



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

“Influencia de la vinaza de destilería en la biodegradación del tiocianato”

Tesis presentada en Opción al Título Académico de **Master en**
Biología Mención Biotecnología Ambiental

Autor: Suyén Rodríguez Pérez

Tutores: Dra. Rosa Catalina Bermúdez Savón
Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Santiago de Cuba, 2000

INDICE

	Páginas
1. Introducción -----	1
2. Revisión Bibliográfica -----	5
2.1 Digestión anaerobia: Concepto y aspectos generales -----	5
2.1.1. Importancia del hidrógeno en la digestión anaerobia -----	5
2.1.2 Aspectos bioquímicos interesantes de los metanógenos: Coenzimas -	7
2.2 Reactores anaerobios -----	7
2.2.1 Reactores anaerobios de flujo ascendente con manto de lodos (UASB) -----	8
2.3 Digestión anaerobia en dos etapas -----	9
2.4 Biodegradación del tiocianato -----	10
2.5 Vinaza: Producción y Caracterización -----	12
2.5.1. Tratamiento de las vinazas -----	13
3. Materiales y Métodos -----	14
3.1 Materiales -----	14
3.1.1. Reactivos y Equipos -----	14
3.1.2. Biorreactores -----	15
3.1.2.1. Residual bajo tratamiento -----	15
3.1.2.2. Inóculo -----	15
3.2 Metodología experimental -----	16
3.2.1. Experimentos en continuo -----	16
3.2.2. Experimentos en lote -----	17
3.3 Métodos analíticos -----	19
3.3.1. Demanda Química de Oxígeno -----	19
3.3.2. Metano y dióxido de carbono en el biogás -----	19
3.3.3. Relación de alcalinidad -----	20
3.3.4. Sólidos suspendidos -----	21
3.3.5. Determinación de ácidos grasos volátiles -----	21
3.3.6. Determinación de sulfatos -----	22
3.3.7. Determinación de tiocianato -----	22
4. Resultados y Discusión -----	24
4.1 Caracterización del residual. Inóculo -----	24
4.2 Funcionamiento del reactor -----	26
4.3 Biodegradación del tiocianato bajo condiciones anaerobias -----	30
4.4 Consideraciones económicas del proceso de digestión anaerobia -----	32
5. Conclusiones -----	35
6. Recomendaciones -----	36
7. Bibliografía -----	37
8. Anexos -----	44

RESUMEN

La protección del medio ambiente constituye en la actualidad un tópico complejo, pero de inmediato análisis y esfuerzo por parte de las sociedades. Son las aguas residuales, procedentes de procesos industriales, las que en mayores cantidades se liberan provocando a mediano plazo cambios irreversibles en los ecosistemas donde se depositan, por las cargas contaminantes que presentan y la presencia de compuestos tóxicos difíciles de biodegradar.

El presente trabajo consiste en el estudio de la biodegradación del tiocianato, por ser un contaminante liberado en grandes proporciones en numerosos procesos industriales, en presencia de vinaza de destilería. El tratamiento se hace por digestión anaerobia y se emplea en un sistema en dos etapas, utilizando reactores UASB. De los estudios en continuo y en lote se obtiene que la biodegradación del tiocianato ocurre en ambos sistemas, sin que haya afectación de la remoción de la carga orgánica de la vinaza. Tampoco se evidencia afectación de los niveles de producción de ácidos grasos volátiles, ni de la morfología de los gránulos. Reprueba que la digestión anaerobia es un método efectivo para el tratamiento de este residual y la remoción del tiocianato.

SUMARY

The protection of the environment constitutes a complex topic at the present time, but immediately analysis and effort on the part of the societies are necessary. They are residual waters, coming from industrial processes, those that are liberated causing to medium term irreversible changes in the ecosystems in that are deposited, for the pollution loads that they present in more quantities and the presence of toxic compounds which are difficult to biodegradation.

The present work consists on the study of the biodegradation of the thiocyanate, in presence of vinasse, because it is a pollutant deliver in high proportion in several industrial processes. The treatment is made by anaerobic digestion and it is used in two stage system, using UASB reactors. We obtained that the biodegradation of the thiocyanate could be make in both systems: in continues and in batch, without there is affectation of the removal of the organic load of the vinasse. Neither affectation of the production levels og volatile fatty acids is evidenced, neither of the granules morphology. The anaerobic digestion is an effective methods for the treatment of this wastewater one and the thiocyanate removal.

1. INTRODUCCION

En nuestra sociedad actual es un imperativo restaurar la calidad del agua usada y descargada por las industrias, para la protección del medio ambiente. Todas las posibilidades para encontrar tratamientos económicos y prácticos deben ser considerados.

Debido a su capacidad de degradar ciertos compuestos tóxicos, así como contaminantes orgánicos comunes en aguas residuales industriales, la biotecnología anaerobia ha avanzado a niveles elevados de aplicación y se ha establecido como una opción viable en el tratamiento y restauración de muchos efluentes de las industrias. El tratamiento anaeróbico de aguas residuales con niveles de contaminación medianos y altos, es en el presente aceptada como una tecnología probada (Wheatley, 1990).

La digestión anaerobia es un proceso microbiológico complejo que se realiza en ausencia de oxígeno, donde la materia orgánica es transformada a biomasa y compuestos orgánicos, la mayoría de ellos volátiles. Aunque es un proceso natural, sólo en los últimos veinticinco años ha llegado a ser una tecnología competitiva en comparación con otras alternativas. Esto ha sido posible gracias a la implementación de sistemas que separan el tiempo de retención hidráulico (TRH), del tiempo de retención celular (TRC) los cuales han sido denominados reactores de alta tasa. La digestión anaerobia es adecuada para el tratamiento de vinazas por la elevada concentración de materia orgánica que esta presenta.

Las tecnologías del tratamiento anaerobio como el reactor anaerobio de lecho de lodos (UASB) y el filtro anaerobio, están siendo rápidamente aceptados para tratamiento industrial de aguas residuales y las vinazas no son una excepción. Este residual no cumple con las regulaciones ambientales para descarga directa a cuerpos receptores por su elevada DQO, bajo pH y presencia de sólidos en suspensión. Actualmente alrededor de 40 plantas industriales en destilerías, basadas en estas dos tecnologías están en operación en el mundo (Herve,).

Los efluentes de destilería son altamente contaminantes y pueden generar graves efectos negativos en los recursos hídricos en los que son vertidos, si se descargan sin ningún tratamiento previo. Como resultado de la dificultad de tratar vinazas y debido a la presencia de numerosos compuestos aún de interés, se han propuesto diferentes alternativas de tratamiento o de reutilización: reciclaje de volúmenes del efluente (Cedeño, 1995), fertirriego (Montalvo, 1983), combustión y aprovechamiento como alimento animal (Bermúdez,) ; entre otros.

Sin embargo, por su elevados valores de carga orgánica, por los volúmenes que se generan y muchas veces por no contar con suficiente espacio disponible, es que resulta viable la aplicación de la digestión anaerobia con la construcción de reactores de alta tasa principalmente UASB (Noyola, 1995). La tecnología de la digestión anaerobia se encuentra firmemente establecida a nivel mundial y en América Latina y puede ser adaptable a las características del residual a tratar y el lugar donde se quiera implementar. En Cuba se ha trabajado en el tratamiento anaerobio de vinazas provenientes de melazas, fundamentalmente en el ICIDCA empleando reactores UASB, a escala piloto (Ramos *et al.*, 1992).

Existen numerosas aguas residuales industriales las cuales resultan buenas candidatas para el tratamiento anaerobio, pero en cuya composición existe uno o algunos compuestos que resultan tóxicos para la biomasa anaeróbica. Es raro actualmente encontrar un agua residual industrial libre de compuestos tóxicos por lo que se hace necesario el estudio desde nivel de laboratorio, de cada residual en particular. Afortunadamente ambos procesos, aerobios y anaerobios, han demostrado consistentemente su capacidad para la remoción eficiente de varios contaminantes de aguas que contienen tóxicos, si las condiciones favorables son establecidas.

Es ahora posible biodegradar anaeróticamente muchos compuestos tóxicos si se toman precauciones durante el proceso para proteger la biomasa como podría ser: el incremento lento y con cuidado de la concentración del tóxico para procurar la adaptación del metabolismo de los microorganismos que intervienen en el proceso y/o la selección de una microflora capaz de la degradación, prevenir la pérdida de la biomasa del sistema durante el proceso de aclimatación/degradación. Así la inmovilización de la biomasa constituye un tópico clave en el trabajo de diseño y operación de sistemas para el tratamiento de tóxicos. Es por eso que los reactores anaerobios de segunda y tercera generación (entre los que se encuentra el UASB) han demostrado sus ventajas para estos fines.

Las condiciones favorables para la remoción de tóxicos son:

- La concentración del tóxico sea relativamente baja comparada con su IC_{50} (si se conoce)
- El tóxico por sí mismo sea biodegradable o secuestrado bajo las condiciones de tratamiento
- La biomasa esté preparada para aclimatarse a la presencia del tóxico.

El tiocianato es una especie inorgánica que debido a algunas de sus propiedades únicas, es usado en una amplia variedad de procesos industriales. Por su amplio uso industrial el tiocianato es encontrado con frecuencia y en altas concentraciones, en aguas residuales las cuales deben ser sujetas a tratamiento biológico para su disposición final.

Tanto el cianuro (CN^-), el cianato (CON) y el tiocianato (SCN^-) son especies químicamente relacionadas, de las cuales se conocen sus efectos tóxicos. Tanto el tiocianato como el cianato son inhibidores de enzimas. El tiocianato tiende a unirse a proteínas y actuar como un inhibidor no competitivo (Wood, 1975) mientras el cianato es conocido como inhibidor sitio-específico de ciertas enzimas (Anderson, 1980).

Se han realizado numerosos estudios de la biodegradación del SCN^- por sistemas de lodos activados (Hung y Pavlostathis, 1997), cultivos mixtos (Banerjee, 1996) y cultivos puros (Katayama, 1978) en condiciones aeróbicas, demostrándose su mineralización hasta CO_2 y NH_4^+ ; sin embargo, muy poco es conocido sobre las rutas y biotransformación de este ión bajo condiciones metanogénicas.

Generalmente las descargas industriales de aguas conteniendo tiocianato tienen como destino final sistemas de tratamiento de aguas municipales las cuales tienen como características su composición muy variada que dificulta el tratamiento y son aguas muy

diluidas en cuanto a materia orgánica. Esto limita un poco la implementación de sistemas de tratamiento anaerobios de alta tasa.

Sin embargo se conoce que las vinazas de destilería son un buen sustrato para promover el arranque de reactores de lecho de lodos, puesto que la composición de este residual la hace muy biodegradable y promueve la granulación (Palms, 1990), aspecto este que le confiere a la biomasa un mecanismo de protección al efecto de los tóxicos (Parkin y Speece, 1983).

Aunque algunos tratamientos biológicos (fundamentalmente aeróbicos) de aguas residuales conteniendo tiocianato se han desarrollado, casos de inhibición e inestabilidad del proceso se han presentado, lo que ha dado al traste con la eficiencia del proceso.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la biodegradación de tiocianato y la disminución de la carga orgánica de la vinaza tequilera, mediante un proceso biológico anaerobio, en un reactor de lecho de lodos y flujo ascendente.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estudiar el comportamiento de un reactor UASB alimentado con vinaza a la cual se le añade tiocianato.
- Estudiar la biodegradación de tiocianato en condiciones metanogénicas en batch y continuo.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. DIGESTION ANAEROBIA: CONCEPTO Y ASPECTOS GENERALES

La digestión anaerobia puede definirse como una secuencia de procesos metabólicos que promueve la degradación de sustancias orgánicas en ausencia de oxígeno molecular, generando como productos principales el dióxido de carbono (CO_2) y el metano (CH_4).

En el proceso interviene un consorcio de microorganismos integrados principalmente por bacterias. Este consorcio desarrolla un metabolismo coordinado e independiente que le aporta el sustrato al próximo eslabón metabólico hasta llegar a las bacterias metanogénicas que son las que reducen el CO_2 (aceptor final de electrones), convirtiéndolo en CH_4 . Los procariontes reductores de CO_2 más importantes son los metanógenos. Muchos de estos organismos utilizan el H_2 como donador de electrones (fuente de energía) Básicamente el proceso puede dividirse en tres pasos de acuerdo al modelo propuesto por McInerney y Bryant (1981) y las complejas relaciones intermicrobianas que se presentan se pueden resumir desde el punto de vista de sus funciones metabólicas en el siguiente esquema:

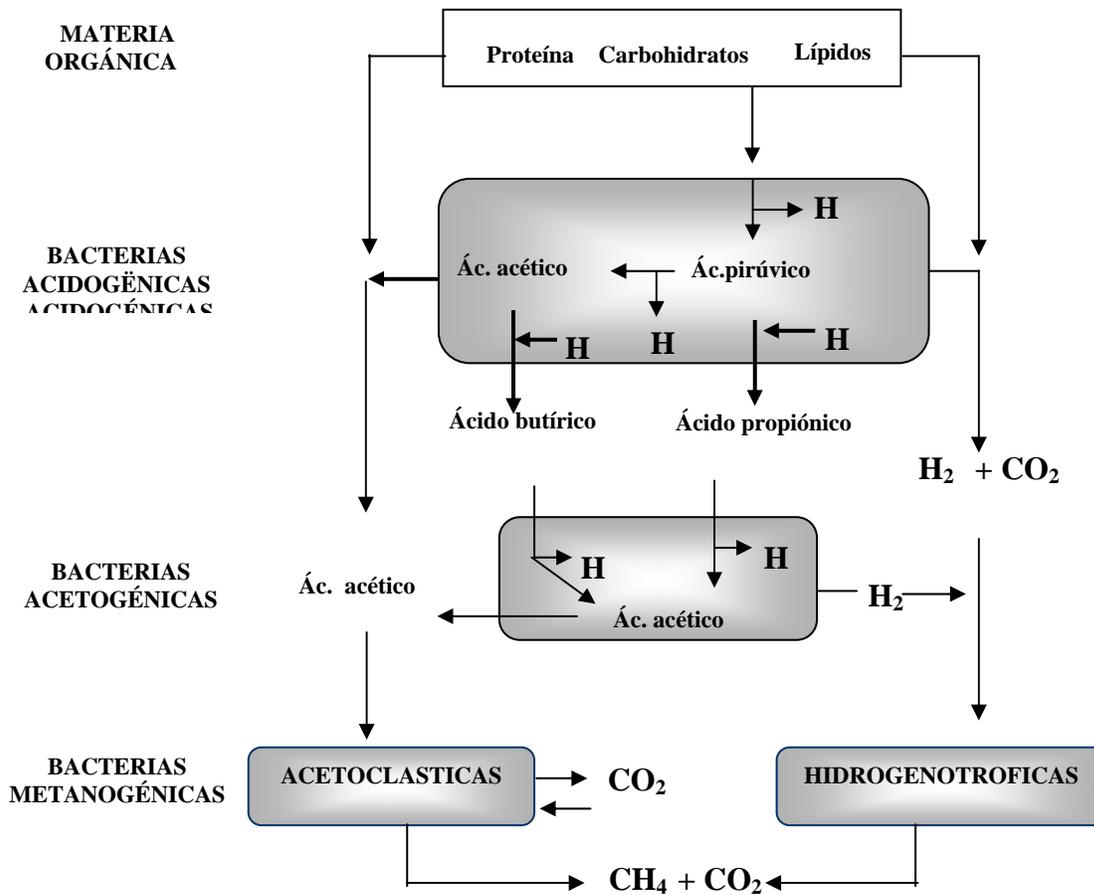


Figura 1. Diagrama del proceso de digestión anaerobia

En la primera etapa, llamada de **acidogénesis**, los polímeros y otras sustancias complejas son hidrolizados y fermentadas para dar compuestos químicos simples como el acetato que es el principal precursor del metano, otros ácidos orgánicos (propiónico, butírico, láctico, valérico, etc), etanol, H₂. En la segunda etapa, las reacciones de **acetogénesis**, los ácidos grasos son transformados en ácido acético e H₂. En la tercera etapa, se lleva a cabo la **metanogénesis** mediante dos tipos de reacciones; las acetoclásticas que llevan a cabo la descarboxilación del ácido acético y las hidrogenotróficas, que consisten en la reducción del CO₂ con H₂.

En el siguiente recuadro se presentan las principales reacciones químicas que se llevan a cabo en cada una de las etapas (Toeriln y Hatting, 1969; Rivera *et al.*, 1993)

Tabla 1: Principales etapas del proceso de digestión anaerobia.

