE) y Mezcla de inóculos provenientes de una laguna de estabilización y estiércol digerido (M).

IV.1.1. Caracterización y selección de inóculos.

Entre los parámetros indispensables que se deben tener en cuenta para conocer la calidad de los inóculos, se encuentran el Índice Volumétrico de Sedimentación (IVL) y la Actividad Metanogénica Específica (AME). El primero de ellos muestra características propiamente físicas y el segundo, expresa las características metabólicas de los microorganismos presentes.

Para la determinación de ambos parámetros es necesario conocer el contenido de los sólidos suspendidos presentes en las muestras, lo que también puede ser empleado como criterio de selección de un inóculo. Según Elías (1992), para el iniciar el arranque de un reactor UASB se debe cargar con la cantidad de lodos necesaria que asegure una concentración mínima de sólidos suspendidos volátiles de alrededor de 10-20 Kg SSV/m³ en la zona de lodos. En general, mientras más inóculo se utilice, mayor será la carga de arranque de los reactores con lodo no granular, lo que no debe sobrepasar el 50 % del volumen útil del reactor.

Las concentraciones de sólidos suspendidos observadas en las variantes de inóculo FE, M y LDA-CEBI, son representadas en la Tabla 3. Como se puede observar la variante de inóculo M posee la mayor concentración de SSV, siendo el mismo de 53,16 g/L. Sin embargo las otras dos fuentes ensayadas poseen valores que no alcanzan los requerimientos en cuanto a la concentración de sólidos suspendidos, necesaria para el adecuado arranque de un reactor UASB. De manera que se necesita el doble del volumen de inóculo si se emplearan FE o LDA – CEBI, comparado con M; reduciendo el volumen útil del reactor.

Es importante conocer la relación de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST) presentes en el inóculo, debido a que una mayor concentración de SSV, nos da indicio de la presencia de microorganismos; los cuales son el núcleo del proceso de granulación. Todos los inóculos presentan valores superiores a 0,5 constituyendo un aspecto favorable en sus características. El LDA – CEBI, muestra un valor significativamente superior al resto, lo que puede estar influenciado por la presencia de material lignocelulósico aún sin degradar.

Ghangrekar (2005), observó que la proporción de sólidos suspendidos volátiles con respecto a la cantidad de sólidos suspendidos totales superiores a 0,4 favorece la granulación, cuando se trabaja con un lodo no granular. El mismo autor recomienda que se establezca un equilibrio para este factor puesto que la presencia de material sólido inerte favorece los procesos anaerobios debido a que permiten que los microorganismos se adhieran a estos, formándose aglomeraciones de bacterias que van a actuar sobre la materia orgánica presente en el agua residual y que además, estos sólidos permitan el atrapamiento de parte del material orgánico a biodegradar, exponiéndolos más a la acción de los microorganismos presentes.

La actividad metanogénica es el parámetro fundamental a la hora de seleccionar un inóculo. La misma representa la capacidad que posee la población de metanógenos de transformar la materia orgánica presente en el residual hasta metano. Este parámetro fue evaluado en las tres fuentes de inóculo (Tabla 3). El análisis estadístico arrojó no existencia de diferencias significativas, por lo que los tres inóculos poseen similares actividades.

Para el arranque de un reactor anaerobio, es conveniente contar con lodos granulares proveniente de un reactor en funcionamiento, ya que presentan valores de actividad metanogénica elevados, en un rango de 0,3–1,5 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d (Ghangrekar y col., 2007), aunque Hulshoff y col (2004), reportaron actividades de hasta 2 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d.

En nuestro país no contamos con plantas industriales del tipo UASB que permitan la obtención de una “semilla” para el arranque, por lo que se hace necesario emplear fuentes naturales no granulares lo que refuerza la importancia de la realización de estudios a escala de laboratorio y el diseño de una estrategia adecuada. Los valores de AME determinados, se encuentran por debajo del valor recomendado para el arranque de un reactor (0,2 - 0,5 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d), lo que requiere de la estimulación del inóculo antes de ser utilizado. No obstante, los valores obtenidos coinciden con los reportados por Elias (1992), quien establece un rango de actividad para lodos desde 0,001 hasta 0,08 para estiércol porcino, lagunas anaerobias y estiércol digerido.

Debido a que la sedimentabilidad es una característica que permite medir la capacidad de retención del lodo, el índice volumétrico de lodo (IVL) es una variable importante en la evaluación de la calidad de los lodos anaerobios. Las propiedades de sedimentación del lodo determinan la concentración del lodo en la zona dispersa del reactor. Los mejores valores de índice volumétrico de lodos reportados, se encuentran en un rango de 10–20 mL/g (Montalvo y col., 2003; Ghangrekar y col., 2007). Estas características son mostradas en la Tabla 3.

El IVL se define como el volumen que ocupa 1g de licor mezclado o líquido en un reactor. Mientras menores sea su valor, permitirá aumentar el caudal de alimentación; es decir, trabajar con altas velocidades ascendentes, sin correr el riesgo de que el inóculo pueda ser arrastrado. Aún cuando la variante de inóculo M (mezcla de LDA - CEBI con lodo de la laguna de estabilización de una despulpadora de café) posee el menor valor de IVL, ninguno de los valores observados se encuentra comprendido en el rango favorable para un reactor UASB; el que se encuentra entre 10 - 20 mL/g para un lodo granular (Montalvo y col., 2003).

Haciendo un resumen de las evaluaciones realizadas se confirmó que las fuentes de inóculo evaluadas, las cuales son representativas de las existentes en el territorio, no poseen las características adecuadas para el funcionamiento de un reactor UASB.

Estos resultados sugieren la necesidad del empleo de estrategias de trabajo que permitan mejorar las características de sedimentación de los inóculos, así como mejorar la AME; siendo este último un criterio selectivo mucho más riguroso para la selección de un inóculo. Además de la adición de un sustrato que favorece la metanogénesis, otras variantes a desarrollar son la recirculación de la biomasa y la adición de polímeros sintéticos

IV. 2 Arranque y funcionamiento del reactor UASB a escala de laboratorio.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente planteado, se seleccionó el LDA – CEBI para continuar el estudio al ser el que presenta los peores resultados en la caracterización, permitiendo evaluar la eficacia de la estrategia que se diseñe.

Para el arranque del reactor UASB se estableció un régimen de funcionamiento en batch con recirculación del volumen total del efluente por un tiempo de ciclo de 4 días.

El prolongado tiempo de duplicación de las bacterias metanogénicas constituye la causa por la que, en sus comienzos, el proceso de degradación anaerobia estuvo limitado en sus aplicaciones. Esta es la razón principal de la importancia del desarrollo de métodos de retención de biomasa en reactores anaerobios. El tiempo de duplicación de estas bacterias es de 2 a 4 días en rango de temperatura mesofílico, cuando la temperatura aumenta el valor es menor. Para lograr una operación estable del reactor se requieren tiempos de retención hidráulica aproximadamente dos veces el tiempo de duplicación de los microorganismos, de lo contrario esto puede provocar el lavado de las bacterias metanogénicas pues el proceso transcurre más rápido que lo que ellas pueden regenerarse (Lawrence, 1980).

La recirculación del efluente desde el punto de vista operacional en un reactor UASB, se recomienda cuando se tienen aguas residuales con altas concentraciones y el objetivo es la dilución del nivel de DQO a valores por debajo de 15 g/L. Con la misma también se ha logrado la disminución de la toxicidad de ciertos compuestos, pues se mejora el contacto del lodo con el agua residual que contiene el tóxico y se favorece la granulación y adaptación del lodo. Otra importante ventaja de la recirculación es que se aprovecha en la corriente de entrada la alcalinidad producida por el mismo reactor, lo que contribuye a una mayor estabilidad del proceso, resistencia a choques de pH y de carga orgánica, además de reducir los posibles consumos de reactivos alcalinos (Rodríguez, 2000a).

Las experiencias de Nadais y col. (2006) indican que la recirculación de efluentes tiene efectos beneficiosos si es aplicada durante el período de la estabilización en reactores UASB, observándose un aumento de la metanización cuando los mismos son inoculados con lodos floculentos. En reactores inoculados con lodos pocos sedimentables es necesario reducir la pérdida de biomasa en el efluente, lo que puede lograrse con la recirculación de más de 2/3 de efluente, permitiendo el aumento de la biomasa y la asociación de la misma en contacto con las partículas inertes.

