

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL LODO EN REACTORES ANAERÓBICOS POR CARGA

Alejandro Escorihuela, Magaly Chávez, Zulexi Rangel,
Daimarys Martínez, Altamira Díaz, Nancy Rincón, Elisabeth
Behling, Julio Marín, Elsa Chacín y Nola Fernández

Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Escuela de Ingeniería Civil,
Facultad de Ingeniería, La Universidad del Zulia, Apartado 526.
Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela. E-mail: nfernan@luz.ve

Resumen. En el proceso de degradación anaeróbica de la materia orgánica la biodiversidad es muy compleja, tanto, que se han reportado más de 130 especies en un digestor anaerobio, debido a esto es de interés establecer la identidad de los grupos fisiológicos presentes en el lodo utilizado en reactores anaeróbicos. En la presente investigación, se usaron cargas de 2 y 3 kgDQO/m³d de glucosa. Los parámetros físicoquímicos medidos fueron pH, DQO, temperatura, alcalinidad total, sólidos suspendidos volátiles, % de metano y volumen de biogás. Se utilizó la metodología convencional para el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias. Los grupos fisiológicos encontrados en el lodo anaeróbico estudiado fueron: Bacterias fermentadoras de glucosa (BFG), Bacterias nitrato reductoras (BNR), Bacterias sulfato reductoras (BSR) y Bacterias metanogénicas (BM). Los resultados fueron homogéneos a lo largo del proceso de degradación anaeróbica mostrando que las variaciones de los parámetros fisicoquímicos inherentes al mantenimiento del reactor anaeróbico mesofílico, no influyeron en la biodiversidad encontrada. *Recibido:* 07 Marzo 2001, *Aceptado:* 22 Septiembre 2001

Palabras clave: bacteria, biodiversidad, digestión anaeróbica, fisiología, lodo anaeróbico, reactor por carga.

CHARACTERIZATION OF BACTERIAS OF SLUDGE IN ANAEROBIC BATCH REACTORS

Abstract. The anaerobic process of degradation has been subdivided in stages or phases. However, the biodiversity is so complex that more than 130 species have been reported. Because of this it is important to establish the physiological groups present in anaerobic sludge during anaerobic degradation in a batch bioreactor. The methodology was the conventional one used for isolation and identification of anaerobic bacteria. The organic loads applied were 2 and 3 kgCOD/m³d kilograms of glucose. The parameters analyzed were: pH, COD, temperature, alkalinity, volatiles solids in suspension, biogas production and methane percentage. The physiologic groups found were glucose ferment bacteria, nitrate reducing bacteria, sulfate reducing bacteria and methanogenic bacteria. The results were homogeneous all along the degradation process and showed that the physical-chemical parameters did not influence in the biodiversity found. *Received:* 07 March 2001, *accepted:* 22 September 2001.

Key words: bacteria, biodiversity, anaerobic digestion, physiology, anaerobic sludge, batch reactor.

INTRODUCCIÓN

Las operaciones municipales industriales y agrícolas han incrementado la contaminación de los recursos aire, agua y suelo, en los últimos años. Particularmente en las ciudades costeras se vierten las descargas residuales sin tratamiento, al cuerpo de agua de más fácil acceso. En América Latina esto ocurre en playas recreacionales y áreas adyacentes, alcanzando promedios geométricos de niveles de coliformes totales superiores a 100.000 NMP/100 mL (CEPIS 1999).

Se ha reportado que la digestión anaeróbica es una tecnología que puede tratar con éxito la fracción orgánica de esos residuos. Este tratamiento está convirtiéndose en un método clave para la reducción de desechos y recuperación de combustible renovable y otros coproductos de valor, tales como nutrientes, abono, etc. (CEPIS

1999, Moscoso y León 1994, McCarney 1991). Las investigaciones que se siguen a nivel mundial con el fin de optimizar el uso de digestores anaerobios para degradar desechos orgánicos a gran escala, han revelado la importancia de las interacciones metabólicas para entender la microbiología de la digestión anaeróbica (Lettinga 1995). El entendimiento fundamental de estas interacciones es importante para el mantenimiento de la eficiencia de los procesos anaeróbicos. En tal sentido, se deben realizar un mayor número de investigaciones encaminadas a la identificación de los grupos fisiológicos bacterianos presentes en estos sistemas, puesto que sus proporciones pueden alterar las condiciones fisicoquímicas del efluente.