ETAPA	REACCIONES
Hidrólisis y Fermentación	$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2OH + CH_3CH_2COO^- + CH_3(CH_2)_2COO^- + CO_2 + H_2$
Acetogénica Homoacetogénica	$CH_3CH_2COO^- + CH_3(CH_2)_2COO^- + CH_3CH_2OH \longrightarrow CH_3COO^- + H^+ + H_2$ <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> $H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_3COO^-$
Metanogénica Acetoclástica	$CH_3COO^- \longrightarrow CH_4 + CO_2$ <hr style="border-top: 1px dashed black;"/>
Metanogénica Hidrogenoclástica	$H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + CO_2$

2.1.1. Importancia del hidrógeno en la digestión anaerobia

El hidrógeno regula la digestión anaerobia por las inhibiciones de las reacciones claves y por la desviación de vías metabólicas. El efecto del hidrógeno es notable a través de las acciones en relación:

- 1) El fenómeno de transferencia de hidrógeno entre especies
- 2) La inhibición de la reacción acetoclástica por el hidrógeno

Transferencia de hidrógeno entre especies

Este fenómeno ha sido descrito y ocurre a nivel de la acidogénesis y la acetogenesis

Durante la fermentación y producción de ácidos, los dinucleótidos de nicotinamida reducidos ($\text{NADH}+\text{H}^+$) producidos durante la oxidación de un sustrato fermentable, son regenerados mediante la reducción de un compuesto intermediario del metabolismo microbiano (piruvato, acetaldehído) resultando en la formación de propionato, butirato, lactato, succinato y etanol. El H_2 producido durante la deshidrogenación del piruvato (con un potencial redox = - 680 mV a pH 7) podría influir en la relación $\text{NADH H}^+/\text{NAD}^+$ y esta a su vez en la relación ácido acético y los otros productos producidos durante la acidogénesis (Mosey, 1983).

Cuando las bacterias fermentativas están en presencia de una bacteria hidrogenotrófica, muchas de las primeras tienen la capacidad de transferir los electrones a la bacteria utilizadora del H_2 , el NADH,H^+ se re-oxida vía la formación de hidrógeno sin necesidad de reducir el piruvato que en vez de ser convertido en los productos clásicos de las fermentaciones, forma un Acetil-CoA que se convierte en acetato con la producción de ATP. Las consecuencias de esto son:

- Una ganancia energética para las bacterias fermentativas
- Una desviación de las vías metabólicas hacia la optimización de la producción del acetato, principal sustrato metanogénico, con una disminución de la producción de AGV y etanol, evitando en parte la acetogenesis.

En la acetogenesis es preciso que el H_2 producido en esta etapa y la anterior, tenga un sumidero continuo, para que el equilibrio termodinámico de las reacciones se desplace hacia la liberación de energía libre pues en caso contrario se inhibirían las bacterias acetogénicas productoras obligadas de H_2 que son las que llevan a cabo las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en la acetogenesis. Las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas son el sumidero de H_2 . Esta transferencia de hidrógeno entre especies es una relación sintrófica de transferencia de electrones. Estas relaciones son importantes porque permite la formación de acetato que es el principal sustrato de la metanogénesis (Monroy, 1998)

Inhibición de la reacción acetoclástica por el H_2

Ciertas especies del género *Methanosarcina* pueden utilizar el H_2 , pero cuando se tienen H_2 y acetato en el medio de cultivo, el hidrógeno deberá desaparecer primero antes de que se pueda degradar el acetato. De esta manera el H_2 también inhibe la degradación del acetato por las especies de *Methanosarcina* que son hidrogenofílicas (Fergusson y Mah, 1983). Sin embargo la metanogénesis a partir del acetato por los integrantes del género *Methanosaeta* (*Methanotrix*) no es inhibida por el H_2 .

A través de estos ejemplos se ve que las bacterias metanogénicas hidrogenotrófica juega un papel fundamental en el proceso de regulación de la digestión anaerobia debido al papel que ocupan en la cadena metabólica con respecto al H_2 con donador de electrones.

2.1.2. Aspectos bioquímicos interesantes de los metanógenos: Coenzimas

Debido a una antigua divergencia evolutiva las archibacterias (de las que son partes las bacterias metanogénicas) poseen una bioquímica muy característica que se ha mantenido aisladas y que no es compartida por ningún otro ser vivo. En condiciones anóxicas todos los metanógenos usan un grupo metilo como aceptor final de electrones. La reducción de dicho grupo a CH_4 es energéticamente favorable ($\Delta G^0 = -112 \text{ KJ}$) tomando de ahí parte del requerimiento para su crecimiento. En general lo que hace este tipo de bacterias es que usando $8 e^-$ reducen el CO_2 a CH_4 para lo cual ponen en marcha todo un sistema multienzimático.

Aunque también pueden obtener energía a partir de sustratos tales como formiato, metano, acetato o metilamina (ya de por sí bastante restringido) ; estos son sometidos al proceso de oxidación anaerobio y se usan como “vertederos de electrones” en la reducción de metilo a metano.

Ahora bien, esta reducción del CO_2 a CH_4 no se lleva a cabo sobre el compuesto o los intermediarios que se encuentran libre, sino que el primero reacciona con uno de los cofactores del complejo multienzimático (paso de activación del CO_2) y de ahí en forma de unidad de C_1 (un carbono) es transferido de un transportador a otro sufriendo cambios en su estado de oxidación, interactuando con diversas enzimas y cofactores hasta llegar a metano y dejar libre el último transportador, que activará otra molécula de CO_2 y se comenzará el ciclo nuevamente. Este ciclo se denomina “Ciclo de la unidad C_1 ” e involucra varios cofactores que son específicos de las bacterias anaerobias y llevan al CO_2 por estados de oxidación tales como: formaldehído, metenilo, metileno, metilo, metano.

Los cofactores involucrados y que son típicos de estas bacterias son:

- Metilfurano
- Tetrahidrometanopterinina
- Coenzima
- Factor F_{430}
- Cofactor F_{420}

2.2. REACTORES ANAEROBIOS

Por mucho tiempo la digestión anaerobia se consideró como un proceso inestable y problemático, el cual a pesar de sus potenciales ventajas, sólo podía ser aplicado a contados casos como la digestión de lodos de purga. No obstante debido a las innegables ventajas del proceso es que se justifica el importante esfuerzo de investigación y de desarrollo tecnológico que ha rendido fruto en la década de los ochenta.

La evolución de los procesos anaerobios pueden caracterizarse en tres generaciones de reactores:

- *Reactores de Primera Generación:* Son aquellos en que la biomasa se encuentra sedimentada o en suspensión, con un mínimo de contacto con el sustrato
- *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, o

bien por sedimentación. En este grupo se encuentran el Filtro Anaerobio y el Reactor de Flujo Ascendente y Lecho de Lodos (UASB).

- *Reactores de Tercera Generación:* Contienen microorganismos en forma de biopelículas adheridas a soporte que se expanden o fluidifican.

El estado actual de la biotecnología para el tratamiento de aguas residuales, señala los reactores anaerobios de segunda generación como una alternativa atractiva de tratamiento. Esto se debe a que los de primera generación requieren de grandes volúmenes y no todos tienen eficiencias aceptables; y los de tercera generación se encuentra aún a nivel de desarrollo, aunque ya existen instalaciones a escala industrial.

Los reactores anaerobios que actualmente se comercializan para el tratamiento de aguas residuales son el reactor de lecho de lodos UASB, el filtro anaerobio o reactor empacado, el reactor de contacto anaerobio y el lecho fluidificado. De todos ellos, el reactor UASB es el que más se ha aplicado (Noyola, 1990)

2.2.1. Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente con Lecho de Lodos (UASB)

El concepto de UASB (por sus siglas en inglés *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) fue desarrollado por Lettinga y colaboradores (Lettinga *et al.*, 1980) en la Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda. Un esquema de este tipo de reactor se muestra en la Figura 2 .

Entre las características más importantes del reactor, se encuentra el flujo ascendente, el cual crea una presión de selección constante para organismos que pueden adherirse entre sí y formar gránulos. Los principios fundamentales de este tipo de reactores son:

- A) El lodo anaerobio tiene o puede tener excelentes características de sedimentación una vez que han obtenido y mantenido condiciones favorables de crecimiento microbiano.
- B) El lecho de lodos puede ser considerado como una fase separada del fluido con sus propias características específicas. Un lecho de lodos bien formado frecuentemente forma una fase estable y puede resistir fuerzas de mezclado relativamente altas. La redistribución del manto requiere una cantidad considerable de energía de mezclado.
- C) El “lavado” de los flocos liberados del lecho de lodos puede ser minimizado creando una zona de movimiento casi nulo dentro del reactor, por ejemplo, instalando un dispositivo de separación gas-sólido en la parte alta del digestor.

Las bacterias presentes en reactores UASB tienen la habilidad de formar partículas macroscópicas que contienen gran cantidad de células microbianas denominados gránulos. Estos pueden aglomerarse de forma natural por la síntesis de exopolímeros o artificialmente mediante la inmovilización de células a soportes sólidos (Bonet *et al.*, 1993; Schmidt y Ahring, 1994; Bhatti *et al.*, 1995). La configuración granular tiene ventajas entre las que se encuentran: **i)** Los microorganismos se compactan densamente, sin perder espacio por adición de un soporte inerte, **ii)** el gránulo esférico proporciona al microorganismo un máximo de espacio, **iii)** los gránulos muestran propiedades de

sedimentación excelentes debido a su gran tamaño comparado con una célula libre y **iv**) el área de reacción aumenta, aumentando así la cantidad de biomasa viable (Guiot *et al.*, 1992) e incrementando la productividad volumétrica.

Hasta la fecha el proceso de UASB es por mucho el más usado de los sistemas de alto rendimiento a nivel mundial. En América Latina la asimilación de la tecnología fue posterior a su desarrollo e implementación en países desarrollados.

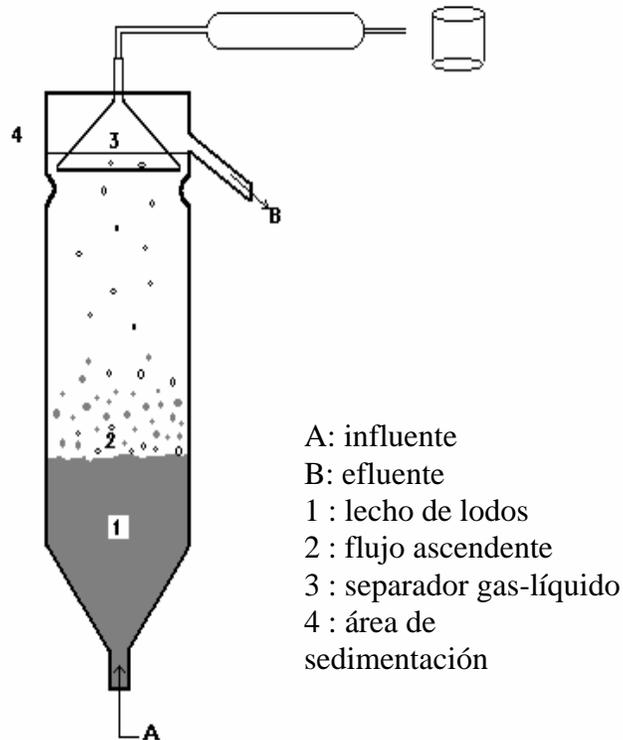


Figura 2 : Representación de un reactor UASB

2.3. DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DOS ETAPAS

La digestión anaerobia en dos etapas (DADE) se estudia desde hace 20 años (Ghosh y Pohland, 1974; Ghosh, 1981) con la idea de separar en base a consideraciones cinéticas, la acidogénesis en un reactor y la acetogénesis y metanogénesis en el segundo. El objetivo de la primera etapa es producir estable una mezcla de AGV que sirva como sustrato al segundo reactor, facilitando de esta manera la metanogénesis y evitar que el hidrógeno producido en la acidogénesis llegue al reactor metanogénico. Así, la idea es no permitir que se acumulen ni el H_2 , ni los ácidos propiónicos y butíricos en el reactor metanogénico y de esta manera, optimizar el proceso.

La DADE se ha usado cuando el sustrato:

- a) Es fácilmente acidificable. Para evitar la sobrecarga de AGV a las bacterias metanogénicas y ganar en estabilidad ante variaciones en carga orgánica, temperatura y pH.
- b) Es de difícil hidrólisis. Entonces esta reacción se optimiza en un primer reactor con generación de AGV, generalmente a un pH menor que 6.5

En estos casos donde hay separación de fases, las cargas aplicadas pueden ser de 50 a 100 % superiores con eficiencias del 10 al 30 % superiores, si se comparan con los mismos procesos en una sola etapa (Monroy, 1998). Pueden observarse también altas Bv aplicadas en la etapa acidogénica, en donde no siendo el objetivo la reducción de DQO, se logra esto por la formación de CO₂ y H₂. Si los reactores de acidificación tienen TRS menores a 6 horas, únicamente acidificarán; pero si el TRS se extiende permitiendo el desarrollo de de metanogénicas, se observará producción de CH₄ proveniente posiblemente de la reducción de CO₂. Los reactores de metanización son por lo general del tipo UASB, en donde también se lleva a cabo la metanización de los compuestos residuales.

En los últimos tiempos se empezó el uso de estos reactores en serie para la degradación de compuestos recalcitrantes. En este caso se aplica cuando:

- a) Se requiere una primera etapa para hidrolizar o romper moléculas que están en altas concentraciones para producir sustratos degradables por las bacterias acetogénicas-metanogénicas.
- b) Cuando se usa la primera para metanizar sustancias de fácil degradación dejando para etapas posteriores a las sustancias más recalcitrantes. En realidad, no hay separación de etapas, sino reactores anaerobios en serie degradando distintas sustancias en sucesión.

En cuanto a la microbiología se encontró que en una sola etapa las bacterias hidrogenotróficas se encuentran en menor cantidad que las acidogénicas y las OHPA. En el reactor acidogénico del sistema de dos etapas, se encuentran en las mismas proporciones.

2.4. BIODEGRADACION DE TIOCIANATO

El tiocianato (SCN⁻) es un ión poliatómico, linear, electronegativo y un buen ejemplo de un pseudohaluro (Hughes, 1975). Debido a algunas de sus propiedades raras únicas, el tiocianato es usado en una variedad de procesos industriales tales como la fabricación de películas fotográficas, la producción de herbicidas e insecticidas, colorantes, producción de fibras acrílicas, manufactura de tiourea, separación de metales, recubrimientos electrolíticos de metales. Usos adicionales de tiocianato incluyen la esterilización de suelos e inhibición de la corrosión (Beekhuis, 1975). También es uno de los principales constituyentes de las aguas residuales de los procesos de gasificación de hulla y carbón, limpieza de gas natural y pirólisis; y en nuestra país lo encontramos en las aguas procedentes de las plantas de

purificación de vacunas (comunicación personal). Por otro lado el cianuro (CN⁻) es usualmente convertido a tiocianato por reacción de adición de azufre, donde el tiocianato es menos tóxico que el cianuro para la degradación microbiana.

Este constituye una especie inorgánica que puede ser usado como fuente de energía, nitrógeno, azufre y/o carbono por numerosas bacterias autotróficas; principalmente *Thiobacillus sp.* y algunas heterotróficas (Happold *et al.*, 1954; Wood, 1975). Con la particularidad que el carbono y el azufre tienen vías metabólicas diferentes.

La degradación biológica de SCN⁻ ha sido extensivamente estudiada. Los tratamientos previos estudiados se han concentrado especialmente en las aguas residuales generadas por los procesos de gasificación de hulla y carbón y pirólisis (Banerjee, 1996). Se han trabajado con cultivos mixtos aislados de plantas de tratamiento de lodos activados y otros esfuerzos se han hecho en el área de aislamiento y obtención de cultivos puros que son capaces de degradarlo: *Thiobacilli*, *Pseudomonads* y *Arthrobacter spp.*. Aunque la utilización de cultivos puros puede ser una opción para el estudio de los parámetros cinéticos y elucidación de las rutas metabólicas de degradación del tiocianato, tales aproximaciones tienen poco valor práctico porque en los procesos biológicos reales de tratamiento se utilizan cultivos mixtos.

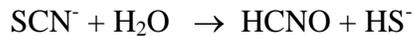
En cuanto a los valores de tiocianato degradados, son variados en dependencia de los inóculos utilizados. Una mezcla de cultivos desarrollada por Neufeld y Valiknac (1979) con inóculos de una planta de tratamiento de residuos de hulla, pudieron degradar una concentración de tiocianato de hasta 1 g/L. Un consorcio microbiano compuesto primariamente de *Pseudomonas* y *Bacillus*, degradaron tiocianato hasta concentraciones de 1.4 g/L en un período de 6 días en un sistema batch. El tiocianato hasta concentraciones de 240 mg/L en un agua residual sintética, fue removido en un reactor de contacto biológico a 35 °C (Banerjee, 1996). Por otro lado, cultivos puros han sido aislados capaces de degradar tiocianato de forma eficiente. El *Thiobacillus thiocyanoxidans* crece sobre tiocianato el cual le sirve de cómo fuente de energía, carbono, nitrógeno y azufre. Las concentraciones óptimas para su crecimiento fueron de 145 mg/L, y a una concentración alrededor de 1.16 g/L de SCN⁻ se convierte en inhibitoria (Happold *et al.*, 1954). Stafford y Callely (1969) aislaron un microorganismo similar a *Pseudomonas stutzeri* la cual utiliza KSCN como fuente de nitrógeno y azufre. *Thiobacillus thioparus* es capaz de asimilar completamente hasta 500 mg/L de KSCN en un período de 60 horas, pero esta degradación es marcadamente inhibida por la presencia de tiosulfato. Además de *Thiobacilli* y *Pseudomonads*, una especie de *Arthrobacter* fueron aisladas del suelo por Betts *et al.* (1979) la cual utiliza tiocianato como fuente de nitrógeno y azufre y tolera concentraciones hasta de 5.8 g/L. Otra bacteria gram-negativa heterotrófica identificada como 26 B, aislada de suelos, pudo utilizar tiocianato como fuente de nitrógeno, hasta 100 mM; con la particularidad de que la conversión de cianato llevó a la formación de amonio bajo condiciones anaerobias (Stratford *et al.*, 1994). Y por último, *Methylobacterium thiocyanatum sp. nov.* es capaz de crecer sobre tiocianato y cianato como única fuente de nitrógeno, tolerando concentraciones de hasta 50 mM.