De igual forma, Ramos y col. (2003) con el empleo de recirculación interna de la fase líquida en la transferencia de masa de un reactor anaerobio de lote secuencial (ASBBR), operado a 30° C utilizando ciclos de 8 h para tratar agua residual sintética con una DQO de 0,5 g/L, lograron un aumento de la eficiencia de remoción a un 87 %.

Al poseer los inóculos disponibles valores de Actividad Metanogénica Específica (AME) muy bajos, así como valores de IVL, que no se encuentran en el rango recomendado la etapa de arranque y puesta en marcha de un reactor UASB en continuo, se empleó como estrategia de trabajo la siguiente:

- Utilizar concentraciones de DQO no mayores de 3,5 g/L, tiempo de permanencia del residual dentro del reactor de 4 días persiguiendo la adaptación del inóculo y velocidad ascensional (velocidad con que el residual pasa a través del reactor) de 0,5 m/h, valor que se encuentra en el rango recomendado para favorecer la granulación de inóculos no granulares en reactores UASB; el cual es de 0,5 a 1 m/h (Brito y col, 1997; Torkian y col, 2003).

Bajo las condiciones anteriormente descritas se realizó el seguimiento del comportamiento del LDA – CEBI, en cuanto a pH, remoción de la DQO y relación de alcalinidad. Cabe mencionar que estos son uno de los parámetros más empleados para el seguimiento de un reactor UASB.

Considerando que en reactores UASB para el desarrollo de agregados microbianos se requieren tiempos entre los 2 a 8 meses (Yu Liu y col., 2003; Weili y col., 2007), se estimó un tiempo de 4 meses de trabajo para evaluar la calidad del inóculo obtenido en base a la AME final y el IVL.

El principal problema que se presenta durante el arranque de reactores UASB, es la acidificación. En reactores acidogénicos el producto de la fermentación más abundante son los AGV. Sin embargo, esto no se presentó durante las diferentes fases en que se operó el reactor con el uso del LDA _ CEBI, lo cual se puede deber a que la relación de alcalinidad (α) del influente es alta, siendo superior a 0,7 (Figura. 9). Según López y col. (2000) consideran este valor de α como recomendable para la estabilidad del proceso anaerobio y muestra la capacidad amortiguadora que tiene el sistema. El 70 % de la relación de alcalinidad está representado por los iones carbonatos, determinándose a partir del volumen de ácido sulfúrico consumido para llevar el pH inicial del la muestra hasta 5.3 unidades y el restante 30 % de α esta representado por los ácidos grasos volátiles, pudiendo ser evaluado midiendo el volumen de ácido consumido para llevar el pH de 5,3 a 4,75.

Se hace conveniente destacar que la relación de alcalinidad no es un parámetro dependiente del pH del medio, sin embargo es de gran importancia su determinación, pues con el se prevé la posible acidificación del reactor, proceso que por demás puede ocurrir bruscamente y que contribuye al deterioro absoluto del inóculo.

Con esta variante de inóculo LDA _ CEBI, se alcanzó un 82,3% de remoción de la DQO al emplear cargas orgánicas de 2,6 g/L observándose en el efluente una concentración de la DQO de 0,47g/L, resultado que van en correspondencia con el bajo valor de AME inicial mostrado por este inóculo, de manera que no es recomendable utilizar concentraciones superiores a 2,6 g/L, pues estudios previos realizados (datos no mostrados) arrojaron que disminuye la eficiencia de remoción en el reactor al tener un efecto de sobrecarga.

Características del inóculo.

De igual manera al final de la experimentación se evaluaron los grupos fisiológicos de mayor incidencia en el tratamiento anaerobio de la vinaza, al emplear como sustratos el acetato de sodio; principal fuente de carbono para bacterias metanogénicas del tipo acetoclástica y la glucosa, sustrato de fácil degradación que permite evaluar la actividad metanogénica global o total, donde participan tanto bacterias metanogénicas acetoclástica como hidrogenofílicas.

Durante el ensayo se observó que la población de bacterias metanogénicas del tipo acetoclástica representa aproximadamente el 74 % de la población de las bacterias metanogénicas, siendo sus valores respectivos de AME de 0,211 y 0,286 kgDQO - CH₄/ kgSSV*d. Estas últimas representan el 75 % de la población microbiana anaerobia total presente en el inóculo con un

valor de actividad de 0,38 kgDQO - biogás/ kgSSV*d, lo que indica que del biogás producido más de 60 % está formado por metano, aspecto este de gran importancia desde el punto de vista operacional que permite evaluar el comportamiento del reactor e incluso la diversificación de la tecnología, ya que para que el biogás sea combustible es necesario que exista más del 55 % en forma de CH₄.

A pesar de que los valores finales de AME alcanzados pueden ser considerados como buenos para lograr un exitoso arranque de un reactor UASB en continuo, aún el Índice Volumétrico de Sedimentación no es el recomendado para este fin, siendo el valor final de 54.27 mL/g SST

Una vez transcurrido el tiempo estimado para evaluar las características microbiológicas de las poblaciones microbianas desarrolladas durante el funcionamiento del reactor, se comenzó el análisis microbiológico a través de la microscopia óptica, observándose bacilos Gram negativos con extremos curvos, bacilos largos y con gránulos intracelulares (Figura 10). Esto sugiere la presencia en el inóculo de bacterias del genero *Methanothrix*, las cuales se caracterizan por poseer forma bacilar, lo cual contribuyen a la formación de agregados filamentosos en las primeras etapas de formación de gránulos o flóculos microbianos (Pires y col., 2005).

El predominio de este grupo morfológico de bacterias Gram negativas en el inóculo luego del tratamiento de la vinaza de destilería; residual con un alto contenido de carbohidratos, se corresponde con los criterios establecidos por Lasa y col. (2005) quienes comentan que proceso de formación de las biopelículas es controlado por una cascada completa de reguladores, donde el sistema de *quórum sensing* depende de la acumulación en el cultivo de una molécula señal inductora, que permite a las bacterias responder a la densidad poblacional existente. Para que haya una prevalencia de bacterias Gram negativas el principal inductor es la acil homoserinolactona, sin embargo cuanto las moléculas autoinductora son péptidos, hay una elevada concentración de bacterias Gram positivas. De tal manera que en el medio extracelular se acumula una cantidad de autoinductor, este activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando distintos fenotipos.

La observación al microscopio estereoscopio reveló la formación de agregados, aún con una estructura dispersa no granular, la cual se muestra en la Figura 11 lo cual indica que para inóculos dispersos con tan malas características se hace necesario mayor tiempo de exposición a presiones selectivas dentro del reactor, que favorezcan el mejoramiento de las características del inóculo.

Determinación de Polímeros Extracelulares (ECP) y Ácidos nucleicos

Los polímeros extracelulares están constituidos por una mezcla compleja de sustancias poliméricas excretadas por los microorganismos, productos de hidrólisis y de lisis celular, así como compuestos orgánicos importantes adsorbidos a partir del agua residual. El papel exacto de formación de ECP y las funciones de cada componente no son aún bien conocidos, pero estudios anteriores (Wilén y col., 2003) señalan que las proteínas, sustancias húmicas e hidratos de carbono afectan la carga superficial, la hidrofobicidad y la viscosidad.

Por otro lado, debido a que la mayoría de los componentes de ECP contiene muchos grupos funcionales (Guibaud y col., 2003), ellos proporcionan gran cantidad de sitios de formación de complejos con metales, formando una gran red polimérica en el que las bacterias o las colonias bacterianas son incluidas. Delia (2003) encontró que la composición de ECP y la cantidad de sitios de formación de complejos depende del tipo de agua residual y las condiciones operacionales impuestas en el reactor. Reportándose por Liu y Fang (2002), la presencia de carbohidratos como constituyentes predominantes en las sustancias poliméricas extracelulares.