El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar las bacterias presentes en un lodo granular anaeróbico, utilizando reactores batch y glucosa como única fuente de carbono, como un aporte a la interpretación de los fenómenos que ocurren durante la degradación anaerobia de la materia orgánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MONTAJE DEL REACTOR BATCH

Se utilizó un reactor por carga (batch) a escala de laboratorio, con un volumen vacío de 500 mL, conectado a un colector de gas de 275 mL para medir la producción de biogás por desplazamiento de agua y un tubo sumergido en el lodo para la toma de muestras (Chirinos *et al*, *comunicación personal* 1996).

Este reactor fue inoculado con una muestra de lodo de 100 mL proveniente de un reactor UASB de una planta de tratamiento de aguas residuales cerveceras de la región. Posteriormente, se inició el arranque del reactor batch con la fase de aclimatación para luego exponerlo a diferentes concentraciones de glucosa (2 y 3 kgDQO/m³d) progresivamente crecientes, con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 24 h y una temperatura de 37 ± 1°C.

ASLAMIENTO DE LAS BACTERIAS DEL LODO

El análisis bacteriológico del lodo se realizó durante las condiciones de estabilidad del reactor, mostradas por continuidad de las propiedades fisicoquímicos del efluente.

Para realizar el aislamiento de las bacterias no metanogénicas, se suspendió una pequeña muestra de lodo anaeróbico en un buffer fosfato elaborado según Ballows (1991), adicionando Tioglicolato de Sodio como agente reductor. Esta suspensión fue utilizada para inocular los distintos medios diferenciales ensayados.

Los grupos fisiológicos bacterianos estudiados y los medios de cultivos empleados, se describen a continuación:

Bacterias fermentadoras de glucosa: se aislaron utilizando el medio de cultivo descrito por Dowell *et al.* (1977) cuyos ingredientes principales son los siguientes: Glucosa 6%, Tryptona 15 g, extracto de levadura 7 g, L-cystina 0,25 g, Cloruro de Sodio 2,50 g, Acido Ascórbico 0,10, Tioglicolato de Sodio 0,50 g, Azul de Bromotimol 0,01 g, agar 0,75 g, agua destilada 900 mL, el medio produce un color amarillo como evidencia de un pH ácido de 6 o menor.

Bacterias nitrato reductoras: se utilizó el medio índole nitrite, compuesto por: Caseína 20 g, Fosfato Disódico 2 g, Dextrosa 1 g, agar 1 g, Nitrato de Potasio 1 g, agua destilada 1000 mL (Power y McCuen 1988).

Bacterias sulfato reductoras: se utilizó el medio H₂S compuesto principalmente por: Tripticasa 10 g, extracto de levadura 5 g, Acetato de Plomo 5 g, agar 2 g, D-glucosa 5g, agua destilada 1000 mL, una prueba se considera positiva al observar partículas oscuras como producto de la formación de Sulfuro de Plomo (Dowell *et al.* 1977, Ching y Shing 1994).

Bacterias metanogénicas: se aislaron utilizando el medio de cultivo descrito por Boone *et al.* (1989) cuyos ingredientes principales son los siguientes: extracto de levadura 2 g, Tripticasa peptona 2 g, Ácido Mercaptoetanol sulfónico 0,5 g, Sulfito de Sodio 0,25 g, Cloruro de Amonio 1 g, Resarzurina 1 mg y trazas metálicas.

Los medios de cultivo inoculados fueron incubados bajo condiciones anaeróbicas empleando una campana PLAS-LABS 855-AC. Posteriormente, se realizaron pruebas de tensión de Oxígeno y tinción de Gram a las colonias aisladas.

IDENTIFICACIÓN DE LOS GÉNEROS BACTERIANOS

La identificación de los géneros más frecuentes dentro del reactor anaeróbico, durante el proceso de degradación orgánica, se realizó usando un esquema fundamentado en los argumentos teóricos de Edward y Edwin (1972) y Luengo (1989).

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Durante el proceso de degradación anaeróbica, se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, demanda química de oxígeno (DQO), alcalinidad total, pH, sólidos suspendidos volátiles, volumen de biogás, producción de metano, empleando los métodos estándar (APHA, AWWA, WEF 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización del lodo granular anaerobio mostró la existencia de una ecología bacteriana muy extensa, donde los grupos fisiológicos no se encuentran en un mismo nivel, desde el punto de vista de los potenciales de óxido reducción. Esto sugiere un orden de sucesión, tal como lo expresan algunas investigaciones (Morgan, Comunicación personal 1991, Quarmby y Forster 1995), las cuales refieren modelos hipotéticos sobre una distribución bacteriana en capas sucesivas, que van desde una superficial (bacterias anaerobias facultativas) a las más profundas (bacterias anaerobias estrictas) (Bae y Lee 1999).