Thiobacillus thioparus, el cual es una bacteria del azufre quimiolitotrófica, puede obtener energía para la degradación de tiocianato. En este microorganismo se ha encontrado una nueva enzima, la tiocianato hidrolasa, que cataliza la conversión de tiocianato a sulfuro

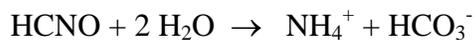
de carbonilo y amonio como primer paso en la degradación de este compuesto por los microorganismos autotrófico. Esta ruta es fundamental en la degradación de contaminantes azufrados presentes en emisiones gaseosas como el disulfuro de carbono (CS₂) y el sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Marisol, 1999).

El tiocianato puede ser también utilizado por bacterias heterotróficas, en el cual es hidrolizado a cianato y sulfuro y luego el cianato es convertido a CO₂ y NH₄⁺. Esta vía oxidativa del tiocianato está muy bien estudiada como se lleva a cabo y donde el sulfuro es oxidado a SO₄²⁻. Las reacciones son las siguientes:

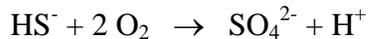
a) Hidrólisis del tiocianato



b) Hidrólisis de cianato



c) Oxidación de sulfuro



c) Reacción global



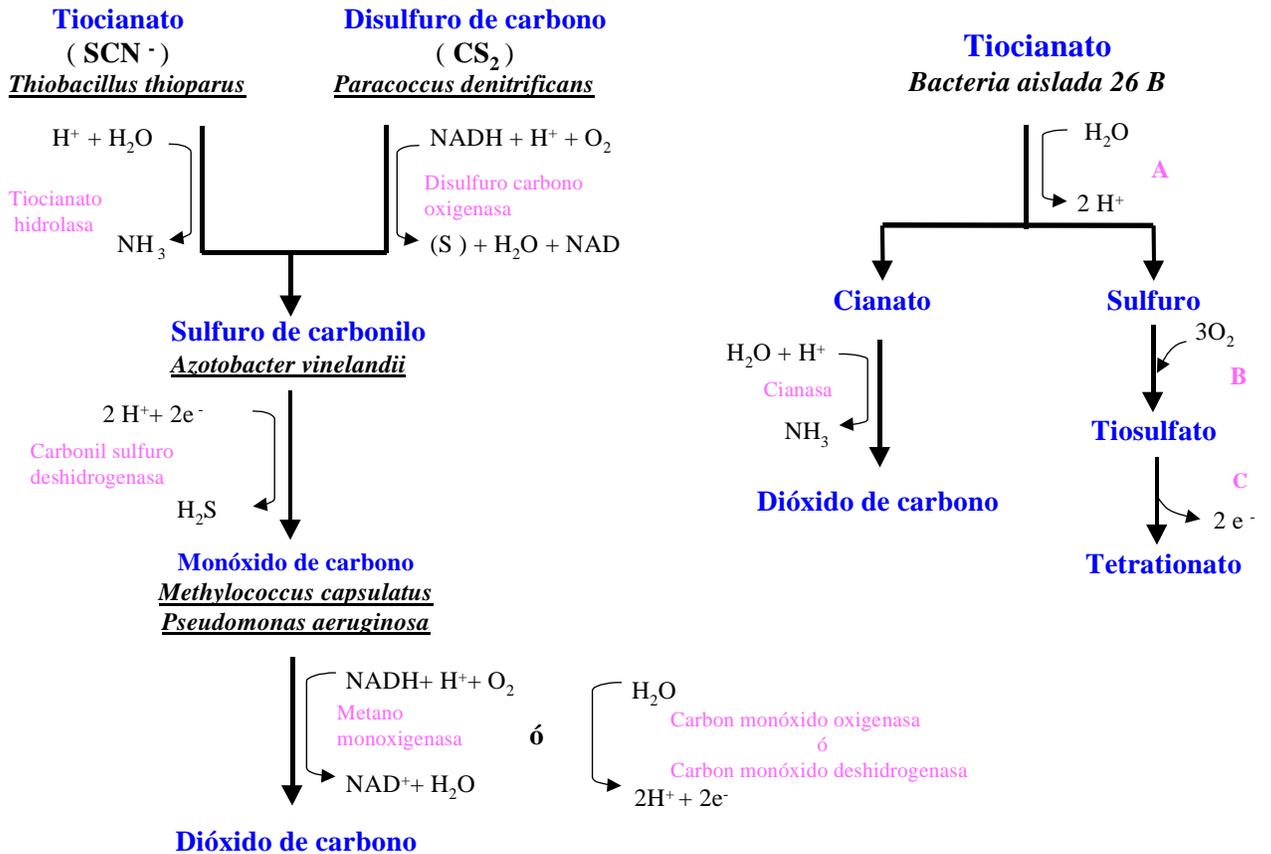
El cianato es un producto intermediario en el primer paso de hidrólisis de tiocianato y es subsecuentemente hidrolizado por la actividad de la cianasa, cuya actividad es inducible y se ha demostrado que puede hidrolizar cianato también bajo condiciones anaeróbicas. La oxidación del tiocianato por una mezcla de lodos activados fue logrados en un trabajo previo (Hung y Pavlostathis, 1997) lo cual confirmó la ruta anteriormente descrita.

Las rutas metabólicas para utilización del tiocianato por microorganismos y compuestos intermedios son mostradas en la figura 3. Los organismos los cuales inician la vía son dados, pero otros microorganismos pueden también llevar a cabo pasos posteriores

:

Figura 3. Rutas de degradación oxidativa del tiocianato por microorganismos

Rutas de biodegradación del tiocianato



Muy poco es conocido sobre la biodegradación de tiocianato en condiciones metanogénicas, aunque Hutchinson *et al.* (1965) reportó la utilización de tiocianato por *Thiobacillus denitrificans* y Andreoni *et al.* (1988) reportó la degradación de tiocianato por bacterias aeróbicas facultativas pero bajo condiciones denitrificantes. También en estos estudios, el tiocianato fue oxidado y el sulfato fue producido

2.5. VINAZAS: PRODUCCION Y CARACTERISTICAS

La producción de alcohol por medio de fermentaciones es una actividad industrial mundialmente esparcida. Los productos agrícolas como azúcar de caña, remolacha, uvas, papas, diversos granos, agave, etc., son utilizados directamente o en la forma de subproductos de su procesamiento, para proveer el sustrato carbonáceo (azúcares) para la fermentación alcohólica por medio de levaduras.

El paso de separación utilizado en el proceso (destilación con dos o tres columnas, dependiendo de la concentración de etanol requerida produce un agua residual fuertemente contaminada conocida como vinaza, la cual ocasiona problemas importantes para su

tratamiento y evacuación final. El volúmen de residuos producidos es de alrededor de 10-14 volúmenes de vinaza por volumen de 95% (Noyola, 1996)

Las características de la vinaza obtenida en una industria específica dependerá del tipo de materia prima, del proceso de fermentación, si se lleva a cabo o no la separación y de los procedimientos y controles específico aplicados durante la producción. La tabla del anexo 1 presenta información acerca de las características de las vinazas de de diferentes sustratos..

2.5.1. Tratamiento de las vinazas

Los intentos de tratar la vinaza por métodos físico-químicos no han sido exitosos, como lo reporta Sheehan y Greenfield (1980) en su revisión. Por el contrario, el alto contenido de materia orgánica hace de este residuo un buen candidato para tratamiento biológico de aguas residuales, incluso si la calidad del efluente obtenida no cumple con las regulaciones ambientales locales para descarga directa a cuerpos receptores de agua.

La digestión anaerobia es altamente aplicable para tratamiento de vinazas, básicamente debido a las concentraciones en DQO y DBO. Las ventajas conocidas del tratamiento anaerobio son aumentadas cuando el DQO en el agua residual aumenta. Así es que su aplicación en vinazas está particularmente bien justificadas. Además, la biomasa anaerobia puede dejarse sin alimentar por semanas y hasta meses, sin perder actividad metabólica, haciendo esto una ventaja única e interesante en el caso de industrias estacionales, como la mayoría de las destilerías.

En el pasado se llevaron a cabo algunas experiencias utilizando procesos aerobios para tratamiento de vinazas, pero generalmente diluidos, utilizando lodos activados, filtros rociadores y contacto biológico rotatorios (Sheehan y Greenfield, 1980). También se han utilizado lagunas en destilerías cuando hay suficiente terrenos disponibles y los malos olores pueden tolerarse.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTORES UASB DE LABORATORIO

Son recipientes cilíndricos con el extremo inferior en forma cónica por donde se realiza la alimentación. En la parte superior de cada reactor, un embudo de vidrio realiza la separación gas-sólido-líquido. Las burbujas de gas y los sólidos arrastrados por ellas son desviadas hacia la campana mediante un deflector colocado en todo el perímetro interno a 1 cm por debajo de la campana. En esta sección el agua fluye entre las campanas y la pared del reactor.

Los reactores se mantuvieron en un cuarto a temperatura controlada (24°C - 26°C) durante el tiempo de la experimentación. Se usaron dos tamaños de reactores. Uno era el reactor acidogénico de 0.48 L de volumen útil y el otro el reactor metanogénico de 1.49 L de volumen útil.

En el experimento consistente en digestión anaerobia en dos etapas, los reactores se instalaron como se muestra en la figura 4. La salida del reactor metanogénico (SRM) se recirculaba mediante un recipiente (3) que recibía y mezclaba las corrientes de salida de los dos digestores. Una misma bomba peristáltica (1) con dos cabezales regulaba el flujo de entrada y salida del sistema. Una segunda bomba peristáltica (2) mantenía el caudal de recirculación.

3.1.1. Etapas de alimentación del reactor

En la siguiente tabla se muestra las diferentes etapas de alimentación :

Tabla 2: Etapas de experimentación en el reactor

Etapas	DQO (mg / L)	Tiocianato (mg / L)
I	77-99	-
II	74-88	50
III	56-89	100
IV	55-89	250
V	60-88	500

3.1.2 Medición del gas producido

Se tiene un equipo que permite medir la producción de manera más precisa (ver anexo II). El aparato consiste en un sistema de dos vasos comunicantes al cual se conecta la corriente de biogas proveniente del digestor. Al desplazarse un volumen pequeño de solución salina (50 mL) un contador registra la operación y abre una válvula solenoide que nivela las presiones y el nivel de los vasos comunicantes para iniciar un nuevo ciclo. Las muestras de gas se toman en el cilindro de entrada de gas.

Para la determinación de la producción de biogas, sólo se tomó el valor del marcado en el equipo contador (cada ciclo equivale a 60 mL) y se ajustó a condiciones estándar de presión y temperatura tomando como 0.8 atm la presión atmosférica y 35 ° C la temperatura del sistema.

3.1.3 Medición del caudal tratado

Se medía diariamente el volumen de efluentes y se dividía entre el tiempo transcurrido.

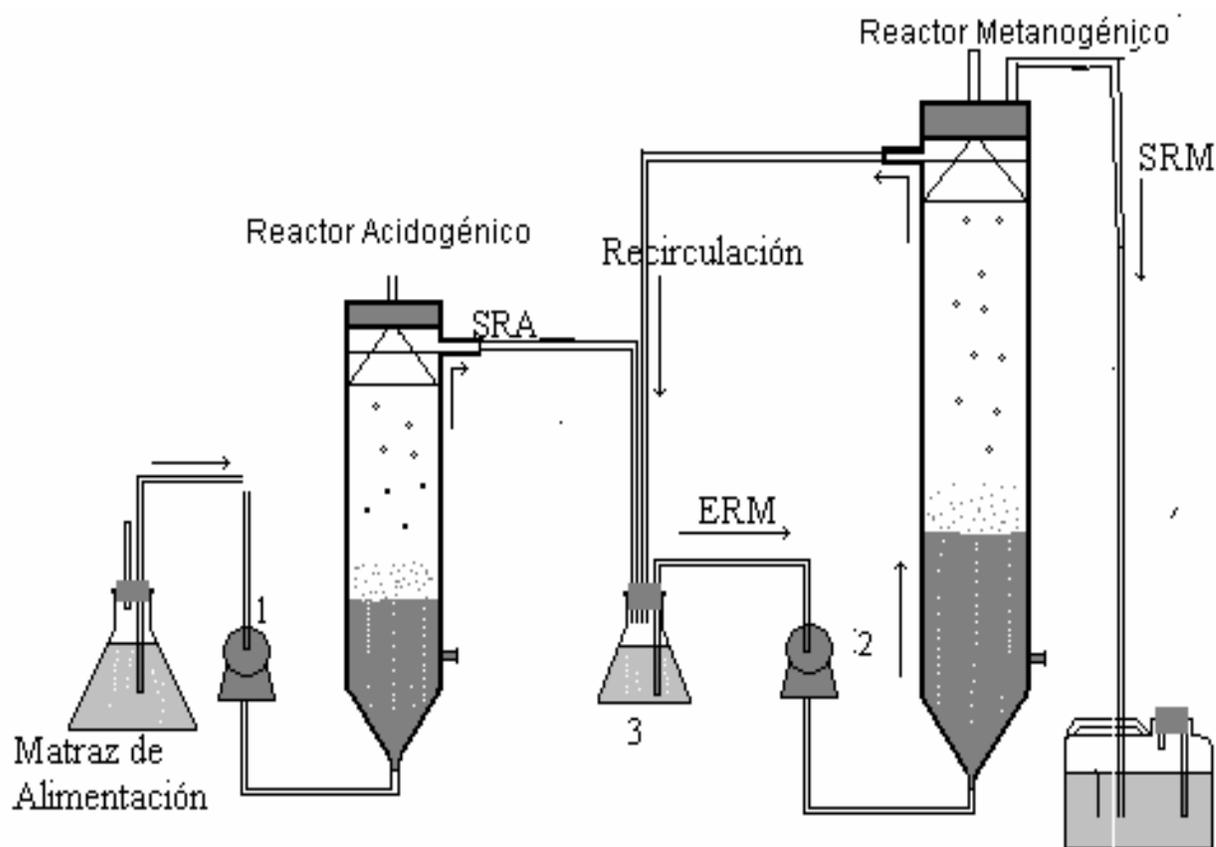


Figura 4. Reactores UASB de laboratorios conectados en serie, los cuales fueron utilizados durante la experimentación

3.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se evaluó el funcionamiento del reactor a la entrada y a la salida cada 24 horas, utilizando las técnicas analíticas que se muestran a continuación

Tabla 3: Técnicas analíticas utilizadas en el trabajo experimental

Influyente del RA	Efluente del RA	Efluente del RM	Técnica
pH DQO AGV Sulfatos (SO ₄ ²⁻) Tiocianato (SCN ⁻)	pH DQO AGV Sulfatos (SO ₄ ²⁻) Tiocianato (SCN ⁻)	pH DQO AGV Sulfatos (SO ₄ ²⁻) Tiocianato (SCN ⁻) Alcalinidad (R.A)	Instrumental Reflujo cerrado Cromatografía gaseosa Electroforésis capilar Electroforésis capilar (CIA) Instrumental

3.3. INOCULO Y AGUA RESIDUAL

Microorganismos

El reactor fue inoculado con un cultivo mixto de microorganismos (lodo granular) obtenidos de la purga de un reactor UASB industrial

Residual

El residual a tratar en nuestro caso fue vinaza de destilería (a partir de agave) obtenidas de una industria de rones de Veracruz. Antes de alimentar al reactor se adicionó a la vinaza 2 g/L de bicarbonato de sodio para suplir en nutrientes y se llevó hasta pH 4.2-4.5 con NaOH. Con este residual se alimentó al reactor sin realizarle ninguna dilución.

3.4. METODOS ANALITICOS

3.4.1 Demanda Química de Oxígeno

La determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) es empleada como una medida del contenido de oxígeno equivalente de la materia orgánica de la muestra que es susceptible a oxidación por un oxidante químico fuerte.

Se usó el método de reflujo cerrado (APHA, 1995) y se realizaron las diluciones necesarias (diluciones 1/100) para que las lecturas estuvieran dentro de un intervalo 0-1200 mg/L y modificado por (Wilson y Jarbas, 1989) usando un horno de microwaves casero. En el anexo III y IV se muestran las soluciones a utilizar para la determinación y el procedimiento analítico a seguir.