Como se puede apreciar entre las características de la vinaza (Tabla 2) está la presencia de iones metálicos multivalentes, como por ejemplo: Ca, Co, Mg, lo cual pudiera favorecer al la agregación microbiana cambiando la carga superficial de las bacterias a través de la formación de enlaces coordinados entre estos iones, así como entre ellos y los grupos funcionales de los macromoléculas estructurales de las bacterias. Lo cual favorece la formación de una red, que ayudaría al atrapamiento de células aisladas y la formación de agregados celulares.

Según Miqueleto (2006), la cantidad de Exopolisacáridos (EPS) sintetizados por una biopelícula es dependiente de la disponibilidad de carbono en el residual y del balance de masa entre el carbono y otros compuestos limitantes. En presencia de carbono en exceso y limitaciones de nutrientes como nitrógeno, potasio y fósforo, se promueve la síntesis de EPS

Una vez obtenida la Fracción 1; sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación de la muestra de inóculo tratada con agua a 40 °C donde se encuentran los exopolímeros solubles en agua, se procedió a la evaluación de de las concentraciones de carbohidratos y proteínas existentes.

Como resultado se observó que la concentración de carbohidratos superaba a la concentración de proteínas en el LDA, aunque por las características propias de este inóculo la cantidad de carbohidratos presentes es tres veces inferior a la del lodo granular empleado como control durante el ensayo (Tabla 4). Sin embargo a pesar de que la concentración de carbohidratos y proteínas en el Lodo Granular supera la concentración existente en el LDA – CEBI, es apreciable que la relación Carbohidratos / Proteínas para cada una de estos inóculos es básicamente la misma (24:1).

La determinación del contenido de ácidos nucleicos, es considerada como una medida indirecta de la cantidad de células microbianas presentes. En la variante de inóculo LDA - CEBI la población microbiana presente es comparable con la del Lodo Granular pues se observaron valores de 0,013 y 0,012 % de ácidos nucleicos respectivamente, sin embargo por los resultados obtenidos en base a la AME que el mismo expresa, así como la morfología de los agregados celulares observados

A partir de todos los resultados obtenidos fue considerada la posibilidad de evaluar el efecto de la adición de un polímero sintético; en las características del inóculo y su incidencia en el funcionamiento operacional del reactor UASB a escala de laboratorio, pues solo con la recirculación del efluente se logró mejorar las características de la población microbiana presente

el inóculo con un incremento de la AME hasta un valor de 0,286 kgDQO - CH₄ / kgSSV * d, pero sin embargo las características de sedimentación no son aún favorables.

IV.3. Arranque y funcionamiento del reactor UASB a escala de laboratorio en batch con recirculación con la adición de alginato de sodio.

Ha sido evaluado por muchos autores la adición de polímeros sintéticos o naturales para favorecer la biomasa granular, variando el tiempo requerido para la formación de biogránulos de la biomasa desde los 5 días (Jeong y col., 2005) hasta los 50 días (Show y col, 2004). La principal función de los aditivos poliméricos es la de neutralizar la carga superficial de la biomasa y eliminación de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre las partículas cercanas o próximas. En ausencia de fuerzas electrostáticas repulsivas, la adhesión entre las partículas pudiera tener lugar debido al incremento de las fuerzas de Van de Waals o de atracción. Esto pudiera reducir el IVL indicando una reducción del volumen de inóculo en el interior del reactor a causa de una condensación debido a la adhesión (Ghangrekar y col., 2007).

Durante el desarrollo de esta etapa experimental, se adicionó durante la alimentación de cada ciclo el alginato de sodio, el mismo fue añadido en una concentración de 1ppm. Dicha concentración fue utilizada tomando como referencia los resultados obtenidos por Ong y col. (2002). Además se tomó una carga contaminante en la alimentación no superior a los 2,6 gDQO/L. y manteniendo las mismas condiciones operacionales de tiempo de retención hidráulica (4 días) en cada ciclo de trabajo y velocidad ascensional de 0.5 m/h

Como se puede apreciar en la Figura 12, inicialmente los valores de relación de alcalinidad fueron demasiados bajos (0,2), lo cual indica que el inóculo no mostró suficiente capacidad para amortiguar la carga y evitar la acidificación del inóculo. El monitoreo del reactor permitió considerar la necesidad de una etapa de estabilización del inóculo en batch sin recirculación, observándose que a partir de los 6 días del reactor en batch sin recirculación la relación de alcalinidad aumento a valores permisible (0,5), pudiendo ser mantenidas las condiciones inicialmente establecidas durante de recirculación.

En el relación al pH (Figura 12), el mismo mostró valores favorables para el proceso de degradación anaerobia, pues se encontró generalmente en el rango óptimo (6,5 – 7,5), con un ligero aumento a partir del día 48 que no supera el rango permisible para que se desarrolle el proceso de digestión anaerobia es decir 6,5 – 8 (van Lier y col., 2001).

Características del inóculo.

Al final del tratamiento de la vinaza de destilería con la adición de alginato, se logró un aumento de la AME total (0,39 kg DQO/ kg SSV*d), con respecto a la AME total del tratamiento sin la adición del polímero (0.29 kg DQO-CH₄/ kg SSV*d), siendo las misma significativamente superior al se comparados los valores medios de actividad de las dos muestras bajo un *Test t* con un nivel de confianza del 95 %. Este resultado se corresponde además, con el incremento de la eficiencia de remoción de la carga orgánica contaminante (91,6 %) al ser medida la DQO en el

efluente, mostrando un valor de 0,11 g/L bajo el tratamiento con la adición de alginato. Este resultado supera los valores de eficiencia de remoción alcanzados inicialmente (82,3 %).

De igual manera bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas, al evaluar el tipo morfológico de bacterias presente en el inóculo una vez culminado el tratamiento, se observaron bacterias Gram negativas la cual coincide con la población inicialmente encontrada en el inóculo luego, resultado que es lógico pues la vinaza tiene un alto contenido de carbohidratos lo que favorece el predominio de este tipo morfológico de bacteria.

La observación al microscopio estereoscopio mostró resultados muy similares entre el tratamiento con la adición de alginato y sin éste, observándose solamente la formación de agregados celulares dispersos. (Figura 13).

Determinación de Polímeros extracelulares (ECP) y Ácidos Nucleicos luego de la adición de alginato

Los resultados arrojaron un incremento de la concentración de carbohidratos en el inóculo, el cual es de 96 mg/L. Este valor es tres veces superior al observado en el tratamiento de la vinaza sin la adición de alginato de sodio (64 mg/L) e igual al Lodo Granular empleado como control (96 mg/L). Por otro lado la concentración de proteínas presente fue de 2,09 mg/L, mostrando una ligera disminución con relación al valor observado inicialmente de 2,67 mg/L cuando el reactor fue operado sin la adición de alginato. Como es posible apreciar la relación Carbohidratos / Proteínas supera la observada inicialmente (24:1), siendo la concentración de carbohidratos 46 veces mayor que la de proteína.

Estos resultados pudieran ser considerados favorables para el proceso de agregación microbiana, pues según los y pudieran estar relacionados con las características propias de la vinaza por ser un agua residual con elevado contenido de carbohidratos, además de la adición de alginato de sodio durante la alimentación del reactor. Por otra parte también se corresponden con lo planteado por Miqueleto (2006), quien asegura que durante el tratamiento de residuales la cantidad de EPS sintetizado en una biopelícula esta fuertemente influenciada por la disponibilidad de carbono presente en el sustrato.

Otro de los parámetros determinados en esta etapa experimental fue el torciendo de ácidos nucleicos en la muestra de inóculo, como medida indirecta de la población microbiana presente, siendo su valor de 0,012 lo cual indica que la población se mantuvo básicamente estable.

Los resultados obtenidos en esta etapa de adición de polímeros como estrategia de trabajo para mejorar las características de la biomasa, y por consiguiente el mejoramiento del reactor desde el punto de vista operacional, indican que la adición del mismo mejora las características de la biomasa en cuanto a la AME, la producción de ECP y la eficiencia de remoción de la carga orgánica contaminante, pero sin embargo a pesar de que se logra mejorar el IVL del inóculo el cual es de 43 mL/g, el mismo no alcanza los valores que requiere esta tecnología. Esto indica que este proceso de formación de agregados celulares depende mayormente de las características y la selección del inóculo, así como de las condiciones operacionales impuestas en el reactor.