Los grupos fisiológicos bacterianos aislados en el lodo anaeróbico mesófilico fueron: fermentadoras de glucosa (BF), nitrato reductoras (BNR), sulfato reductoras (BSR) y metanogénicas (BM), los cuales, se relacionan con la producción y consumo de H₂ dentro de los reactores anaeróbicos. La actividad catabólica de las bacterias

fermentadoras es parcialmente dependiente de la remoción de hidrógeno por parte de bacterias acetógenas o metanógenas utilizadoras de H_2 . Si la concentración de hidrógeno molecular se incrementa, entonces la velocidad de fermentación decrece y la producción de acetato se reduce (Morgan, Comunicación personal 1991).

Las formas celulares frecuentemente observadas fueron bacilos y cocos, posiblemente debido al uso de glucosa como única fuente de carbono. Morgan (1990) reportó que los gránulos alimentados con glucosa exhiben una buena diversidad microbiana con especies filamentosas, bacilos y cocos, así mismo indicó que este es el tipo de ecología que puede ser esperado en un lodo bien aclimatado a diferencia de otras fuentes de carbono, tal es el caso del acetato con el cual se observa predominancia de especies filamentosas (Morgan 1990).

El efecto producido por la fermentación de la glucosa en el medio con azul de bromotimol sugerido por Dowell *et al.* (1977), permitió aislar e identificar bacterias capaces de producir ácidos grasos a partir de este sustrato, un 29% de las bacterias aisladas correspondieron a este grupo, tal como se observa en la Figura 1.

Así mismo, el medio de cultivo que contaba con nitrato como única fuente de nitrógeno, sugerido por Dowell *et al.* (1977), permitió evidenciar la presencia de bacterias nitrato reductoras en estos sistemas anaeróbicos (Figura 1). Puesto que el nitrógeno como nutriente es adicionado en estos reactores anaeróbicos como sales de amonio, el posible impacto inicial es la reducción desasimilativa del compuesto produciendo Nitrógeno y Óxido Nitroso, una vez consumidos los niveles de Amoniaco, la vía asimilativa es activada generando el crecimiento microbiano del grupo, tal afirmación es fundamentada bioquímicamente por Brock y Madigan (1991), quienes indicaron que en general, las nitrato reductasas asimilativas son proteínas solubles, las cuales son reprimidas por el Amoniaco, mientras que las nitratos reductasas desasimilativas son proteínas unidas a la membrana que son reprimidas por el Oxígeno y sintetizadas en condiciones anaerobias.

Con el medio de cultivo utilizado para la identificación de bacterias sulfato reductoras (Ching y Shing 1994) la formación de Sulfuro de Hierro mostró la presencia de bacterias capaces de producir Sulfuro de Hidrógeno usando Sulfato como último aceptor de electrones y Lactato de Sodio como fuente única de Carbono (Figura 1).

La autofluorescencia color verde azulado reveló un crecimiento de bacterias metanogénicas, usando como medio de cultivo el sugerido por Boone *et al.* (1989), la prueba definitiva la constituyó un análisis por cromatografía de gases del espacio gaseoso del vial sellado donde se encontró la presencia de gas Metano en concentraciones hasta de 2% p/p.

Durante el proceso de degradación anaeróbica, empleando cargas orgánicas de 2 y 3 kgDQO/m³d, la proporción de los diferentes grupos bacterianos fue constante; 29% para las bacterias fermentadoras, 43% para las nitrato reductoras, 14% para las sulfato reductoras y 14% para las bacterias metanogénicas 14% (Figura 1). Estos resultados establecieron únicamente la diversidad de los diferentes grupos fisiológicos para las cargas orgánicas ensayadas durante este estudio.