Curva estándar de DQO

Se preparó una curva estándar con una solución de glucosa de 1 g/l teniendo en cuenta que 0.4686 g/L de glucosa = 0.5 g/L de DQO. La curva estándar se muestra en la figura 5. Cada punto se hizo por triplicado. Basándonos en la curva, la ecuación para cuantificar la DQO fue:

$$\text{Absorbancia} = 2416.5\text{DQO}(\text{mg O}_2) + 2.2042 \quad \dots\dots\dots (1)$$

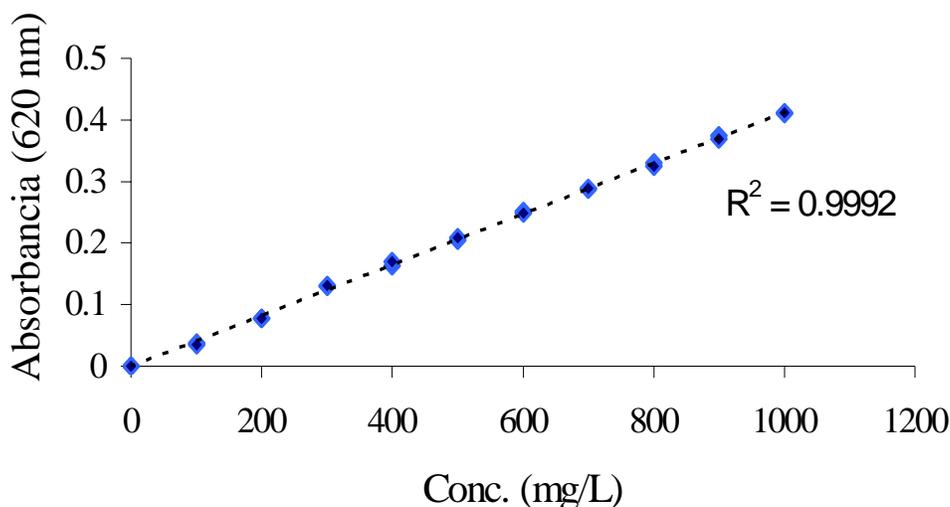


Figura 5. Curva estándar para cuantificar la DQO

3.4.2 Metano y dióxido de carbono en el biogas

Con una jeringa desechable se tomó del colector de los reactores de una muestra de 5 mL de biogas y se inyectó a un tubo de Hungate lleno de solución salina saturada que sería desplazada por el gas a través de una aguja hipodérmica de purga. De la fase gaseosa del tubo se tomó una muestra de 0.1 mL para analizarse en un cromatógrafo de gases Gow-Mac con detector de conductividad térmica y una columna de acero inoxidable empacada con carboxsphere. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron:

- Temperatura del inyector 170 °C
- Flujo del gas acarreador (He) 30 mL/min.
- Temperatura de la columna 140 °C
- Corriente de los filamentos 120 mA
- Temperatura del detector 190 °C

Curva de calibración

Se prepararon tubos de Hungate llenos de solución salina saturada, a los cuales se les inyectó CH₄ y CO₂ en las proporciones de la tabla 4

Cada estándar fue inyectado por duplicado al cromatógrafo y se correlacionó la fracción volumétrica de cada gas en las muestras con las fracciones del área de metano entre las sumas de las áreas del metano y del dióxido de carbono (A CH₄/Area total). La curva estándar obtenida se muestra en la Fig.

Tabla 4 : Preparación de la curva de calibración para CH₄ y CO₂

Tubo No.	mL CO ₂	mL CH ₄	% CO ₂	% CH ₄
1	1	9	10	90
2	3	7	30	70
3	5	5	50	50
4	7	3	70	30
5	9	1	90	10

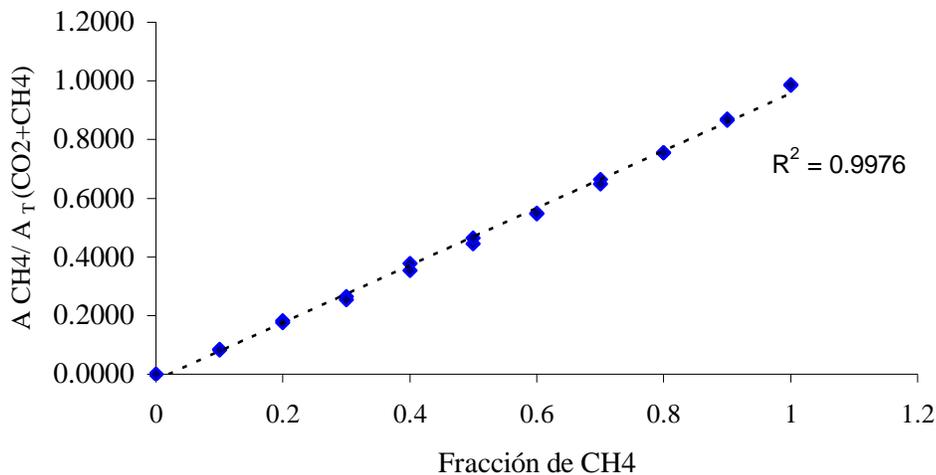


Figura 6 . Curva estándar para cuantificar metano

Para tomar en cuenta el vapor de agua en el biogás, el contenido de CH₄ se ajustó mediante la siguiente ecuación que proviene del balance de materia en el gas:

$$Y_c = y_c' (1 - p_v/P)$$

p_v → presión de vapor de agua a 35 °C (0.05549 atm)

P → presión atmosférica (0.8 atm)

Y' → es la fracción molar de CH₄ o del CO₂ obtenidas por el método descrito

Y → es el valor corregido por la presión p_v

Con el objeto de calibrar las mediciones de CH₄ y de hacer balances de materia, se calculó la producción teórica con base a la eliminación de DQO de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Q_{CH_4} \text{ teórica} = D (S_0 - S) \mathbf{0.34 \text{ L CH}_4/\text{g DQO}} = \mathbf{L \text{ CH}_4/\text{L} \cdot \text{d}}$$

3.4.3 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 (Eaton *et. al.*, 1995). En la alcalinidad contribuyen principalmente los iones bicarbonatos CO₃H⁻, carbonato CO₃²⁻ y oxhidrilo OH⁻ (APHA, 1995). Se propuso medir la alcalinidad utilizable en las condiciones de operación del reactor. La propuesta por Jenkins *et. al.* (1983), la cual consiste en una doble valoración de 20 mL de muestra en agitación, hasta pH 5.75 y luego pH 4.3, con una solución de H₂SO₄ 0.02 N. Para el cálculo de la relación de alcalinidad (R.A) se empleó la siguiente ecuación:

$$R.A = V_{5.75} / V_{4.3}$$

$V_{5.75}$ → Volumen de ácido empleado hasta llegar a pH 5.75

$V_{4.3}$ → Volumen empleado hasta llegar a pH 4.3

.

3.4.4 Sólidos suspendidos

Se determinó por gravimetría según el Standard Methods (APHA, 1995). Determinando las diferencias de pesada a 105 °C para los sólidos suspendidos totales y a 500 °C para los volátiles. Se empleó papel de filtro de lanas de vidrio y se filtró al vacío.

3.4.5 Determinación de AGV

Se determinaron por cromatografía de gases utilizando el método del estándar interno, pudiendo determinar ácido acético, propiónico y butírico y los ácidos grasos volátiles totales. La preparación del estándar interno se especifica en Anexos IV.

Las muestras fueron diluidas (1/10) y previamente centrifugadas a 15 000 r.p.m por 15 min. en una microcentrífuga Eppendorf, antes de adicionarles el estándar interno. El volumen de inyección al cromatógrafo fue de 0.2 μL.

El cromatógrafo estaba equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar Superox FA Alltech (AT 1000) de 10 m. Las condiciones de operación del equipo fueron:

- Temperatura del inyector 130 °C
- Temperatura del detector 150 °C
- Régimen isotérmico
- Temperatura de la columna 120 °C
- Flujo del gas acarreador (N₂) 3 mL/ min

3.4.6 Determinación de sulfatos

Al ser la vinaza un residual rico en este tipo de compuesto, es necesario monitorear los valores y posibles conversiones del SO₄²⁻ puesto que de sus concentraciones puede depender que exista competencia entre bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras.

Preparación de las muestras: Se realizaron diluciones (1/50) de las muestras a analizar (vinaza, efluente del reactor acidogénico y efluente del reactor metanogénico). Luego estas se centrifugaron a 15 000 r.p.m durante 15 min. Y posteriormente fueron filtradas con membranas de nylon de 0.45 µm (NALGENE™ 4 mm)

Para la cuantificación de sulfatos se analizaron las muestras en un equipo de electroforesis capilar (CIA) , para lo cual la metodología de preparación del estandar y el electrolito se muestran en el anexo 4:

Las condiciones de corrida para el equipo de electroforesis capilar fueron las siguientes:

Electrolito	4 mM Cromato de sodio, 0.3 mM CIA-Pak™ OFM Anion BT, pH 8 0.16 mM Tungstato de sodio
Temperatura	25 °C
Voltaje aplicado	18 KV
Polaridad	Negativo
Rango de sensibilidad	0.001
Corriente	16 µ A
Inyección hidrostática	9.8 cm por 30 segundos
Capilar	Sílice fundido, largo 60 cm, grosor 75 µ m
Detector	UV a 254 nm (lámpara de Hg)

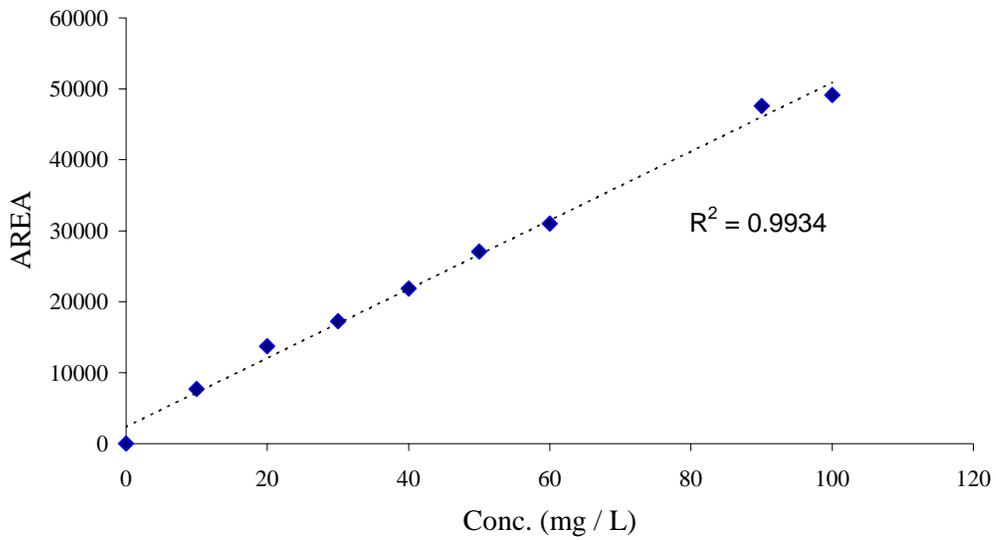


Figura 7. Curva estándar para la determinación de sulfatos

3.4.7 Determinación de tiocianato

Se hizo en Electroforesis Capilar y se mantuvieron las mismas condiciones de corrida que las empleadas para determinación de sulfatos. Los estándares se prepararon según las concentraciones de tiocianato trabajadas.

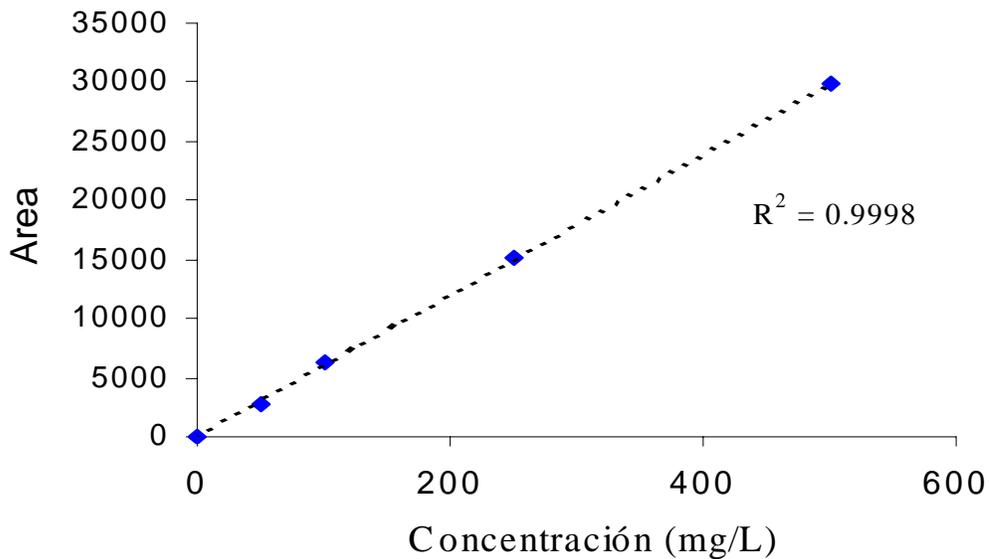


Figura 8. Curva estándar para la determinación de Tiocianato

3.5. PRUEBAS EN LOTE

3.5.1 Determinación de actividad metanogénica

Para la evaluación de la actividad metanogénica de los lodos del reactor frente al tiocianato se realizó una cinética en botellas serológicas de 120 mL. El procedimiento fue el siguiente:

Se adicionó en las botellas, bajo corriente de N₂, 4 mL de lodos de 53.43 g SSV/ L obtenidos del reactor metanogénico. Luego se le añadió 56 mL de la solución en particular, ya sea acetato (Control) o vinaza garantizándose una concentración final de las soluciones de 0.277 g DQO para garantizar que sean cargadas con cargas másicas ($B_x = 0.5 \text{ g DQO/ g SSV} \cdot \text{L}$) semejantes a las del reactor. En el caso de los tratamientos con tiocianato se le añadió este en las cantidades determinadas para obtener una concentración final de 50 mg, 100 mg, 250 mg, 500 mg, 1000 mg y 2000 mg, según sea el caso.

Se pusieron en baño a una temperatura constante de 35 °C y la variable de respuesta fue la producción de metano en el tiempo, medida por desplazamiento de una solución de sosa (NaOH 1 N). Un esquema del sistema experimental utilizado para estos ensayos se muestra en Anexo VI.

La actividad metanogénica es expresada como g DQO/ g SSV*d y calculada de la velocidad de producción de metano (dV_{CH_4}/ dt) con la siguiente ecuación (Soto *et al.*, 1993):

$$A.M = (dV_{\text{CH}_4}/ dt) / (X_0 V_R f)$$

$X_0 \rightarrow$ Biomasa del lodo (g SSV/ L)
 $V_R \rightarrow$ Volumen útil de las botellas
 $f \rightarrow$ factor de conversión el cual representa los valores de DQO por unidad de volumen de metano. En este caso se tomó 340 mL CH₄/ g DQO

3.5.2. Ensayos abióticos

Pruebas en lote en condiciones abióticas se llevaron a cabo para probar la estabilidad del tiocianato en condiciones similares a las que se lleva a cabo la experimentación. Para ello se utilizó agua destilada llevadas a pH 4 y 7.5 (según sea el caso) y con lodos en las mismas concentraciones que las empleadas en los anteriores experimentos y autoclaveados. Se determinó la concentración de tiocianato diaria, extrayendo alícuotas de las botellas en condiciones estériles y reductoras (flujo de N₂). La experimentación tuvo una duración de 72 horas.

4.RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Caracterización del residual. Inóculo.

Para la selección de tecnologías adecuadas para el tratamiento de un agua residual dada, se debe tener en cuenta como primer aspecto la caracterización de esta. Esta información permitirá evaluar las tecnologías disponibles en base a la presencia de compuestos químicos, presencia de tóxicos, parámetros químico-físicos, etc.; promoviendo la selección de tecnologías adecuadas en base a las experiencias que se tienen.

La tabla muestra los resultados de la caracterización que se realizó de la vinaza con la que se procedió a trabajar durante todo el experimento y la comparación de esta con la vinazas trabajada en el Centro de Estudios de Biotecnología de la Universidad de Oriente, procedente de la Destilería de Santiago de Cuba.

Tabla 5: Caracterización de vinazas

Parámetros	Vinaza (agave)*	Vinaza (melaza)
DQO _T	69 – 112	45 – 73
DQO _S	67.6 – 95.9	42 – 67
SST	2.05 – 2.18	2.8 – 3.8
SSV	1.69 – 1.87	
SSF	0.305	
Sulfatos	0.225 – 0.29	0.215 – 0.26
Azúcares	17 – 26	20 - 51
Fósforo	0.76 – 0.94	
Potasio	0.29 – 0.345	3.2
AGV	0.2 – 1.3	2.2 – 2.3

* Vinaza con la que se trabajó durante toda la experimentación.

La materia prima de la cual procede la vinaza está referida entre paréntesis. Todos los valores son dados en g/L, excepto el pH.

Las variaciones encontradas entre las diferentes caracterizaciones demuestran que la composición de las vinazas dependen de parámetros tan disímiles como la materia prima, la tecnología de destilado y aún dentro de ellos varían en dependencia de las especificaciones de calidad y eficiencias de cada proceso. Por lo que a pesar de que existe una vasta experiencia en el trabajo con este residual, se deben estudiar las características específicas de la vinaza antes de someterse a la propuesta de tratamiento. En este contexto frecuentemente se requerirá de experimentación en laboratorios y plantas piloto para poder escalar con confianza.

No obstante tener variaciones en su composición, se puede observar que este residual presenta valores de pH muy bajos, sólidos en suspensión apreciables y altas cargas orgánicas (por encima de 5 g/L) que lo clasifican como un residual altamente agresivo para su disposición directa a recursos hídricos. 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.

La presencia de un pH por debajo de 6 y de material fácilmente fermentables, justifica la implementación de un sistema en dos etapas que favorecería la utilización de los ácidos volátiles presentes y a formarse, de forma eficiente por parte de las bacterias acetogénicas y metanogénicas presentes en el reactor metanogénico para formar CH₄.