Tales resultados también fueron observados por Ghangrekar (2008) y col. al evaluar el efecto de la adición de cationes poliméricos en la granulación de la biomasa, así como en la eficiencia de remoción de la carga orgánica durante el tratamiento de aguas residuales de baja fuerza (DQO 300–630 mg/L) ha sido estudiado por y col. en reactores UASB a escala de laboratorio, observando que la formación de un lodo granular a partir de un lodo espeso, depende más de la carga orgánica impuesta en el reactor y la selección del inóculo, que de la propia adición de un polímero catiónico.

Según Ramírez (2008), para lograr la formación de agregados microbianos a manera de gránulos; los cuales poseen las características de sedimentación más favorables para este propósito, también es necesario la presencia de una concentración adecuada de bacterias fermentativas que ayuden a la formación de la capa externa de los gránulos y que suplen de nutrientes a las bacterias metanogénicas. Esto sugiere la no presencia en las cantidades necesarias de este grupo de bacterias por la procedencia del LDA – CEBI, siendo conveniente el uso de una mezcla de éste inóculo con otro proveniente de una planta de tratamiento aerobio, o a partir de sedimentos de un río.

V. Conclusiones

1. Los inóculos ensayados no poseen las características para ser usados directamente en el arranque de un reactor UASB, por lo que deben ser mejorados.
2. Con el establecimiento de la recirculación de la vinaza de destilería como estrategia de trabajo, se alcanzó hasta un 82,3 % de eficiencia de remoción de la carga orgánica, empleando como inóculo el LDA – CEBI, lo cual se corresponde con el aumento de la AME hasta un valor aproximadamente tres veces superior con respecto a la actividad inicial observada en el inóculo.
3. La adición del polímero sintético de alginato de sodio incrementa la AME hasta un valor de 0,39 kgDQO-CH₄ / kgSSV *d, así como las características de sedimentación del inóculo aunque la misma no alcanza el valor necesario.

VI. Recomendaciones

- Establecer un mayor tiempo de trabajo del reactor para favorecer la formación de agregados.
- Mejorar el diseño de los reactores UASB, de manera que permita evaluar la producción de gas que se genera.

VII. Bibliografía

- APHA. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 20th Edition, Washington D. C. USA, 1998.
- Balch, W. E.; Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R.; Wolfe, R. S. *Microbiology Review*. Vol.43, 1979, págs. 260 _ 296.
- Bermúdez, R. C. Aprovechamiento Biotecnológico de residuos con el empleo de la Tecnología de Digestión Anaerobia. Universidad de Chimborazo. Ecuador. 1995.
- Bregni, C.; Degrossi, J.; García, R.; Lamas, M.; Firenstein, R. y D'aquino, M. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. *Ars Pharmaceutica*, Vol. 41, No. 3, 2000, págs. 245-248.
- Brito, A.; Rodrigues, A.; Melo, L. Granulation during the start-up of a UASB reactor used in the treatment of low strength wastewaters. University of Minho, Portugal. *Biotechnology Letters*. Vol. 19, No. 4, 1997, págs. 363 – 367.
- Castilla, P. Tesis Doctoral “Degradación Anaerobia de compuestos Petroquímicos”, Universidad de Iztapalapa. Méxio D.F., 2006.
- Chen, J.; Lun, S Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors. *Water Science Technology*; Vol. 28, 1993. págs.171 – 178.
- Coradin, T.; Livage, J. Mesoporous alginate/silica biocomposites for enzyme immobilisation *Comptes Rendus Chimie*. Vol.6, 2003, págs. 147–152.
- Costerton, W; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.; Korber, D.; Lappin, H. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, Vol.49, 1995, págs. 711 -745
- Delia, T. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme Microbiology Technology*. Vol. 32, No 3, 2003, págs. 375–385.
- Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, Vol. 28, 1950, pág 350.
- Elías, A. Tesis Doctoral “Separación de etapas en el tratamiento anaerobio de efluentes con reactores UASB”. Escuela técnica superior de ingenieros industriales y de telecomunicación de Bilbao. Universidad de Bilbao. España, 1992.
- El-Mamouni, R.; Leduc, R.; Guiot, S., Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Science Technology*, Vol. 38, 1998, págs. 341 – 347.
- Field, J. Granulation, 2003. Disponible en <http://www.uasb.org/discover/granules.htm> revisado el 10 de enero del 2006.
- Ghangrekar, M.; Asolekar, S.; Joshi, S. Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Research*, Vol 39, 2005, págs. 1123–1133.

- Ghangrekar, M.; Bhunia, P. Effects of cationic polymer on performance of UASB reactors treating low strength wastewater. *Bioresource Technology*, Vol. 99, 2008, págs. 350 – 358.
- Ghangrekar, M.; Bhunia, P. Required minimum granule size in UASB reactor and characteristics variation with size *Bioresource Technology*. Vol., 98, 2007, págs. 994–999.
- Grotenhuis, J.; Smit, M.; van Lammeren; A.; Stams, A.; Zehnder, A. Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge. *Applied Microbiology Biotechnology*, Vol. 36, 1991, págs. 115 _ 119.
- Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., Baudu, M. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 52, 2003, págs. 1701 – 1710.
- Guiot, S. R.; Pauss, A.; Costerton, J. W., A structured model of the anaerobic granules consortium. *Water Science Technology*, Vol. 25, 1992, págs.1–10.
- Hulshoff, L. W.; de Castro, S.; Lettinga, P. Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, Vol. 38, 2004, págs. 1376– 389.
- Jeong, S. H.; Kim, H. Y.; Yeom, H. S.; Song, K. B.; Lee, S. Facilitated UASB granule formation using organic–inorganic hybrid polymers. *Process Biochemistry*, Vol. 40, No. 1, 2005, págs. 89–94.
- Kleerebenzem, R.; Macarie, H. Treatment industrial wastewater: Anaerobic digestion comes of age. *CHEMICAL ENGINEERING WWW.CHE.COM*. 110: 4. 2003.
- Lasa, I.; del Pozo, J.; Penadés, J.; Leiva, J. Biofilms bacterianos e infección. *Annales del sistema sanitario de Navarra*, Vol. 38, No 2, 2005, págs. 153 – 298.
- Laspidou, C.; Rittmann, B. A unified theory for extracellular polymeric substance s, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, Vol 35, 2002, págs. 271_2720.
- Lawrence K.; Norman C. *Handbook of Environmental Engineering Solid Waste Processing and resource Recovery*, Vol. 2, pág 379. Humana Press. ISBN 0896030083, 1980
- Lettinga, G. Sustainable integrated biological waste water treatment. *Water Science Technology*, Vol. 33, 1996, págs.. 85 _ 98.
- Lettinga, G.; Hulshoff, L. UASB Process design for various types of wastewaters. *Water. Science. Techology*. 1991, Vol.24, No. 8, págs. 87– 107.
- Liu, H.; Fang, H. Extraction of extracellular polymeric (EPS) of sludge. *Journal of Biotechnology*, Vol. 95, 2002, págs. 249_256.
- Liu, Y.; Tay, J. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22, 2004, págs. 533–563.
- Liu, Y.; Xu, H.L.; Yang, S.F.; Tay, J. H. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research*, Vol. 37, 2003, págs. 661– 673.