La técnica de microscopía de fluorescencia empleada para estudiar la morfología celular de las bacterias metanogénicas, reveló la presencia de un tipo morfológico particular; las sarcinas. Por otro lado, la identificación de las cepas morfológicamente diferentes y correspondiente a los grupos fisiológicos fermentadores de glucosa

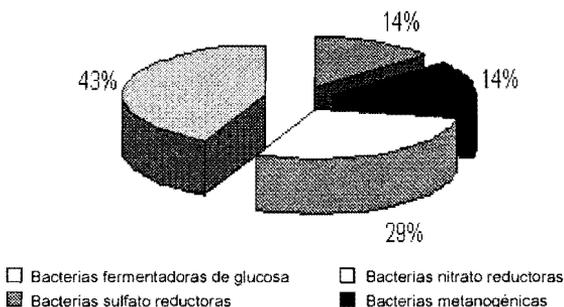


FIGURA 1. Distribución porcentual de los principales grupos fisiológicos en el lodo granular anaeróbico.

y reductores de nitrato, mostró que los géneros con mayor frecuencia en estos sistemas de degradación anaeróbica fueron: *Stafilococcus sp.*, *Klebsiella sp.* y *Clostridium sp.*, así como la especie *Escherichia coli*.

El control de algunos parámetros fisicoquímicos permitió el buen funcionamiento del bioreactor, la alcalinidad total se mantuvo entre 1900 y 3000 mg/L (Figura 2), favorecida por la adición de Bicarbonato de Sodio. Se ha establecido que la alcalinidad total varía entre 1000 y 5000 mg/L en el proceso de digestión anaerobia (Conde, comunicación personal 1996).

El comportamiento del pH durante el tiempo de experimentación puede ser observado en la Figura 3. En estos ecosistemas el pH puede o no estimular las relaciones de competencia entre las bacterias metanogénicas y Sulfato reductoras, las cuales son esenciales para mantener la eficiencia del reactor. Las relaciones de competencia entre bacterias sulfato reductoras y bacterias productoras de metano son debidas a que el Hidrógeno y el Acetato son precursores claves en la formación de Metano durante el tratamiento anaeróbico de las aguas residuales y también pueden servir como donadores de electrones para la reducción del Sulfato, por tanto, las bacterias metanogénicas y las bacterias sulfato reductoras deben ser consideradas

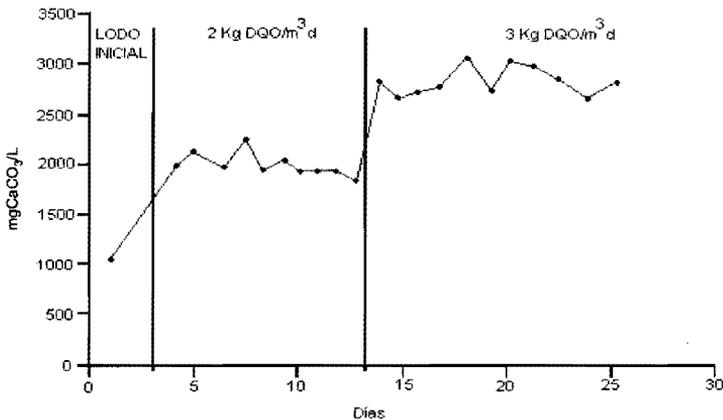


FIGURA 2. Variación de la alcalinidad total durante la degradación anaeróbica de la materia orgánica en reactores batch.

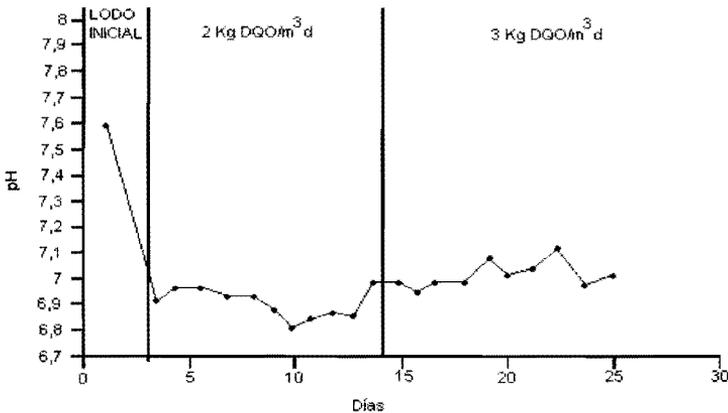


FIGURA 3. Variación del pH durante la degradación anaeróbica de la materia orgánica en reactores batch.

competidores por estos sustratos disponibles en sistemas de tratamiento anaeróbico donde el sulfato este presente y los factores termodinámicos, cinéticos y de pH influyan favorablemente (McCarney 1991, McCarney y Oleszkiwicz 1993).