Como el proceso de digestión anaerobia para este tipo de residuales fácilmente fermentables es esencialmente difásico, los problemas de estabilidad que a menudo se presenta puede ser debida a desbalances que ocurren entre aquellos grupos de microorganismos que realizan la acidificación inicial y aquellos que efectúan la conversión final de sustratos a metano, permitiendo la acumulación de productos intermediarios con una resultante caída en el valor de pH y por ende en una acción tóxica sobre la microflora metanogénica. La implementación acertada de las dos etapas en el tratamiento anaerobio tendrá como ventajas :

- Mantener y optimizar densidades apropiadas de bacterias, tanto acidogénicas como metanogénicas, para la formación de ácido y metano respectivamente.
- Incrementar la estabilidad del proceso, por cuanto el reactor de la fase ácida es capaz de actuar como un sistema buffer metabólico.
- Las sobrecargas pueden ser prevenidas por medio del propio control de la acidificación.
- Los materiales tóxicos a los metanógenos pueden ser removidos, o al menos una buena parte de ellos, previamente en el reactor de fase ácida.
- Se incrementa la actividad específica metanogénica.
- Se maximizan las velocidades de remoción en los digestores.
- Se logra el enriquecimiento del producto gaseoso con metano.

El pH tan ácido que presenta (3.5 – 3.8) requiere de una neutralización aún cuando se implemente el sistema en dos etapas, hasta llegar a valores apropiados para el funcionamiento del reactor acidogénico (4 – 5) y para lograr una capacidad buffer que permita regular la acidez que se produce durante la síntesis de AGV. Esto se logra con la adición de NaHCO₃, pero en menores cantidades que las que se requerirían si se trabajara en una sola etapa, presuponiendo un ahorro en compuestos químicos (neutralizantes).

Continuando con la caracterización dada en la tabla , se aprecia que en relación al contenido de sulfatos presente los valores determinados son similares a la otra vinaza mostrada pero son menores que los reportados como promedio para las vinazas alcohólicas (ver Anexo) lo que llega a constituir un problema serio y a tener en cuenta durante el monitoreo del tratamiento de estas. Se conoce que en presencia de SO₄²⁻ en cantidades no limitantes, las bacterias sulfatorreductoras entran en competencia con los metanógenos por los sustratos comunes H₂ / CO₂ y acetato (Omil *et al.*, 1995; Bonilla, 1999).

Respecto al contenido de potasio (ver tabla), también es relativamente bajo en relación con vinazas procedentes de melazas. Esto constituye un aspecto positivo debido a que se conoce que el potasio es un extractante de micronutrientes (Ilangovan y Noyola, 1993) y a veces se señala como un problema pues reduce la disponibilidad de micronutrientes siendo necesario la adición de sales.

Las características del inóculo empleado para la digestión anaerobia es muy importante porque este puede determinar numerosos parámetros tecnológicos, incluso que el proceso pueda ocurrir; por lo que se debe hacer una adecuada selección del mismo y aclimatación al residual (Valdés *et al.*, 1998).

En este trabajo se utilizó un lodo graular obtenido de una planta de tratamiento industrial que presentó valores de 83 % de biodegradabilidad de esta vinaza, lo que lo hace un inóculo muy bien adaptado a las características del residual. También se puede señalar que los valores iniciales de SSV fueron de 12 g/L; obteniéndose al final de la experimentación valores superiores en ambos reactores (R. acidogénico de 71.47 g SSV/L; R. metanogénico de 53.43 g SSV/L) lo que es muestra del incremento de la biomasa en los gránulos, permitiendo el funcionamiento adecuado de los UASB.

También desde el punto de vista morfológico del lodo del reactor metanogénico se observa una buena granulación con la alimentación de la vinaza, obteniendo gránulos de hasta 0.2 cm. La exposición del tiocianato no varió al menos el aspecto de los gránulos (Ver Anexo).

2. Funcionamiento del reactor

Como habíamos dicho anteriormente, debido a las características de la vinaza empleada como cosustrato, se seleccionó trabajar en un sistema DADE.

En las Figuras se muestra el comportamiento del proceso con respecto a la carga orgánica (DQO).. En la etapa acidogénica casi no hay remoción de la DQO, partiendo del hecho de que la función de este reactor es la conversión de esa DQO en compuestos volátiles. La remoción de DQO de alrededor de 70 % fue verificado en el reactor metanogénico.

De resultados de varios trabajos de investigación anteriores, se plantea que las vinazas deben ser diluidas en cierto grado (1/4 – 1/1.5) para alcanzar eficiencias de remoción de la DQO por vía anaerobia de alrededor del 65 – 70 %; entre mayor sea la dilución aplicada, mayor remoción de DQO se obtiene (Driessen *et al.*, 1994; Noyola, 1996). Altas cargas pueden aplicarse a nivel de laboratorio sin dilución pero con adición de micronutrientes y remoción de H₂S; según Espinosa *et al.*(1995).

Se evidencia la robustez del sistema frente al tóxico. Una vez comienza a alimentarse el reactor con tiocianato, hay una ligera caída de la remoción; pero a medida que se aclimata la biomasa, se vuelven a incrementar la eficiencia de remoción a valores similares a los que presentaba el sistema sin adición de vinaza (70 %).

Es significativo tener valores de remoción del orden de 70 % aún cuando se trata vinaza sin diluir y en presencia de un compuesto que puede ser tóxico al sistema como es la presencia de tiocianato. Lo que demuestra lo acertado del empleo de un sistema difásico para el tratamiento de estos compuestos, cuando se conoce que este constituye un residual que tiende a acidificarse e inhibir las bacterias metanogénicas por presencia de compuestos como AGV, iones (Na⁺, K⁺), compuestos fermentables, etc.

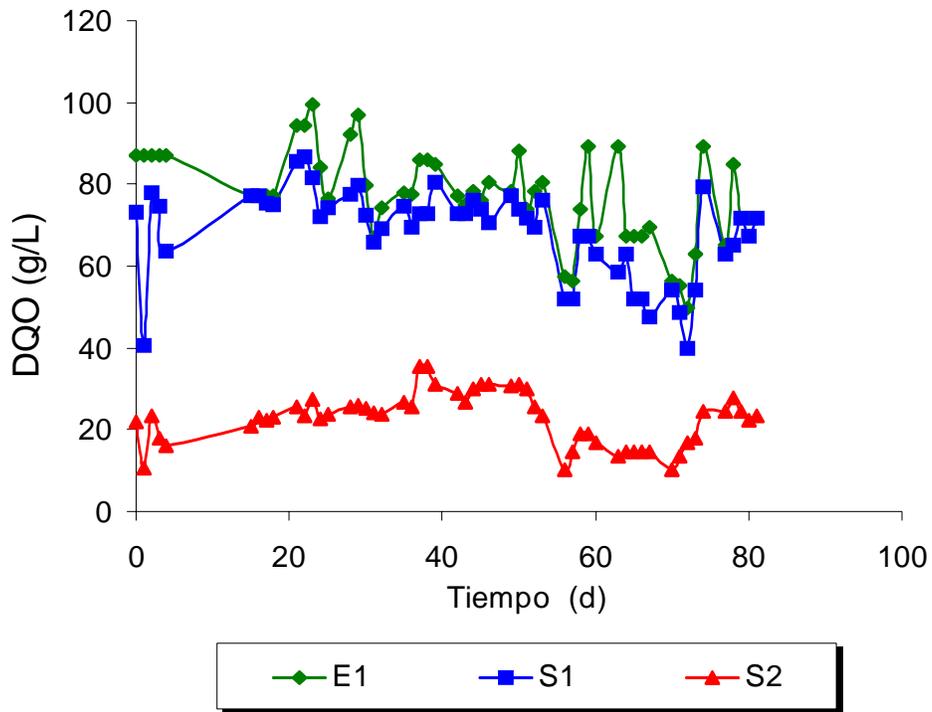


Figura : Comportamiento de la DQO en ambos reactores

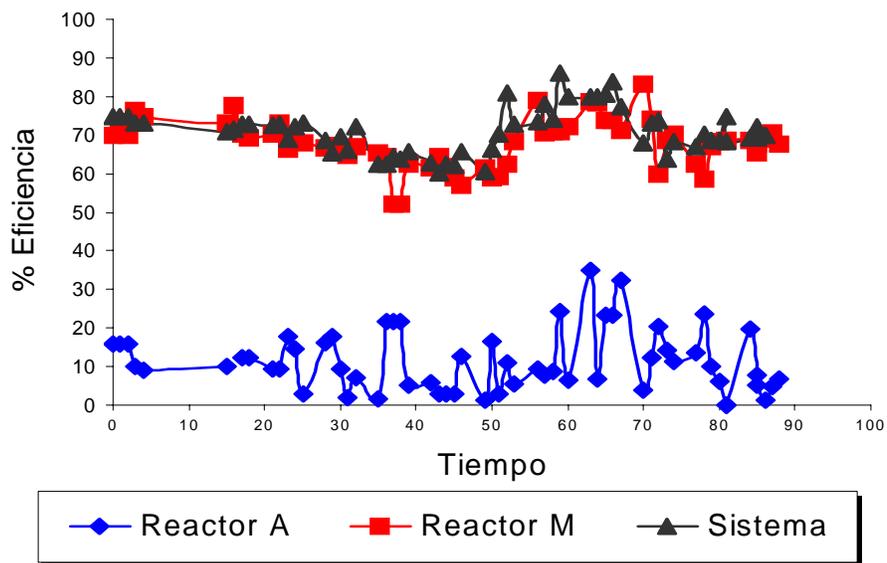


Figura : Eficiencias de remoción obtenidas durante la experimentación.

Esto posibilita que en procesos donde se liberen grandes cantidades de KSCN pueda emplearse la vinaza como cosustrato con la finalidad de diluir las concentraciones de este ión, ya que se sabe que altas concentraciones de SCN^- en aguas residuales sometidas a tratamientos biológicos pueden resultar en procesos inestables (Hung y Pavlostathis, 1999).

El mantenimiento del comportamiento de las eficiencias de remoción en valores semejantes a los que se obtienen sin alimentación del SCN^- , permite inferir que la presencia de tiocianato no tiene efectos adversos sobre la degradación de las sustancias orgánicas por una población heterótrofa.

Aún cuando se logran eficiencias de remoción altas, por las elevadas cargas que presenta este residual el efluente de salida tiene valores de DQO entre 15 – 25 g / L; por lo que la digestión anaerobia por sí sola no alcanzará la calidad del efluente que exigen las normas ambientales. En este caso podría ser necesario valorar un postratamiento aerobio. Se ha probado que la integración de procesos anaerobios-aerobios es la solución técnico y económica más conveniente para el tratamiento de aguas residuales de alta carga (Eckenfelder *et al.*, 1988). Con esta combinación de procesos el tratamiento anaerobio removerá aproximadamente el 70 % de la DQO biodegradable, con bajos requerimientos energéticos y producción de lodos; dejando el resto al pulido aerobio, que requerirá menos energía para aireación y producirá menor cantidad de lodos que un proceso totalmente aerobio.

En la fig. se muestra la producción de metano en el reactor metanogénico. En el reactor acidogénico los valores detectados de metano son insignificantes.

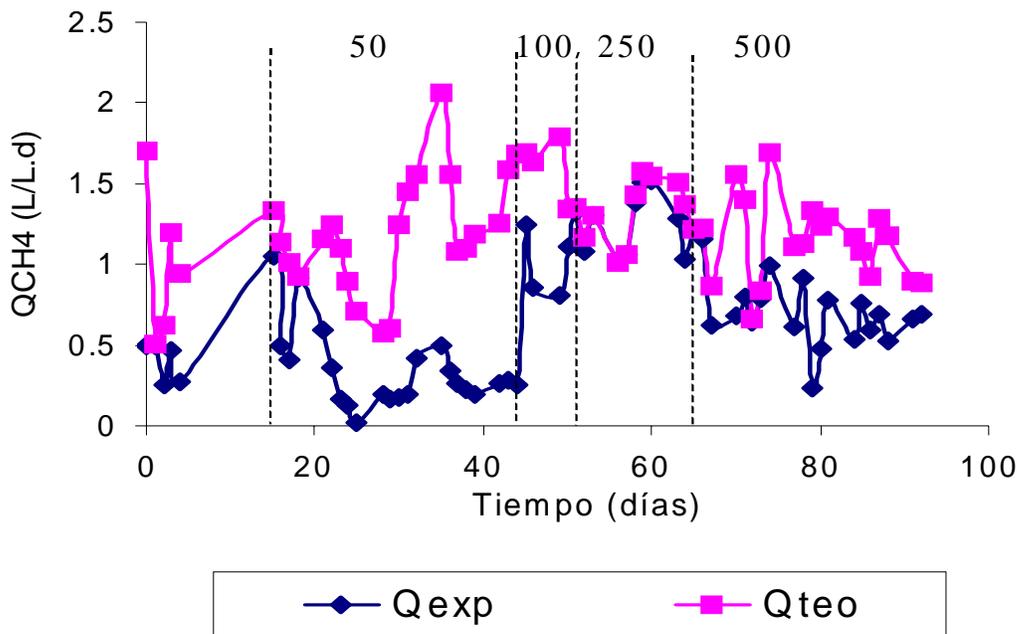


Figura : Producción de metano en el reactor metanogénico

En cuanto a la producción de metano reflejada en la figura anterior, se evidencia que si existe inhibición y un período de adaptación de las bacterias metanogénicas a la presencia de SCN^- , pues al comenzar la adición de este compuesto en la vinaza de alimentación (50 mg SCN^-/L) se presenta una reducción significativa de los valores de CH_4 obtenidos. Comportamiento similar se obtiene en el gráfico anteriormente referido y en el rendimiento (fig.); recuperándose los valores de estos parámetros en las sucesivas alimentaciones aún cuando se incrementan las concentraciones de este ión. Los valores de conversión de DQO en CH_4 (rendimiento Y) tienen su valor mínimo con la adición de 50 mg SCN^-/L y una recuperación muy buena aún a concentraciones de SCN^- de 500 mg/L, con valores muy cercanos al teórico ($Y=0.34$). En ambos gráficos existe evidencia de otra inhibición cuando es añadido a la vinaza el tiocianato en cantidades de 500 mg/L, pero esta nunca llega a ser tan significativa como con la primera exposición.

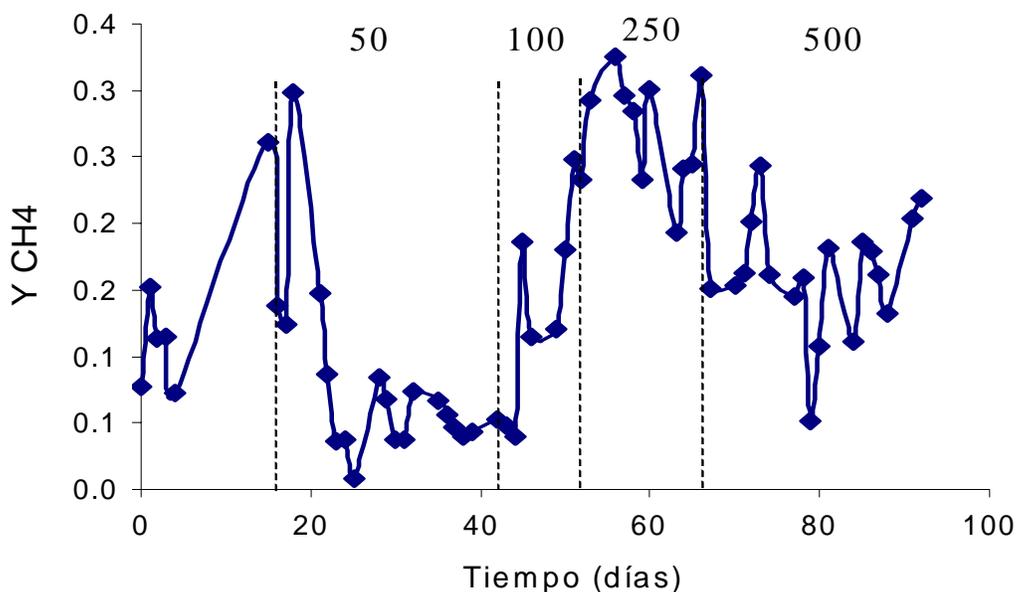


Figura : Valores de rendimiento obtenidos teniendo en cuenta el reactor metanogénico

En trabajos anteriores se demostró que el tiocianato no tenía efectos adversos ni sobre la producción de gas, ni utilización de AGV, ni producción de metano; sino que el efecto inhibitorio estaba dado por el cianato producido durante la hidrólisis de este compuesto y que con incubaciones repetidas en presencia de este, ambos parámetros (producción de biogas y producción de metano) se recuperaban (Hung y Pavlostathis, 1998).