- López, J.; Morgan, J.; Loyola, A. Arranque de reactores anaerobios industriales dos casos de estudio. En: “Memorias de XII Congreso de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales” (FEMISCA). 2000.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, Vol. 193, 1951, págs. 265 _ 275.
- MacLeod, F. A.; Guiot, S. R.; Costerton, J. W., Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied Environmental Microbiology*, Vol.56, 1990, págs. 1598–1607.
- Madigan, M.; Martinenko, J.; Parker J. Broock *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall 10^{ma} Edición, 2005, págs. 628 - -630.
- Mahmoud, N.; Zeeman, G.; Gijzen, H.; Lettinga, G. Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. *Bioresource Technology* Vol. 90, 2003, págs. 1–9.
- Mai, H.; Thai, L.; Duong, H.; Viet, N. Effect of Nutrients and Trace Elements on Treatment Efficiency in UASB-Reactors. *Asian Institute of Technology*. Vol. 3, 2002, pág. 1.
- Martínez. J.; Romay, Z.; Rojas, T.; Guerra, G.; 1985. Manual práctico de microbiología, Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 212 pp.
- McInerney, M.; Bryant, M.; Hespell, R.; Costerton J. *Syntrophomonas wolfei* gen nov., sp, nov, an anaerobic, sybtrophic, fatty acid_oxidizing bcterium. *Applied Environment Microbioology*, Vol. 41, 1981, págs 10029_ 1039.
- McSwain, B. S.; Irving, R. L.; Hausner, M. y Wilderer, P. A. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 2, 2005, págs. 1051–1057.
- Miqueleto, A. Polímeros Extracelulares Insolúveis (ESP) nos Reatores Anaeróbios Operados em Boteladas Sequenciais: Caracterização e Fatores que Favorecem a Produção. *Tesis Doctoral*. Departamento de Hidráulica y Saneamiento, Escuela de Ingeniería de Saõ Carlos, Universidad de Saõ Paulo, Brasil, 2006.
- Mirsepasi, A.; Honary, H.; Mesdaghinia, A.; Mahv, A.; Vahid, H.; karyab, H., Performance evaluation of full scale uasb reactor in treating stillage wastewater. *Journal Environmental. Health. Scince. Engineering*, Vol. 3, No. 2, 2006, págs. 79 - 84.
- Montalvo, S.; Guerrero, L., *Tratamiento Anaerobio de Residuos*. Producción de Biogás. Editado por Talleres Gráficos de Fermín Pastén. Valparaíso. Chile. 2003
- Nadais, H.; Capela, I.; Arroja, L. Intermittent vs continuous operation of upflow anaerobic sludge bed reactors for dairy wastewater and related microbial changes. *Water Science Technology*, Vol. 54, No.2, 2006, págs.103-9.
- Ong, S. L.; Hu, J. Y.; Ng, W. J.; Lu, Z. R., Granulation Enhancement in Anaerobic Sequencing Batch Reactor Operation. *Journal Environment Engineering*, Vol.128, No. 4, 2002, págs. 387 _390.

- Osuna, M.; Iza, J.; Zandvoort, M.; Lens P., Essential metal depletion in an anaerobic reactor. *Water Science and Technology* Vol. 48, No. 6, 2003, págs. 1–8.
- Otero, M., Proteína unicelular para consumo humano. ICIDCA. Editorial Científico _ Técnica. 1985, 344 pp.
- Pires, E. C.; Buzzini, A. P.; Sakamoto, I. K.; Varesche, M. B. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry*, Vol. 41, No. 1, 2005, págs 168 _ 176
- Prescott, L. Microbiología. Mac Graw Hill Interamericana de España 5^{ta} Edición, 2004, págs. 668 – 670.
- Ramírez, Florina. Curso de Microbiología Anaerobia. Universidad Autónoma Metropolitana de México (UAM) – Universidad de Oriente. 2008
- Ramos, A; Ratusznei, S.; Rodríguez, J.; Zaiat, M. Mass transfer improvement of fixed-bed anaerobic sequencing batch reactor with liquid –phase circulation. *Interciencia*, Vol. 28, No.4, 2003, págs 214-219.
- Ratusznei, S.; Rodríguez, J.; Camargo, E.; Ribeiro, R.; Zaiat, M., Effect of feeding strategy on a stirred anaerobic sequencing fed_ batch containing immobilized biomass *Bioresource Technology*, Vol. 90, 2003, págs 199_ 205.
- Rivera. A.; Gonzáles, J.; castro, R.; Nieves, G. Tratamiento de Efluentes de Destilería en un Filtro Anaerobio con Manto de Lodos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. Vol. 18, No. 3, 2002, págs 131 _ 137.
- Rodríguez, S. Influencia de la vinaza de destilería en la biodegradación de tiocianato. Tesis de maestría. Universidad de Oriente 2000a.
- Rodríguez, S., Decoloración de los Residuales de la Pasteurización de la Pulpa de Café y la Vinaza por *Pleurotas* sp. *Tesis de Doctoral*, Universidad de Oriente 2006.
- Rodríguez, S.; Pérez, R.; Fernández, M. Biodegradabilidad anaerobia de las aguas residuales del beneficio húmedo del café”. *Revista Interciencia*, Vol. 25, No. 7, 2000b.
- Rossi-Alva, J.; Miguez, M., A strategic study using mutant-strain entrapment in calcium alginate for the production of *Saccharomyces cerevisiae* cells with high invertase activity. *Biotechnol. Applied Biochemistry*. Vol.38, 2003, págs. 43–51.
- Sam-Soon, P. A.; Looewenthal, R. E.; Dold, P. L.; Marais, D. V. R. Pelletization in upflow anaerobic sludge bed reactors. In: Hall E.R., Hobson P.N., editors. *Anaerobic digestion* Oxford, UK: Pergamon Press, 1988. págs. 55–60.
- Sankalia, M.; Maseru, R.; Sankalia,J.; Sutariya, V., Evaluación y optimización simultánea de papaína inmovilizada en gránulos de alginato entrecruzado mediante un diseño factorial 3x3 y la función de deseabilidad. *Ars Pharmaceutica*. Vol. 45, No. 3; 2004, págs. 253-279.

- Seghezze, L.; Zeeman, G.; Liel, J.; Hamelers, H. V.; Lettinga, G. A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, Vol.65, 1998, págs. 175-190.
- Show, Y. K.; Wang, Y.; Foong, F. S.; Tay, H. J., Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Research*, Vol.38, 2004, págs 2293 – 2304.
- Soubes, M.; Viñas, M.; Borzacconi, L.; Murxi, L., Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. III Taller y Seminario Latinoamericano. Montevideo. Uruguay. 1994.
- Speece, R.E. Anaerobic Biothechnology for Industrial Wastewaters. Published by Archaea Press. Tennessee. 1996, 344 pp.
- Terry, A.; Rodríguez, S; Bermúdez, R.C.; Fernández, M.; Aguilera, I.; Buzón, J. Evaluación de un inóculo para el arranque de reactores UASB empleados en el tratamiento de residual líquido de café. *Revista Cubana de Química*, Vol. XVII, No. 1, 2005, págs. 206 – 211.
- Terry, A.; Rodríguez, S.; Fernández, Almeida, D. Consideraciones generales para el desarrollo de una estrategia de granulación en reactores UASB. *Revista Tecnología Química*, Vol. 28, No. 1, 2008 (Aceptado para publicar).
- Thaveesri, J.; Daffonchio, D.; Liessens, B.; Vandermere, P.; Verstraete, W., Granulation and sludge bed stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermodynamics. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 61, No. 10, 1995, págs. 3681 – 3686.
- Torkian, A.; Amin, M.; Kermanshahi, R. K.; Iranpour, R., Pre and post-granulation performance of UASB System treating high-strength industrial effluent. 2003. Disponible <http://sharif.edu/~torkian/granulpapweftec2003.pdf> revisado el 12 de Noviembre del 2007.
- Torres, P.; Cardoso, A.; Rojas, O., Mejoramiento del arranque de lodos anaerobios tipo UASB. Influencia de la adición de cloruro férrico. *Revista Ingeniería y Competitividad*. Vol. 5, No 2, Artículo 3 2004.
- Uyanik, S., Granule Development in Anaerobic Baffled Reactors. *Journal Engineering. Environmental. Science*, Vol.27, 2003, págs.131 -144.
- van Lier, J.; Tilche, A.; Ahring, B.; Macarie, H.; Moletta, R.; Dohanyos, M.; Hulshoff Pol, L.; Lens, P.; Verstraete, W., New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, Vol.43, No 1. 2001, págs.: 1-18.
- Veiga, M.; Jain, M; WU, W; Hollingsworth, R y Zeikus, G., Composition and Role of Extracellular Polymers in Methanogenic Granules. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 2, 1997, págs. 403–407.
- Vieira, A.; Dias, B.; Bergamasco, R.; Tavares, C., Bacterial population of a upflow anaerobic sludge blanket reactor treating wastewater from a gelatin industry. *Environmental Technology*, 2001, Vol. 22, págs. 1477 – 1485.