Por otra parte, los resultados del análisis de correlación de variables entre los diferentes parámetros fisicoquímicos evaluados durante el proceso de degradación anaeróbica de la materia orgánica mostraron que la alcalinidad total correlacionó positivamente con el biogás, el pH y los sólidos suspendidos, no así con la DQO y el Metano. Estas correlaciones indican que el aumento de la alcalinidad total tiene efectos sobre el pH. Sin embargo, el incremento de la alcalinidad debido al aumento de la carga orgánica en estos reactores anaeróbicos incrementó la producción del biogás causando un efecto inverso en la producción de metano, esto se explica por cuanto a mayor carga orgánica, la etapa metanogénica del proceso de degradación anaeróbica se satura, produciendo una acumulación de ácidos grasos que causan cambios de pH capaces de inhibir las bacterias metanogénicas. El Hidrógeno y el CO_2 utilizados como sustratos por bacterias las metanogénicas acetoclásticas se acumulan, aumentando el biogás del sistema e inhibiendo bacterias acidogénicas (Viñas 1994, Mizuno *et al.* 1998). Esto ocasiona una falla en el sistema, disminuyendo la eficiencia del proceso de degradación anaeróbica, aumen-

tando los sólidos suspendidos volátiles, debido a un aumento de la carga orgánica, además de la acumulación de materia orgánica producida en estos casos.

La producción de Metano en el reactor batch varió entre 69 y 82% para la carga de 2 kgDQO/m³d, esta producción de Metano mostró una ligera disminución al aumentar la carga orgánica a 3 kgDQO/m³d, la cual se encontró entre 61 y 78% de Metano (Figura 4). Esta disminución de la proporción de metano puede ser considerada como un indicador de la disminución en la población microbiana metanogénica puesto que se produce un aumento de la intensidad del mezclado como resultado de un aumento de la producción de biogás, perturbando el manto de lodo en este reactor por carga, lo cual supone una pérdida de bacterias metanogénicas (Jawed *et al.* 1996).

Los sólidos suspendidos volátiles se presentaron entre 52 y 160 mg/L para la carga de 2 kgDQO/m³d, estos resultados están por debajo de los niveles obtenidos para la carga de 3 kgDQO/m³d, establecidos entre 54 y 230 mg/L (Figura 5). Este aumento de los niveles de sólidos suspendidos volátiles es ocasionado por el lavado de la biomasa a consecuencia de su infiltración en el licor mezcla del efluente.

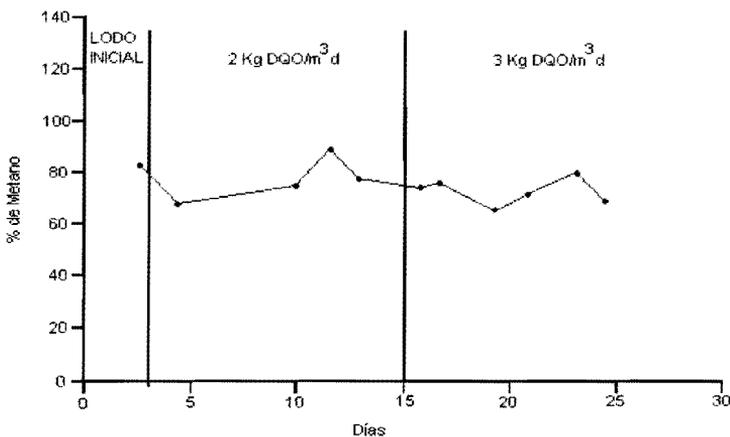


FIGURA 4. Variación del % de metano producido durante la degradación anaeróbica de la materia orgánica en reactores batch.

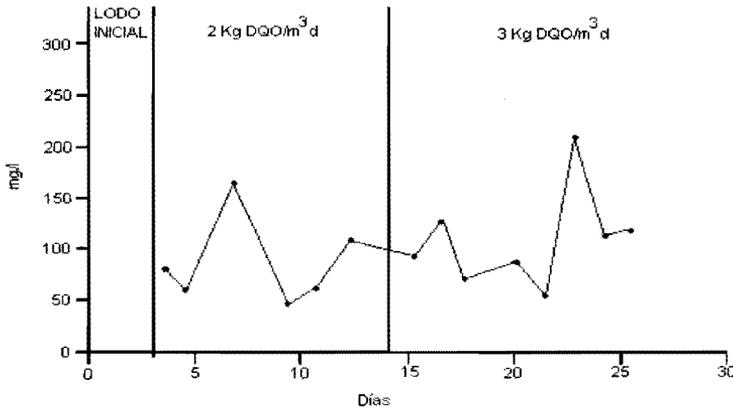


FIGURA 5. Variación de los sólidos suspendidos volátiles durante la degradación anaeróbica de la materia orgánica en reactores batch.