Teniendo en cuenta los valores de producción de metano, rendimiento y % de metano en el biogas (figura), en el reactor metanogénico, podemos suponer que en las primeras exposiciones de la biomasa al SCN^- existe una inhibición la cual puede deberse a la afectación de algunas de las poblaciones microbianas y sus rutas metabólicas previas a

la metanogénesis por alguno de los intermediarios de la hidrólisis del tiocianato; y no necesariamente a la afectación de la población metanogénica. Recordemos que la fermentación de compuestos orgánicos complejos a CH_4 y CO_2 requiere de una mezcla de especies bacterianas, las cuales dependen unas de otras para su crecimiento y metabolismo. Por lo que la afectación de algunas de ellas, en última instancia se reflejará en la producción de metano. Sin embargo a partir de la adición de $250 \text{ mgSCN}^-/\text{L}$ decrementa el % de CH_4 en el biogas hasta valores de alrededor de un 50 %, aún cuando se alcanzan los mayores flujos (Q) y rendimientos (Y) (ver figuras) lo que en cierta forma nos indica que pueden estarse incrementando la actividad de otros grupos microbianos como pueden ser las sulfatorreductoras, las hidrolíticas, etc; pues aparejados a estos se detectaron valores de hasta 45 % de CO_2 en análisis cromatográficos realizados al biogas. Remitiendo a las rutas de degradación del tiocianato mostrada en la parte de Revisión Bibliográfica, la hidrólisis de tiocianato vía la formación de NH_4^+ y CO_2 , la cual ha sido detectada tanto en condiciones aerobias como anaerobias, produce como intermediarios H_2S el cual según los valores de pH y la presión se encontrará en forma disuelta y gaseosa. Este constituye otro compuesto que puede contribuir al empobrecimiento de la calidad del biogas, aún cuando no disminuyan los valores de producción de metano y que a la larga puede constituirse en un compuesto inhibitorio para el proceso. Recordemos además que estamos trabajando con residuales con concentraciones apreciables de SO_4^{2-} , por lo que la formación de H_2S puede verse favorecida por el incremento de la actividad de las bacterias sulfatorreductoras. Aunque no se cuantificó el H_2S se evidenció su presencia por el ennegrecimiento del filtro de limaduras de hierro puesto a la salida del biogas.

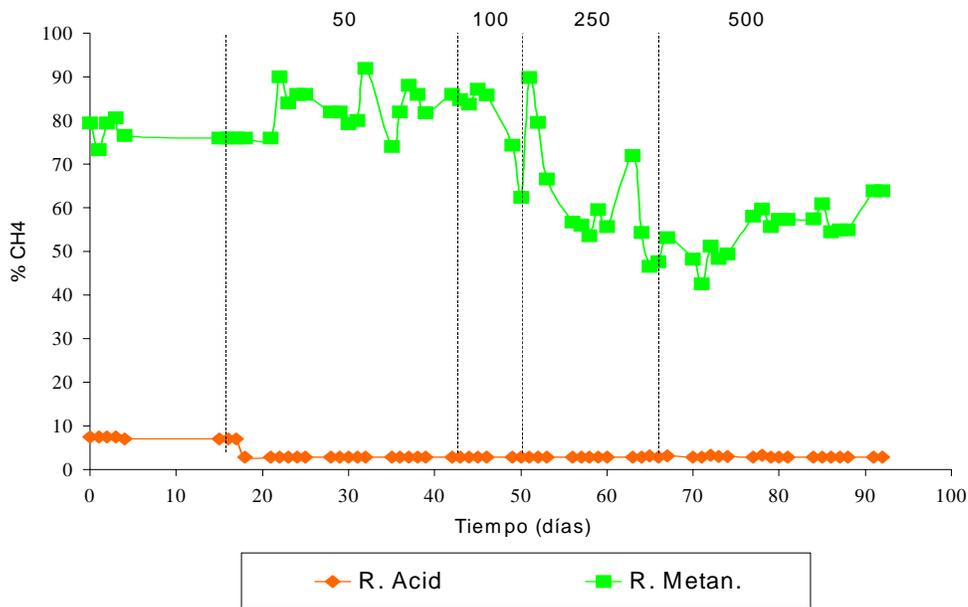


Figura : Composición en metano del biogas producido en ambos reactores

Valorando el funcionamiento del reactor acidogénico se aprecia que existen incrementos en la producción de AGV en este reactor al comienzo de la adición de tiocianato. Luego

disminuye hasta valores similares a los que presentaba al comienzo de la experiencia y ya con concentraciones de tiocianato de 250 mg /L se manifiesta una caída de estos que pueden ser indicio de cierta intoxicación de las bacterias acidogénicas pero cuyo efecto no se hace prolongado. El reactor acidogénico es el que recibe de forma más directa la acción del tiocianato o de algunos de sus intermediarios, por ser la primera fase del proceso..

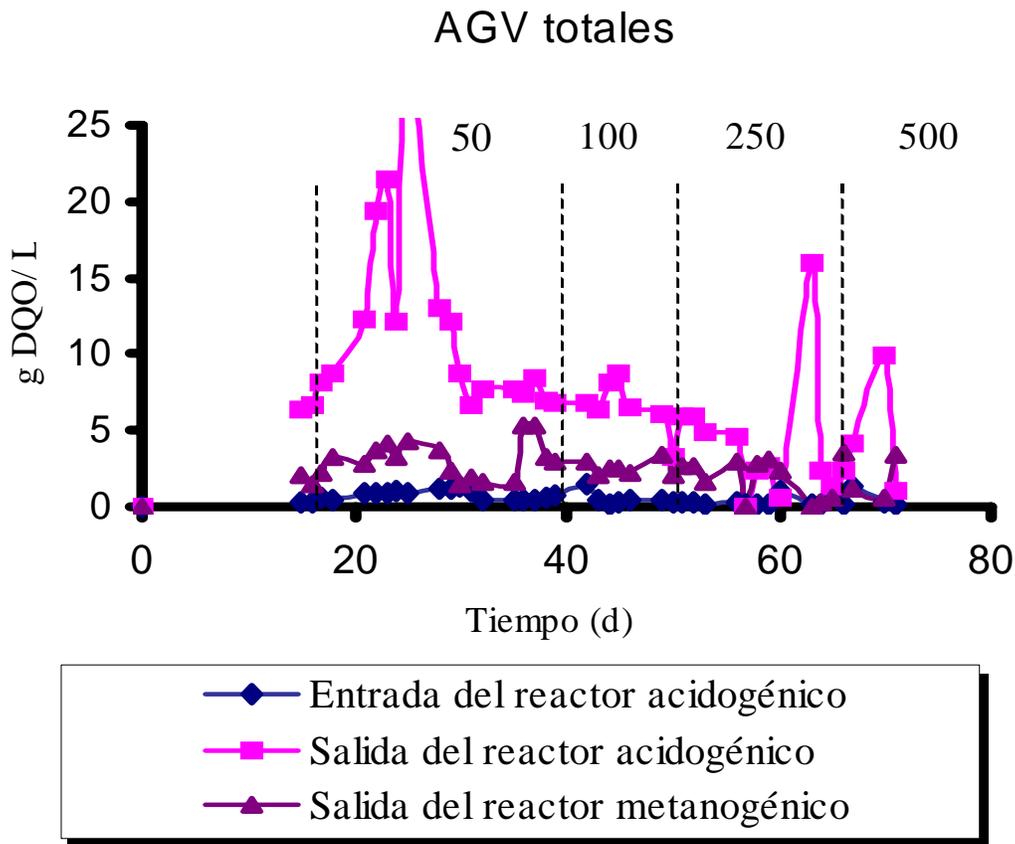


Figura : Comportamiento de la producción de AGV en los diferentes reactores

El grado de acidificación está definido por el contenido de AGVs producidos a partir de una DQO de entrada. A pesar de las aparentes ventajas de la pre-acidificación, la completa acidificación puede ser detrimento para la producción de biomasa granular (Alex y Anderson, 1994). Se recomienda que no exista una acidificación completa del sustrato de entrada, sino que este alcance valores de alrededor del 20 % de la acidificación de la DQO del sustrato. En nuestro caso sólo se logran valores entre 6 – 10 % de conversión, los que consideramos apropiados teniendo en cuenta los valores de DQO del influente.

Los AGVs formados son fundamentalmente ácido butírico, propiónico y acético, en ese orden. El ácido butírico constituye casi el 80 % de los AGV formados en el reactor acidogénico (figura) lo cual no constituye un problema pues este es rápidamente convertido a acetato por β - oxidación.

El tratamiento de vinaza generalmente se caracteriza por incrementos en la producción de propiónico, ácido que constituye un paso limitante en la conversión de metano en residuales con compuestos fácilmente fermentables; por tener efecto inhibitorio para los organismos productores de AGV, así como los responsables de su descomposición. En nuestro reactor la concentración de este ácido se mantiene generalmente por debajo de 3000 mg/L lo que se ha demostrado no tener efecto inhibitorio. La presencia de gran cantidad de ácido butírico puede estar dada por los valores de TRH que se está trabajando (3 días). Los tiempos de retención con los que se trabajan, así como los valores de pH determinan en gran medida la composición de ácidos que son sintetizados.

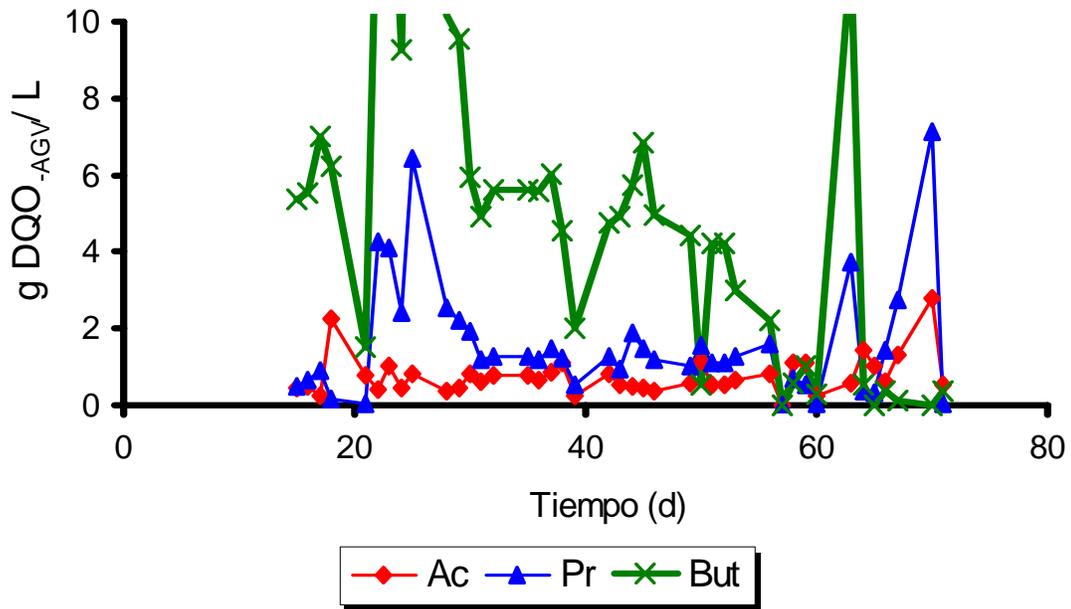


Figura : Composición y evolución de AGV en el reactor acidogénico

No existe acumulación en el reactor metanogénico de los AGV sintetizados en el reactor acidogénico si comparamos los valores de los diferentes ácidos y sus concentraciones en los dos reactores (figuras) y de forma global en el sistema. Por lo que se puede decir que la presencia de tiocianato no influye en la utilización de los ácidos grasos volátiles. En la salida del reactor metanogénico (figura) hay un agotamiento de los diferentes ácidos presentes, pero además no hay predominancia de ninguno de ellos; demostrando que la degradación del ácido propiónico no constituye un problema para las bacterias que conforman los gránulos.

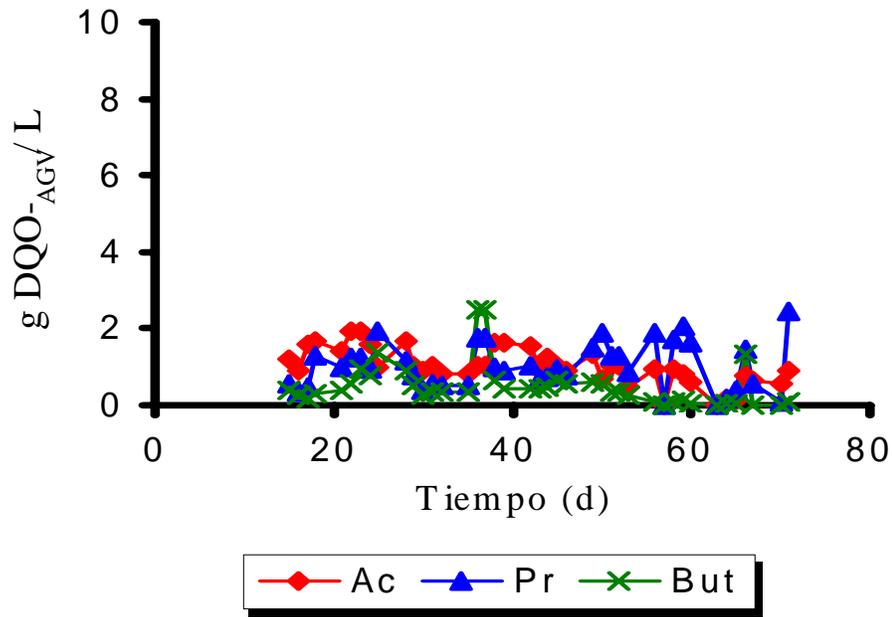


Figura : Evolución de los AGV en el reactor metanogénico

La figura muestra los valores de pH para ambos reactores y la figura los de alcalinidad para el reactor metanogénico.

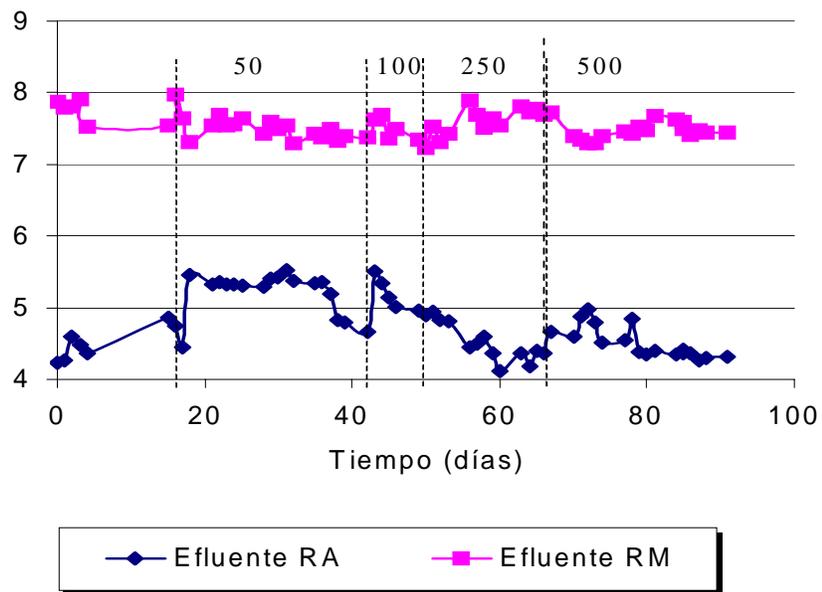


Figura : Comportamiento del pH en ambos reactores

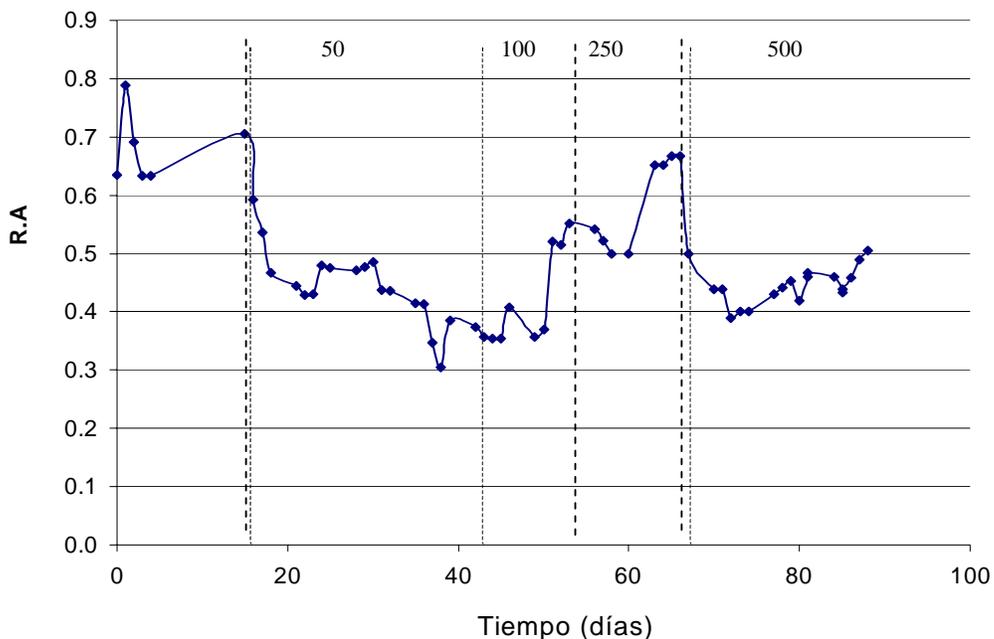


Figura : Comportamiento de la relación de alcalinidad en el reactor metanogénico

Se observa que tanto el reactor acidogénico como el metanogénico, se encuentran operando en valores apropiados de pH para cada fase: acidogénico, de 4 – 6; metanogénico, 7 – 8. Un pH de 4 – 6.5 ha sido reportado como óptimo para la formación de ácidos en la primera etapa de un proceso difásico; mientras que de 7 – 8, es óptimo para la fase subsecuente de producción de metano (Speece, 1996).

Con la adición de SCN^- se evidencia un incremento ligero del pH en el reactor acidogénico, lo que podría estar dado por la liberación de NH_4^+ durante el proceso de hidrólisis de cianato. Se ha demostrado que bajo condiciones anaerobias, la degradación de cianato sigue la ruta de formación de NH_4^+ e HCO_3^- , siendo el cianato un intermediario en la ruta de degradación del tiocianato (Hung y Pavlostathis, 1997).