- Weiland, P.; Rozzi, A. The start-up, operation and monitoring of high-rate anaerobic treatment systems: discussers report. *Water Science. Technology*. Vol. 24, No. 8, 1991, págs. 257 – 277.
- Weili, Z; Tsuyoshi, I.; Masao, U.; Fusheng, Li. y Akira, Y. Effect of loading rate on the granulation process and granular activity in a bench scale UASB reactor. *Bioresource Technology*, Vol. 98, 2007, págs. 1386–1392.
- Wiegant, W. M. The ‘spaghetti theory’ on anaerobic sludge formation, or the inevitability of granulation. In: Lettinga, G.; Zehnder, A. J. B.; Grotenhuis, J. T. C.; Hulshoff, Pol. L. W., editors Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology. The Netherlands: Pudoc. Wageningen; 1987, págs.146–52.
- Wilén, B.M., Jin, B., Lant, P., The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research*, Vol. 37, 2003, págs 2127–2139.
- Yu, Liu Hai-Lou Xu; Shu-Fang Yang, Joo-Hwa Tay, Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research*, Vol. 37, 2003, págs 661–673
- Zegers, F., Microbiología. *Manual del curso: Arranque y Operación de Sistemas de Flujo Ascendente con Manto de Lodo UASB*. Cali. pág. A1. 1987.

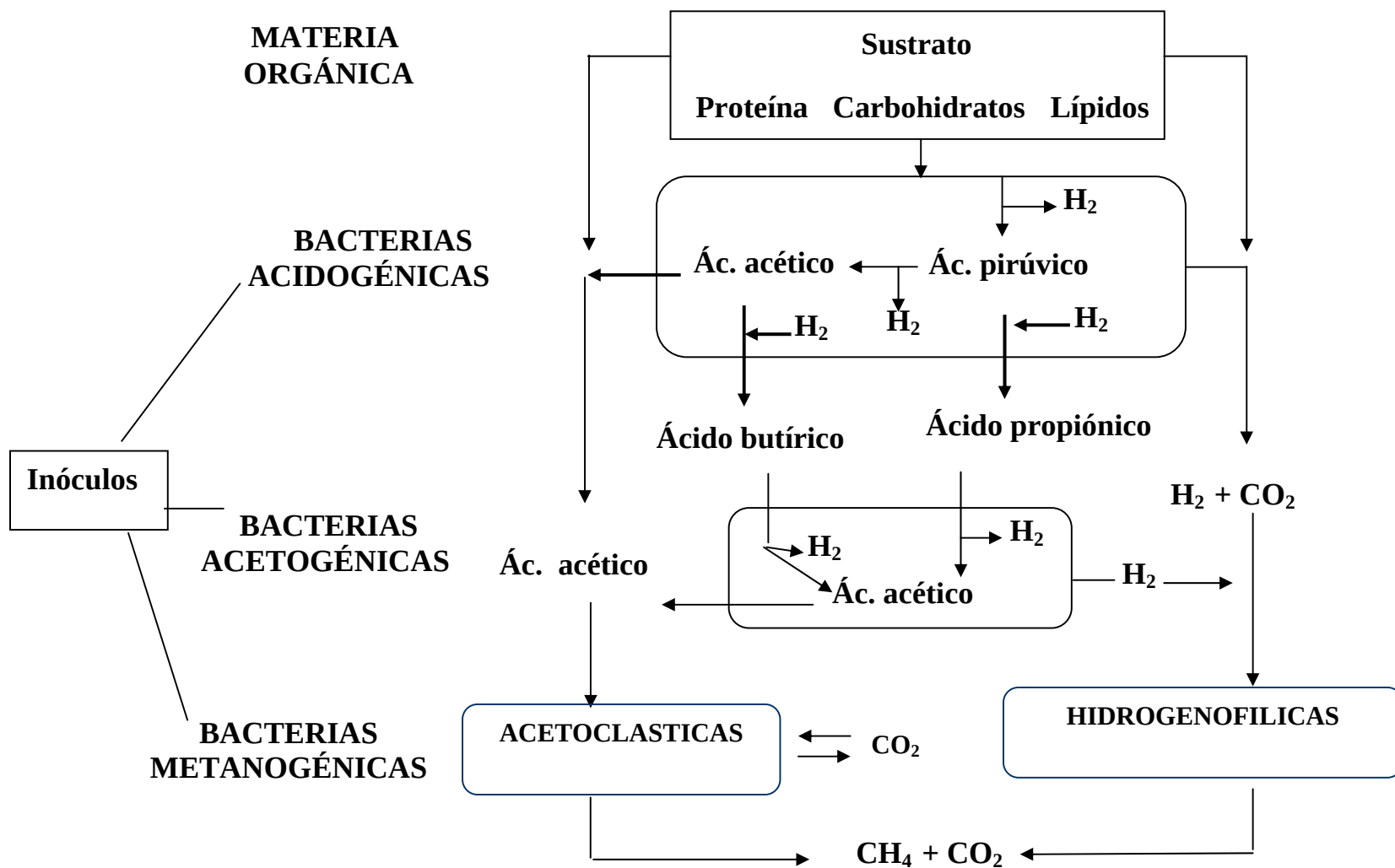


Figura 1. Esquema general de las etapas de la digestión anaerobia.

Tabla 1. Composición química de las bacterias metanogénicas.

Micronutrientes	Concentración (mg/ kg células secas)
Fe	1 800
Ni	100
Co	75
Zn, Mo	60
Mn	20
Cu	10
Macronutrientes	
N	65 000
P	15 000
K, S	10 000
Ca	4 000
Mg	3 000



Figura 2. Lodo Granular Anaerobio a partir de un reactor UASB

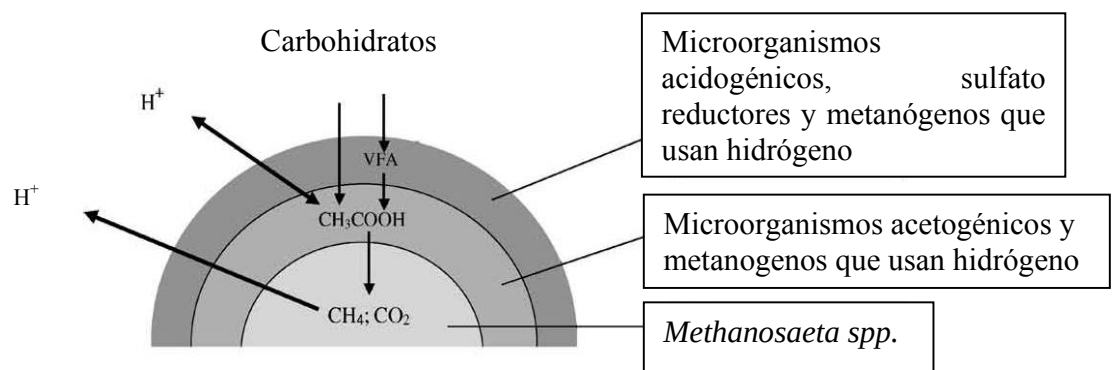


Figura 3. Esquema del modelo estratificado de los gránulos.

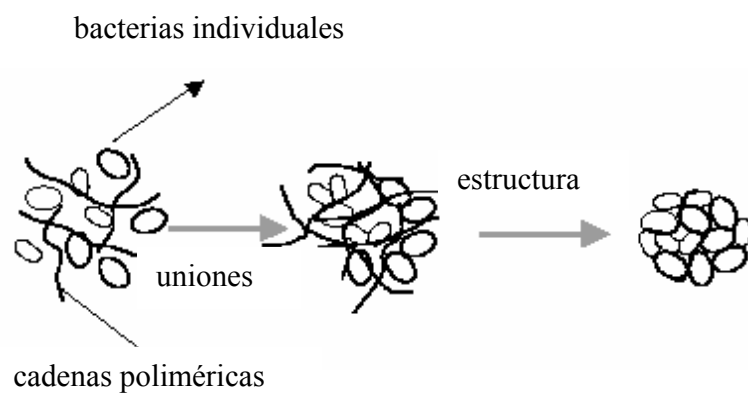
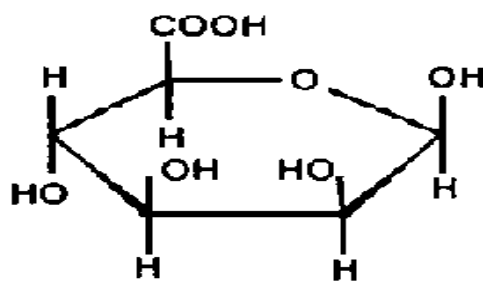
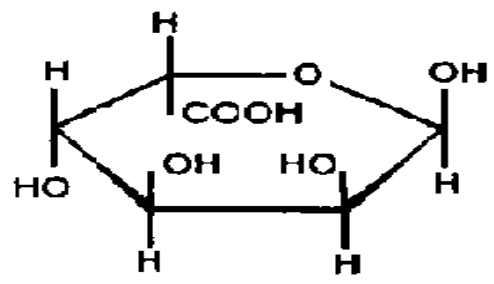


Figura 4. Esquema que muestra la acción de los polímeros en la formación del gránulo.