CONCLUSIONES

Los grupos fisiológicos bacterianos aislados del lodo granular anaeróbico fueron: fermentadoras de glucosa, nitrato reductoras, sulfato reductoras y metanogénicas. La sucesión de algún grupo en particular no siguió un patrón atribuible a las variaciones fisicoquímicas mantenidas dentro de los rangos de eficiencia para el proceso de degradación anaeróbica, usando glucosa como única fuente de Carbono.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia por su valiosa colaboración en el financiamiento de este proyecto.

LITERATURA CITADA

- APHA-AWWA-WEF. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th Edition. USA. 1192 pp.
- BAE, J. Y J. LEE. 1999. Layered structure of UASB granules gives microbial populations resistance to toxic chemicals. *Biotechnology Letters* 21: 159-162.

- BALLOWS, A. 1991. Manual of clinical microbiology. 5th Edition. American Society for Microbiology. USA. 112 pp.
- BOONE, D., R. JOHNSON y Y. LIU. 1989. Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of km for H₂O formate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1735-1741.
- BROCK, T. Y M. MADIGAN. 1991. Microbiología. Sexta Edición. Hall Hispanoamericana S.A. México. 879 pp.
- CEPIS. 1999. Disposición final de aguas residuales en ciudades costeras, aplicación de emisarios submarinos. Disponible en: www.cepis.org.pe/eswww/gestcont/dispagua.html
- CHING, G. y Y. SHING. 1994. Modeling of anaerobic corrosion influenced by sulfate reducing bacteria. *J. K. Park.* 12: 123-125.
- DOWELL, V., G. LOMBARD, F. THOMPSON y A. ARMFIELD. 1977. Media for isolation characterization and identification of obligately anaerobic bacteria. CDC Laboratory manual, Center for disease control. USA. 156 pp.
- EDWARD, P. y W. EDWIN. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Three Edition. Enteric bacteriology laboratories, Center for disease control. Burgess Publishing Company. USA. 172 pp.
- JAWED, M. and TARE, V. 1996. Methanogenic activity and performance of UASB, DSFF reactors. *Wat. Sci. Tech.* 34(5-6): 483-487.
- LETTINGA, G. 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67: 3-28.
- LUENGO, E. 1989. Manual de microbiología básica. La Universidad del Zulia. Venezuela. 290 pp.
- MCCARNEY, D. 1991. Effects of sulfate and sulfide on methanogenic and sulfate reducing activity during degradation of simple organics. Role of propionate and accumulation. PhD. Thesis. University of Manitoba, USA. 293 pp.
- MCCARNEY, D. Y K. OLESZKIEWICZ. 1993. Competition between methanogens and sulfate reducers: Effect of COD: Sulfate ratio and acclimation. *Wat. Environ. Res.* 65:655-668.

- MIZUNO, O. , L. LI, y T. NOIKE. 1998. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. *Wat. Res.* 32(5): 1626-1634.
- MORGAN, J. 1990. The effects of using various types of carbonaceous substrate on UASB granules and on reactor performance. *Biological Wastes* 34:55-71.
- MORGAN, J. y C. FORSTER. 1992. The internal architecture of anaerobic and activated sludges. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology.* 50: 211-226.
- MOSCOSO, J. y G. LEON. 1994. Uso de aguas residuales. Disponible en: www.cepis.org.pe/eswww/proyecto/repidisc/publica/hdt/hdt059.html
- POWER, D. y P. MCCUEN. 1988. *Manual of BBL, products and laboratory procedures.* Sixth Edition. USA. 389 pp.
- QUARMBY J. y C. FORSTER. 1995. An examination of the structure of UASB granules. *Water Research.* 29(11): 2449-2454.
- VIÑAS, M. 1994. Criterios de diseño y escalado de reactores anaerobios. III Taller y seminario latinoamericano sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales. Uruguay. Libro de memorias. p. 106.