La R.A en el reactor metanogénico tiene una caída drástica al comienzo de la alimentación de SCN^- , pero luego se recupera manteniéndose hasta valores entre 0.4 – 0.6. Por debajo de 0.4 se evidencian fallas inmediatas del sistema por acidificación. No obstante esta los valores en algunos momentos de la experimentación, en el umbral; los valores de pH se mantienen en valores adecuados, demostrando el mantenimiento de la capacidad buffer en los reactores. El hecho de que se mantenga la capacidad buffer del reactor puede estar influenciado por el efecto de la recirculación del efluente del reactor metanogénico.

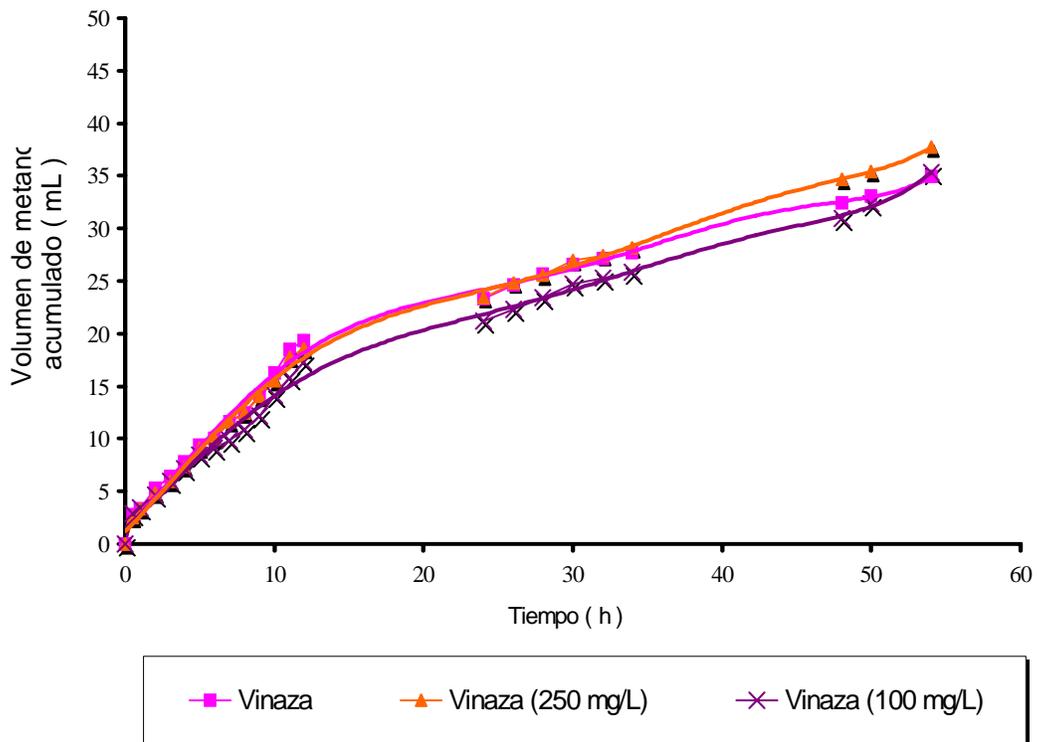
La recirculación del efluente en un reactor UASB se recomienda cuando se tienen aguas residuales con altas concentraciones y el objetivo es la dilución del nivel de DQO a valores por debajo de 15 g/L. Con la recirculación también se ha logrado la disminución de la toxicidad de ciertos compuestos, pues 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 consumo de reactivos alcalinos (Monroy, 1997).

3. Biodegradabilidad del tiocianato bajo condiciones anaerobias

Ensayos en lote

Se realizaron ensayos de actividad metanogénica cuyas cinéticas son mostradas en las figuras .En todos los casos se tomó el mayor valor de la pendiente para ladeterminación de la actividad meanogénica, tomando como referencia la vinaza sin adición de tiocianato.



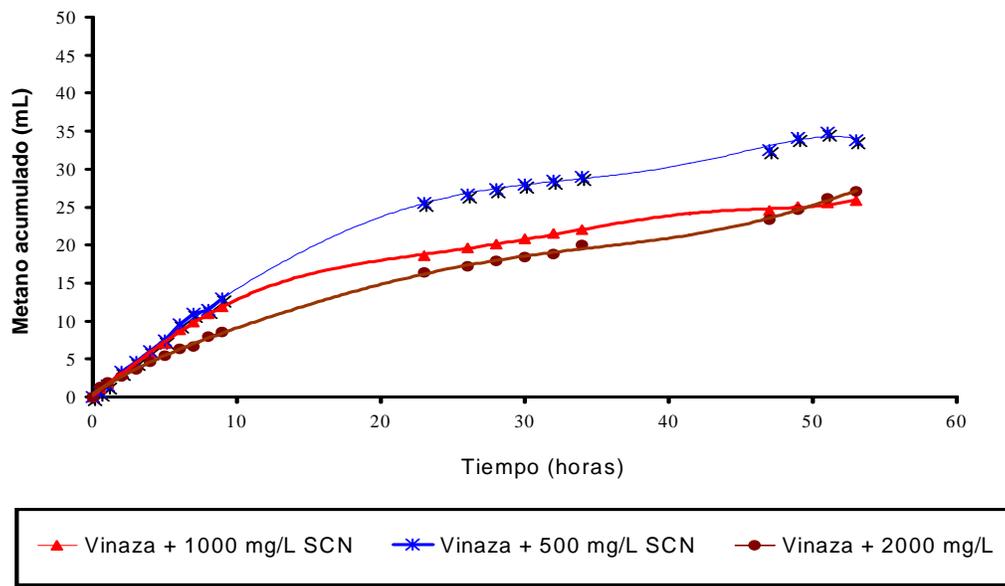


Figura : Influencia de diferentes concentraciones de tiocianato en la cinética de formación de metano

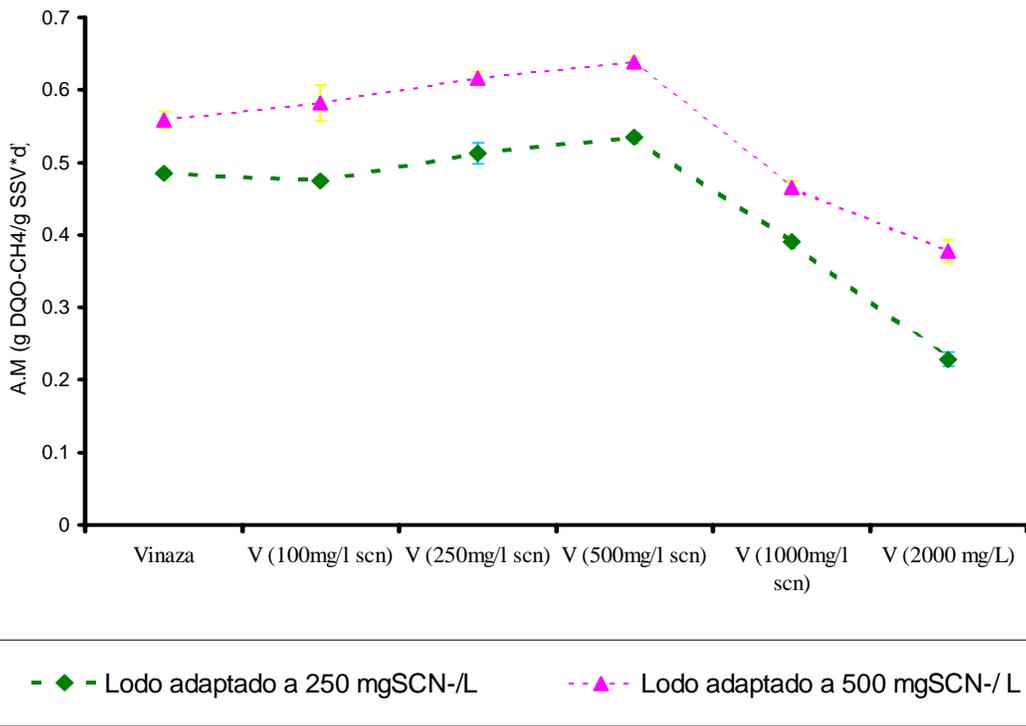


Figura : Influencia de la concentración de SCN⁻ sobre la actividad metanogénica

Al graficar el efecto de la adición creciente de SCN⁻ sobre la actividad metanogénica del lodo (figura) obtenidas de los cálculos cinéticos, se pone de manifiesto que las concentraciones por debajo de 500 mg SCN⁻/L son toleradas por el lodo sin presentar ninguna toxicidad. Por encima de ese valor es que comienza a exhibirse un patrón de inhibición caracterizados por la caída rápida de las actividades. Esto coincide con los resultados que se obtienen en los diferentes parámetros que involucran la medición de metano, en la operación del reactor continuo.

Aunque existe adaptación del lodo granular al SCN⁻ expresado en los incrementos de las actividades cuando se trabaja con lodos adaptados a diferentes concentraciones, a partir de 500 mg SCN⁻/L es evidente la toxicidad para el lodo. La no presencia de efecto inhibitorio en el ensayo en lote, por debajo de 500 mg SCN⁻/L, nos hace pensar que la inhibición que se presenta en el reactor continuo al inicio de la alimentación se debe fundamentalmente a que no existía una flora microbiana capaz de degradar tiocianato y/o sus intermediarios. En trabajos anteriores se ha valorado la importancia de aclimatar la flora microbiana del reactor con repetidas alimentaciones para poder tener remociones de tiocianato (Hung y Pavlostathis, 1997).

Si analizamos las ecuaciones estequiométricas y los cálculos de energía libre usando los datos termodinámicos reportados por Brock y Madigan (1991) y Weast y Astle (1981) mostrados en la tabla , se evidencia que la degradación de tiocianato tanto en condiciones aerobias como anaerobias son termodinámicamente posibles, incluso siendo en condiciones anaerobias mas favorecidas desde el punto de vista de sus valores de energía libre.

Tabla : Cálculos termodinámicos para las reacciones de degradación del tiocianato

Ecuación	ΔG^{0f}	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> Aerobia $0.125 \text{ NH}_4\text{SCN} + 0.875 \text{ H}_2\text{O} = 0.25 \text{ NH}_4^+ + 0.125 \text{ SO}_4^{2-} + \text{HCO}_3^- + 1.125 \text{ H}^+ + \text{e}^-$	- 25.87 KJ	Weast y Astle (1981) Brock <i>et al.</i> , (1994)
<ul style="list-style-type: none"> Anaerobia $\text{NH}_4\text{SCN} + 4\text{H}_2 = \text{HS}^- + \text{NH}_4^+ + \text{CH}_4$ <p>(Se asume que el H₂ es el donador de electrones)</p>	- 176.6 KJ	Weast y Astle (1981) Brock y Madigan (1991)

En nuestro trabajo se obtuvieron remociones tanto en los sistemas en lote como en el reactor continuo (figura) en condiciones metanogénicas, discrepando con los resultados obtenidos por Hung y Pavlostathis (1998) que obtuvieron que el SCN⁻ permanecía estable en un medio fuertemente reducido y a pH alrededor de la neutralidad. Sin embargo hay que señalar que posiblemente parte de la hidrólisis de este compuesto ocurra primariamente por vía química, favoreciendo de esta forma la subsecuente formación de cianato y su degradación posterior, paso este que si se ha reportado su ocurrencia en condiciones metanogénicas.

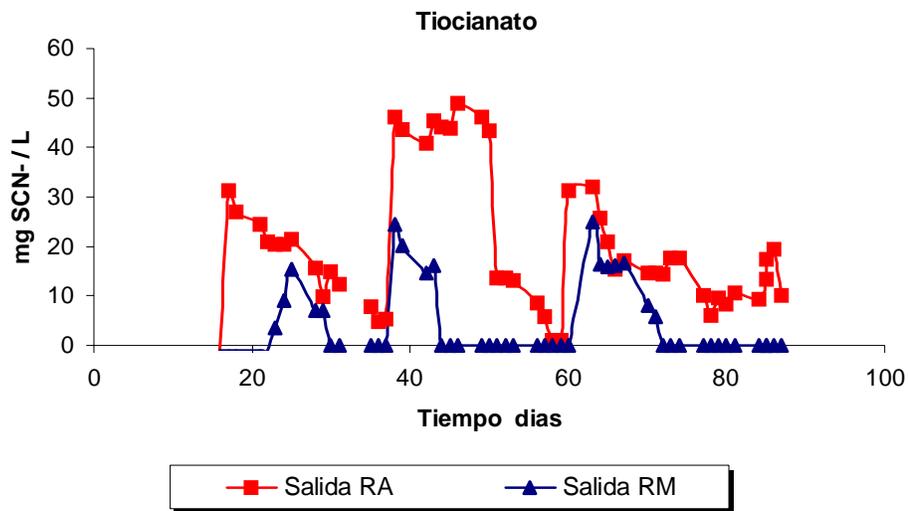


Figura : Degradación de tiocianato en el los reactores en continuo.

Se conoce que el tiocianato es estable a pH 7 tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, pero también se ha reportado que este ión es inestable en solución mineral a pH 4 donde la hidrólisis puede ocurrir o en caso de que se encuentre en concentraciones elevadas, puede polimerizarse (Hughes, 1975). El pH del funcionamiento del reactor acidogénico está entre 4 y 5, favoreciendo que se lleve a cabo este proceso. El cianato es inestable tanto a pH alrededor del neutro como a 4 y su hidrólisis provoca el aumento gradual del pH.

Estas suposiciones fueron corroboradas con los ensayos en condiciones abióticas, cuyas gráficas son mostradas a continuación.

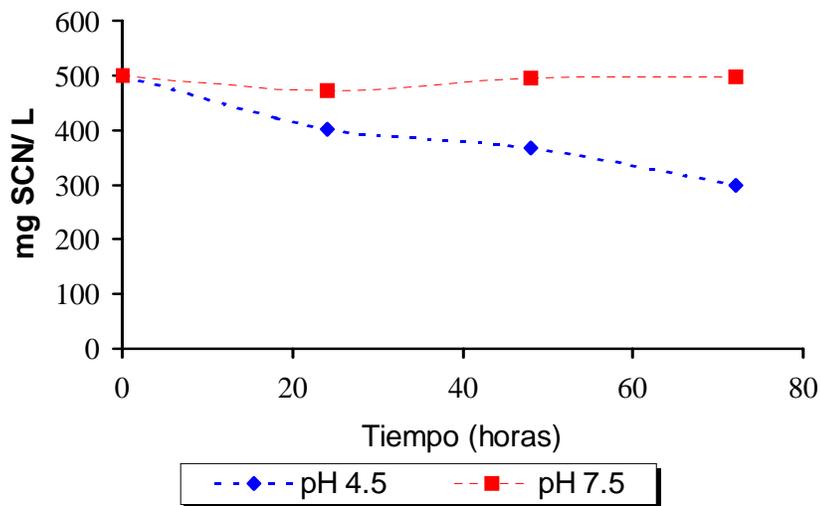


Figura : Comportamiento del SCN⁻ en condiciones abióticas

El tiocianato se mantiene estable bajo condiciones cercanas a la neutralidad y la poca disminución que experimenta puede deberse a fenómenos de adsorción, teniendo en cuenta la capacidad de este ión de unirse a proteínas.

El hecho de que en el reactor metanogénico ocurra hidrólisis del SCN^- aún con valores alrededor de la neutralidad, permite plantear que esta se lleva a cabo mediada por microorganismos. Hung y Pavlostathis plantean que aún cuando en su estudios de degradación de tiocianato en condiciones metanogénicas, este se mantiene estable, puede estar dado por el hecho de carecer de un apropiado sistema enzimático (carencia de una enzima específica o de un microorganismo específico) capaz de mediar tales reacciones. La degradación de tiocianato bajo condiciones anaerobias (denitrificación) ha sido reportada en otros trabajos (Andreoni *et al.*, 1988).

En el sistema en continuo se evidencia degradación del tiocianato tanto en el reactor acidogénico, como en el metanogénico; llegando a valores en el efluente por debajo de 25 mg SCN^-/L .

Aunque no está claro que compuesto de los presentes en la vinaza tiene efectos beneficiosos sobre el crecimiento de microorganismos degradadores de tiocianato, es evidente que la presencia de sustratos orgánicos no suprime la utilización de este ión.

CONCLUSIONES

1. Se evidencia lo acertado de la selección de un sistema difásico y la recirculación en el reactor metanogénico, para la degradación de SCN^- y tratamiento de la vinaza.
2. La presencia de SCN^- no tiene efectos adversos sobre la degradación de sustancias orgánicas por una población heterótrofa.
3. La remoción de DQO por organismos heterotróficos y la degradación de SCN^- ocurre concomitantemente en el reactor continuo.
4. Existe un proceso de aclimatación del lodo granular a la presencia de SCN^- y posiblemente la selección de una microflora degradadora de este compuesto.
5. En sistema en lote se evidencia aclimatación del lodo, pero también un efecto inhibitorio del SCN^- a concentraciones a partir de 500 mg/L .
6. La degradación de SCN^- en la D.A.D.E pudo estar influenciado tanto por la hidrólisis como por el desarrollo de un sistema enzimático apropiado.
7. No se evidencian cambios morfológicos en el gránulo por la exposición al tiocianato.