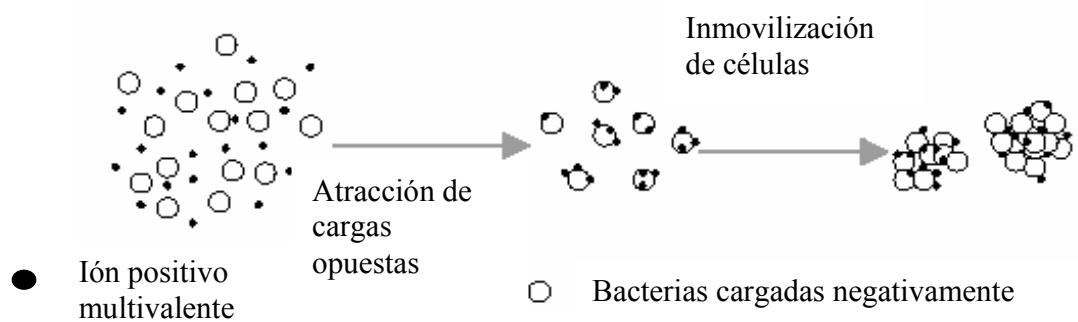


Ácido β - D - Manurónico



Ácido α - L - Gulurónico

Figura 5. Fórmulas clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido algínico



oo

Figura 6. Esquema del efecto de un ión positivo multivalente sobre las cargas de superficies de las bacterias.

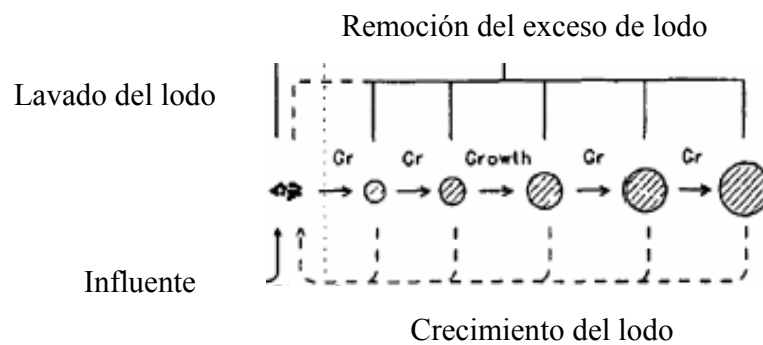


Figura 7. Efecto de la presión de selección en la formación del gránulo anaerobio.



Figura 8. Prototipo del reactor UASB empleado en la experimentación

Tabla 2. Características principales de la vinaza de destilería (Rodríguez, 2006)

Parámetros	Vinaza
pH	4,2
DQO (g/L)	73,6
DBO ₅ (g/L)	48,2
AGV (como acético) (mg/L)	2,25
Sólidos totales (g/L)	58,60
Carbohidratos (g/L)	8,24
Nitrógeno total (mg/L)	707,59
Sulfatos (g/L)	2,5
Fósforo (mg/L)	4,82
Sodio (g/L)	8,80
Magnesio (g/L)	0,480
Calcio (g/L)	0,106
Cobre (g/L)	0,014
Color aparente	Marrón oscuro

Tabla 3. Caracterización de los inóculos en base a los sólidos suspendidos (SS).

Parámetros	Inóculos		
	FE	LDA-CEBI	M
- SS			
Totales (g/L)	45,83 ^b	33,41 ^c	88,66 ^a
Fijos (g/L)	21,50 ^b	8,25 ^c	35,33 ^a
Volátiles (g/L)	23,91 ^b	25,16 ^c	53,16 ^a
Relación SSV/SST	0,5 ^c	0,7 ^a	0,6 ^b
AME (kg DQO-CH ₄ / kg SSV*d)	0,071 ^a	0,062 ^a	0,087 ^a
IVL (mL/g)	56,72 ^b	56,29 ^b	35,87 ^a

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada uno de los tratamientos ($p < 0.05$, según Prueba LSD).

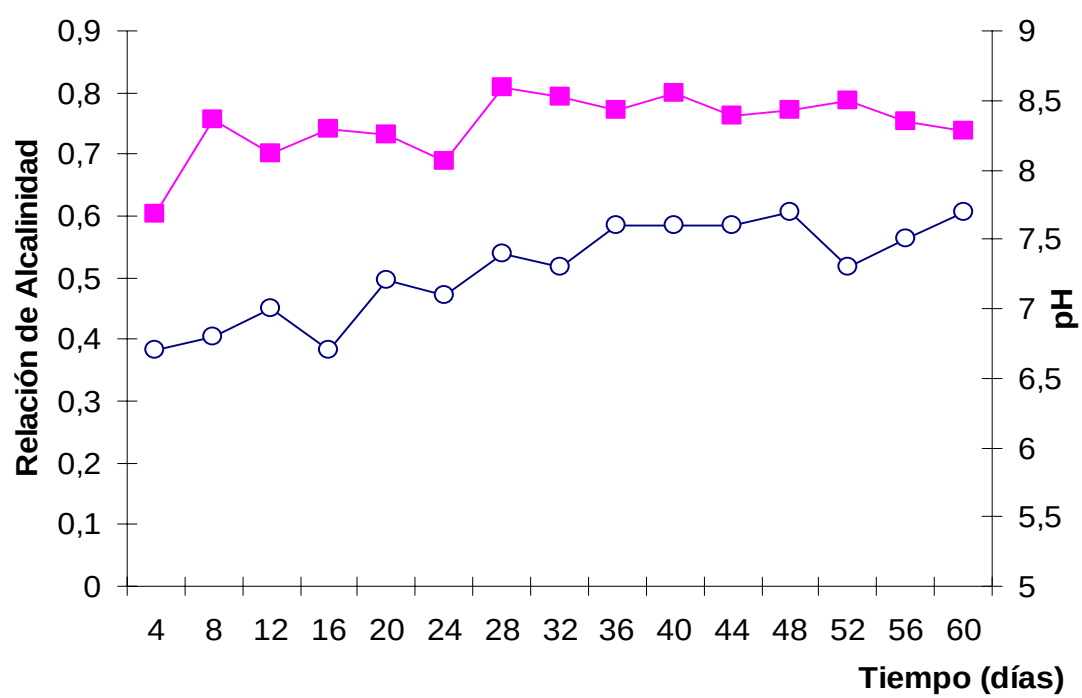


Figura. 9 Comportamiento de la Relación de Alcalinidad (—■—) y el pH (—○—) en el inóculo LDA sin adición de polímero.

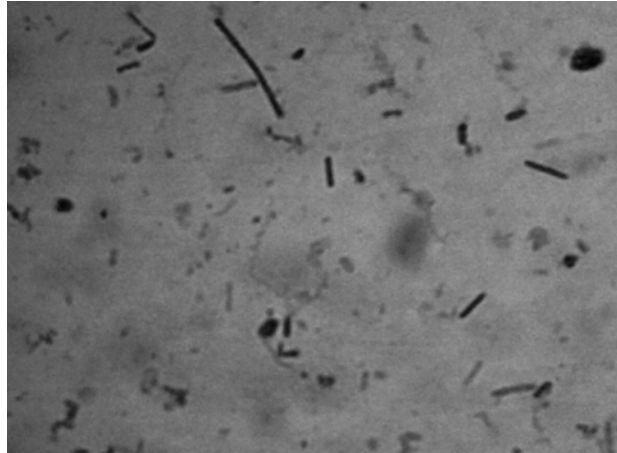


Figura 10 Observación de bacilos Gram negativas observadas al microscópio óptico (100X), al final del tratamiento sin la adición de alginato

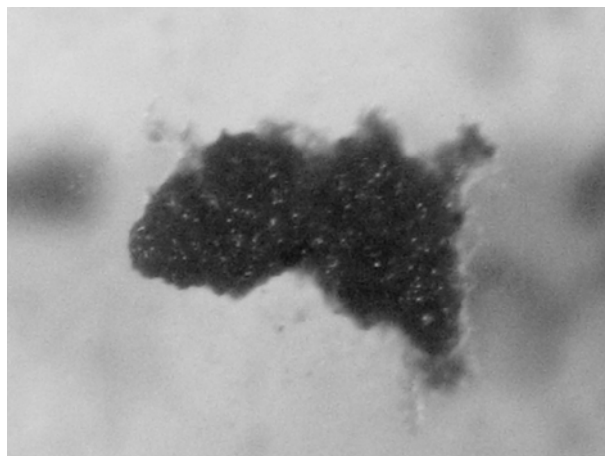


Figura 11 Observación al microscopio (10 X 2) estereoscopio de los flóculos formados durante el tratamiento de la vinaza sin la adición de alginato de sodio.

Tabla 4. Concentraciones de Carbohidratos y Proteínas expresadas del LDA _ CEBI y Lodo Granular.

Inóculos	Carbohidratos mg/L	Proteínas mg/L	Ácidos Nucleicos %
LDA _ CEBI	64	2,67	0,013
Lodo Granular	96	3,96	0,012

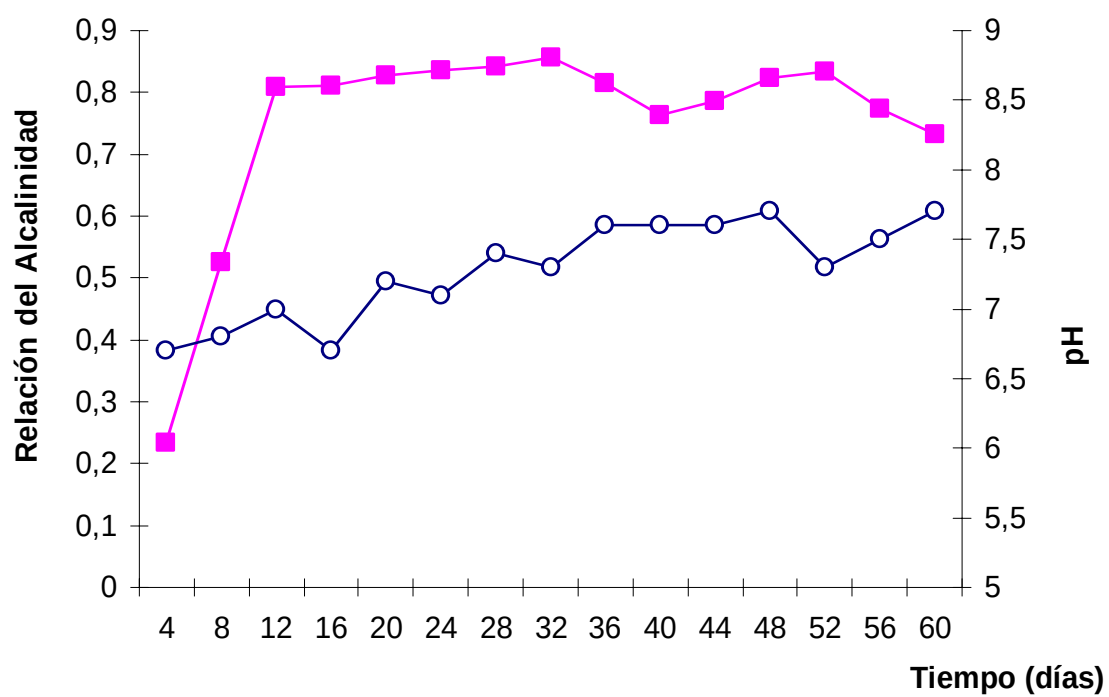


Figura 12 Comportamiento de la Relación de alcalinidad (—■—) y el pH (—○—) en la variante LDA con adición de alginato de sodio.

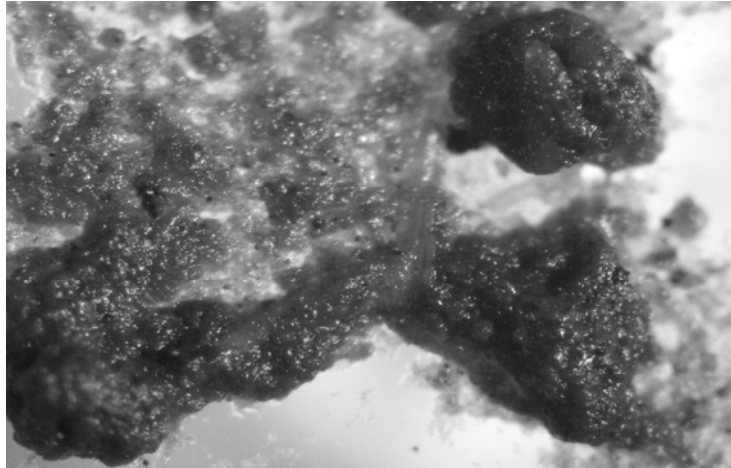


Figura 13. Observación de la formación de agregados microbianos Floculentos en microscopio estereoscopio (10 X 4), a partir de un reactor UASB tratando vinaza de destilería y con la adición de alginato de sodio

Anexo 1

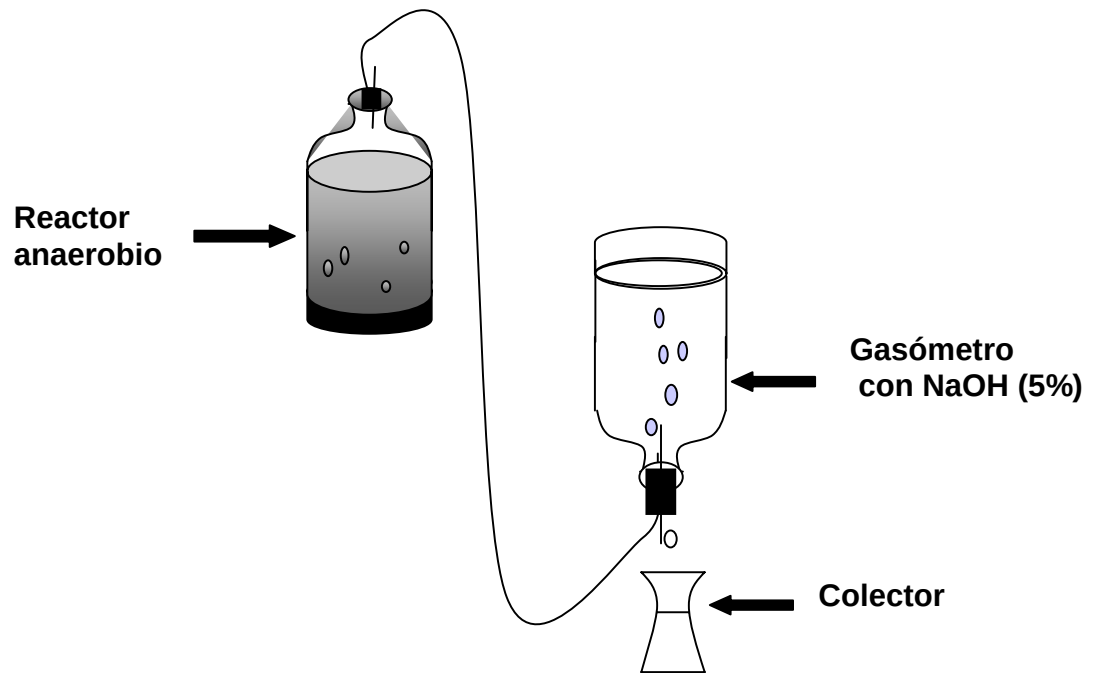


Figura 14 Sistema de cuantificación de metano.