SUGERENCIAS

- Estudiar la influencia del tiocianato sobre las diferentes poblaciones que intervienen en la digestión anaerobia.
- Estudiar la degradación del tiocianato en sistemas continuos pero utilizando medio sintético y a los valores de pH característicos de un reactor acidogénico y uno metanogénico (pH \approx 4 y 7).
- Estudiar la influencia del tiocianato sobre la actividad sulfatorreductoras y viceversa.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, P.M. (1980). Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochemistry* 19: 2882-2888., Institute of Technology
- APHA-AWWA-WPCF (1985). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th edition.
- Banerjee, G.(1996). Phenol-and-thiocyanate-based wastewater treatment in RBC reactor. *Journal of Environm. Eng.* 122 :941-948.
- Beekhuis, H.A.(1975). Technology and industrial application. In: Newmann A.A (e d) *Chemistry and Biochemistry of Thiocyanic Acid and its derivates*. Academic Press. London: 222-255. Fate and transformst
- Betts, P.; Rinder, D.; Fleeker, J. (1979). Thiocyanate utilization by an *Arthrobacter*. *Can. J. Microbiol.* 25: 1277-1282.
- Bhatti, Z.; Furakawa, K.: Fujita, M. (1995). Methanogenic granular sludge formation in an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating synthetic methanolic waste. *W. J. Microb. Biotechnol.* 11: 631-637.
- Bonet, R.: Simon, M.; Congregado, F. (1993). Effects of nutrients on exopolysaccharide production and surface properties of *Aeromonas salmonicida*. *Appl. And Environ. Microbiol.* 59: 2437-2441.
- Bonilla, M. (1999). Aislamiento y caracterización de bacterias que utilizan tiosulfato. Tesis para obtener el grado de Máster en Biotecnología, UAM, México D.F.
- Cedeño, C. M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (1): 1-11.
- Craveiro, A.; Soares, H.; Schmidell, W. (1986). Technical aspects and cost estimations for anaerobic systems treating vinasse and brewery/soft drink wastewaters. *Wat. Sci. Tech.*, 18, 12: 123-134.
- Chapatawala, K.D; Babu, G.R.; Vijaya, O.K.; Kumar, K.P, Wolfram, J.H. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanatos and thiocyanates to NH_4^+ and CO_2 by immobilized cells of *Pseudomonas putida* . *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1): 28-33.
- Driessen, W.; Tielbard, M.; Vereijken, T. (1994). Experience on anaerobic treatment of distillery effluent with the UASB process. *In Oral Papers Preprints, VII International Symposium on Anaerobic Digestion, 23-27 January, Cape Town R.S.A: 253-262.*
- Eckenfelder, W.: Patoscka, J.; Pulliman, G. (1988). Anaerobic vs aerobic treatment in the USA. *In Anaerobic Digestion 1988,, Hall E. R. and Hobson P.N., editors, Pergamon Press:105-114.*
- Espinosa,A.; Rosas, L.; Ilangovan, K.; Noyola, A.(1995). Effects of trace metals on the anaerobic degradation of volatile fatty acids in molasse stillage. *Wat. Sci. Technol.* 32 (12): 121-129.
- Guiot, S.; Pass, A.; Costerton, J. (1992). A structured model of the anaerobic granule consortium. *Wat. Sci. Technol.*, 25: 1-10.
- Happold, F.; Johnstone, K.; Rogers, H.; Youatt, J. (1954). The isolation and characteristics of an organism oxidizing thiocyanate. *J. Gen. Microbiol.* 10: 261-266.

- Hung, Ch. (1995). Fate of thiocyanate in biological treatment processes. MS. Thesis, Georgia Institute of Technology, Atlanta.
- Hung, Ch.; Pavlostathis, S. (1998). Fate and transformation of thiocyanate and cyanate under methanogenic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 112-116.
- Hung, Ch.; Pavlostathis, S. (1999). Kinetics and Modeling of Autotrophic Thiocyanate Biodegradation. *Biotechn. And Bioeng.* Vol. 62 No. 1, pp 1-11.
- Hung, Ch.; Pavlostathis, S. (1997). Aerobic biodegradation of thiocyanate. *Wat. Res.* 31: 2761-2770.
- Hung, Ch.; Pavlostathis, S. (1998). Fate and transformation of thiocyanate and cyanate under methanogenic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 112-116.
- Ilangovan, K.; Noyola, A. (1993). Availability of micronutrients during anaerobic digestion of molasses stillage using an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Environ. Technol.* 14: 795-799.
- Katayama, Y.; Kuraishi, H. (1978). Characteristics of *Thiobacillus thioparus* and its thiocyanate assimilation. *Can. J. Microbiol.* 24: 804-810.
- Landreth, R. (1989). The use of cultured bacteria in a full scale biological system treating coke plant wastewater. *Water Sci. Technol.* 21: 1829-1832.
- Lettinga, G., Van Velsen, A.; Hobman, S.; Zeeuw, W.; Klawijk, A. (1980). Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment specially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, pp. 699-734.
- Monroy, O.; Gutiérrez, M.; Revah, S.; Gómez, J. (1997). Biotecnología Ambiental. Curso Pre-Congreso, II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Mazatlán, México.
- Montalvo, S. (1983). Utilización de residuales líquidos como biofertilizantes. Conferencias impartidas en el CNIC, C. Habana.
- Neufeld, R.; Valiknac, T. (1979). Inhibition of phenol biodegradation by thiocyanate. *J. Water Pollution Contr. Fed.* 51: 2283-2291.
- Noyola, A. (1990). Tratamiento anaerobio de aguas residuales: una experiencia de adaptación de tecnologías en México. En *Tratamiento anaerobio de aguas residuales en América Latina*, Instituto de Ingeniería, Unam-México: 337-57.
- Noyola, A. (1996). Tratamiento de aguas residuales de destilería. IV Seminario-Taller Latinoamericano sobre Tratamiento de Aguas Residuales. 19-22 Nov., Bucaramanga, Colombia.
- Noyola, R.A. (1995). Treatment of Distillery Wastewaters. Proceedings of the Third International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries. México, 4-6 October.
- Palms, S.; Lowenthal, R.; Wentzel, M.; Marais, G. (1990). Growth of Biopellets on Glucose in Upflow Anaerobic Sludge Bed (UASB) Systems. *Water SA* 16:151-164.
- Parkin, G. F.; Speece, R.E. (1983). Attached vs Suspended growth Anaerobic Reactors: Response to Toxic Substances, *Wat. Sci. Technol.* 15: 261-289.
- Paruchuri, Y.; Shivarama, N.; Kumaran, P. (1990). Microbial transformation of thiocyanate. *Environm. Pollut.* 68: 15-28.
- Ramos, J.; Obaya, M.C.; Valdés, E. (1992). Selección de una microflora acidogénica para un proceso difásico de digestión anaerobia. *Rev. ICIDCA*, XXVI (2).

- Schmidt, J.; Ahring, B. (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 42 : 457-462.
- Sheehan G.; Greenfield, P. (1980). Utilisation, treatment and disposal of distillery wastewater. *Wat. Res.*, 14: 257-277.
- Sheenan G.; Greenfield, P. (1980). Utilisation, treatment and disposal of distillery wastewater. *Wat. Res.*, 14: 257-277.
- Soto, M.; Méndez, R.; Lema, J. (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. *Wat. Res.* Vol.27 No.8, pp 1361-1376.
- Soto, M.; Méndez, R.; Lema, J. (1992). Determinación de toxicidad y biodegradabilidad anaerobia de aguas residuales. *Tecnología del agua* 92: 70-80.
- Speece, R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press, Tennessee, 394 pages.
- Stafford, D.; Callely, A. (1969). The utilization of thiocyanate by heterotrophic bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 55: 285-289.
- Stratford, J.; Dias, A.E; Knowles C.J. (1994). The utilization of thiocyanate as a nitrogen source by heterotrophic bacterium: the degradative pathway involves formation of ammonia and tetrathionate. *Microbiology* 140: 2657-62.
- Valdés, M.E.; Ramos, J.; Obaya, M. (1992). Definición de parámetros para el tratamiento de vinazas de destilería. *Rev. ICIDCA* 26 (1):23-27.
- Valdés, W.; Rodríguez, S.; Pérez, R; Bermúdez, C. (1998). Choice of an appropriate inoculum to anaerobic digestion of vinasse. V Taller y Seminario Latinoamericano de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Valparaíso, Chile.
- Wheatley, A.; Johnson, K; Winstanley, C. (1990). The Reliability of Anaerobic Digestion for the Treatment of Food Processing Effluents. *Anaerobic Digestion, IAWPRC* :135-146.
- Wood, A.P.; Kelly, D.P.; Mc Donald, I.R.; Jordan, S.L.; Morgan, T.D.; Khan, S.; Wood, A.P.; Kelly, D.P.; McDonald, I.R.; Jordan, S. L; Morgan, T.D; Khan, S.; Murrell, J.C; Borodina, E. (1998). A novel pink-pigmented facultative methylotrophic *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov. , capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Arch. Microbiol.* 162 (2): 148-158.
- Wood, J.L. (1975). Biochemistry. In: Newman AA (e d) *Chemistry and Biochemistry of Thiocyanic Acid and its derivatives*. Academic Press. London: 156-221.

Anexo I

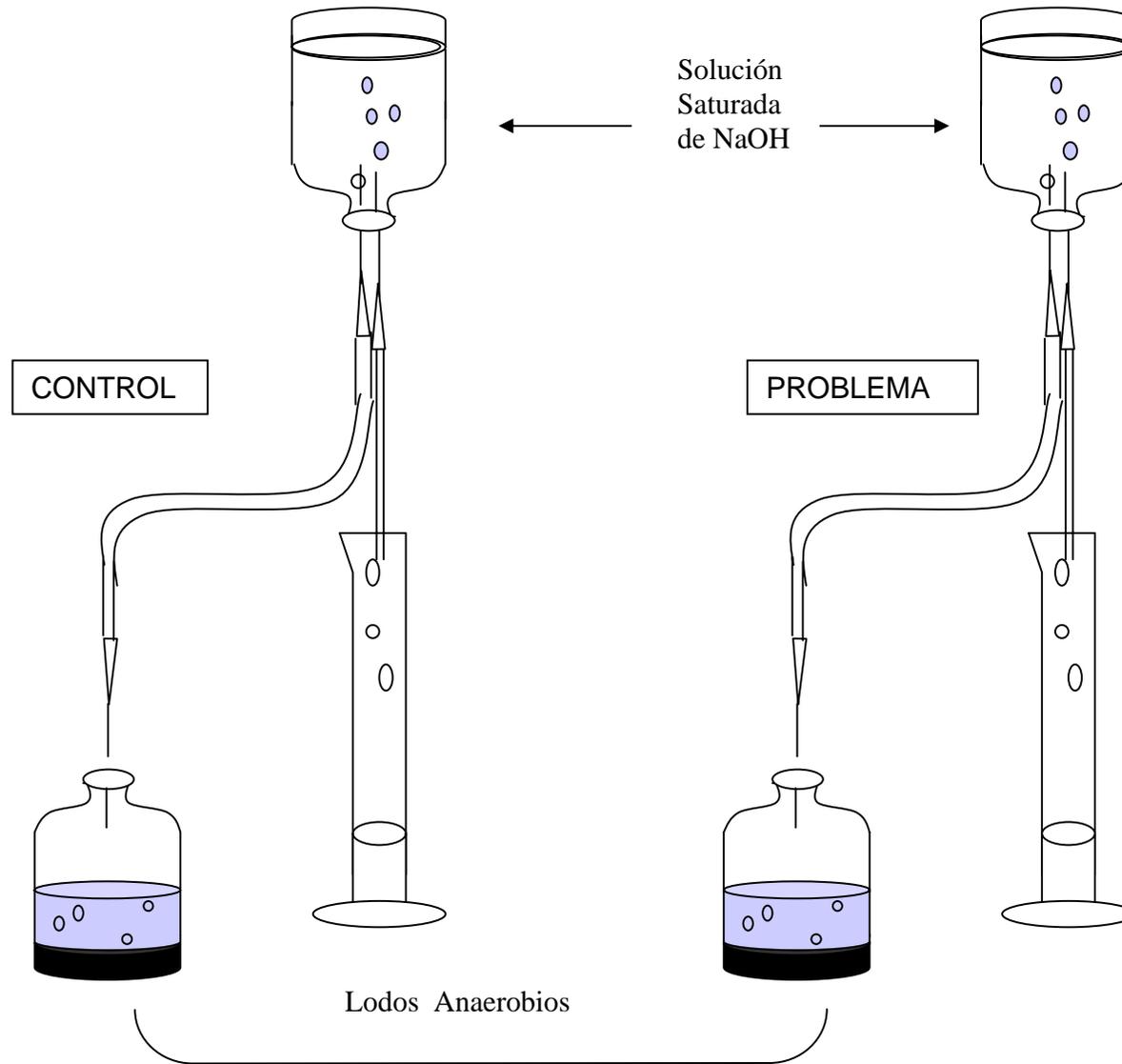
Tabla : Caracterización de diversos tipos de vinaza

Parámetro	Materia Prima			
	Melaza de Caña ⁽¹⁾	Agave ⁽⁴⁾	Uva ⁽¹⁾	Jugo de Caña ^(2,3)
pH	4.2	3.7		4.1
3.5				
Temperatura (°C)	94	90		-
-				
Sólidos Totales	78.5	45.8		62
21.1				
Sólidos Volátiles	58.9	30.3		29.5
15.6				
Sólidos suspendidos	5.1	4.7		0.55
1.5				
Sólidos disueltos	56.9	41.1		22
-				
Sólidos fijos (cenizas)	28.9	15.5		-
-				
AGV (como acético)	2.18	2.7		0.75
1.8				
Azúcares reductores	26.50	-		-
-				
Grasas y aceites	-	-		-
-				
Nitrógeno Total	1.78	-		0.69
0.4				
Nitrógeno orgánico	1.94	-		-

Nota: Todos los valores están en g/L, excepto pH y temperatura

(1) Sheenan y greenfield (1980), (2) Driesse *et al.*, (1994), (3) Craveiro *et al.* (1986), (4) Noyola (1996)

VI. Esquema del arreglo experimental para las pruebas de biodegradabilidad.



III. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno

Se prepararon las soluciones A y B con el siguiente procedimiento:

- A. Solución digestora: 50 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) se secaron durante dos horas a $103^{\circ}C$, la sal se enfrió en un desecador y se disolvió en 500 mL de agua destilada en un matraz aforado de un litro, se adicionaron 33,33 g de sulfato de mercurio ($HgSO_4$). En un baño de hielo se adicionaron 167 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro y se afora a 1L.
- B. Solución de ácido sulfúrico con sulfato de plata: 5.8 g de Ag_2SO_4 se disolvieron en 300 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro, en un matraz aforado de un litro para posteriormente aforar con H_2SO_4 .

Procedimiento: En un tubo HACH con tapa de rosca se tomaron dos mililitros de muestra a analizar, se añadió 1 mL de solución digestora y lentamente 2 mL de la solución de ácido sulfúrico con sulfato de plata. El tubo se tapó perfectamente y se colocó en una parrilla para la digestión a $150^{\circ}C$ durante dos horas. Pasado este tiempo, se dejó enfriar y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 620 nm.

IV. Determinación de Ácidos Grasos Volátiles

Preparación de la solución del estándar interno: Se usa el ácido isovalérico como estándar interno a 60 mM. Se hace una solución de HCl 50 % más el estándar interno (Solución acidulada).

Preparación de las soluciones estándares y las muestras:

Concentraciones (mM)	1	5	M
Sol. Madre 100 mM (μL)	10	50	-
HCl 50 % + Est. Interno (μL)	50	50	50
H_2O (μL)	940	900	950

Preparación de las muestras

Volumen de muestra: 950 μL (centrifugado y filtrado)

Mezcla de HCl 50 % + estándar interno: 50 μL

Nota: estos volúmenes necesitan la mayor precisión

V. Determinación de Sulfatos (SO_4^{2-})

Preparación del estándar: Pipetear 100 μL de un estándar concentrado (4000 ppm) en un volumétrico y diluir con agua desionizada para obtener el estándar de trabajo. Preparar fresco cada semana.

Preparación del electrolito:

1. *Electrolito concentrado:* En un volumétrico de 1 L , adicionar hasta la mitad de agua y añadir 23.41 g de Na_2CrO_4 tetrahidratado (grado analítico y no hacer sustituciones). Sin ajustar pH. Luego adicionar 68 mL de H_2SO_4 de 10 mM (preparar las soluciones con agua desionizada). Aforar hasta 1 L.
 - Almacenar en un recipiente de vidrio por un año. Por cada litro de concentrado se pueden obtener 20 litros del electrolito de trabajo
2. *Electrolito de trabajo:* Para preparar este se añade en un volumétrico de 100 mL, 1.5 mL de Solución acuosa CIA-Pak OFM Anion-BT (modificador de flujo osmótico) y se enjuaga la pipeta dos veces con agua desionizada echando el agua de enjuage en el volumétrico. Adicionar 4 mL del electrolito concentrado y adicionar 1 mL de una solución de tungstato de sodio. Aforar con agua desionizada, mezclar y filtrar la solución con una membrana de 0.45 μm . Esto resulta en un electrolito de cromato de pH 8. Preparar electrolito fresco cada vez que se vayan a analizar muestras.