

# Análisis de la producción de metano en reactores anaerobios termofílicos

*Aplicación de microscopía de fluorescencia natural*

Rosario SOLERA  
L.I. ROMERO  
Diego SALES

*Dpto. de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente  
Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales  
CASEM  
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ*

Los parámetros utilizados usualmente en el control de la digestión anaerobia, como son porcentaje de Demanda Química de Oxígeno (DQO) consumida, niveles de ácidos grasos volátiles y cantidad y composición de biogás generado en el proceso, no siempre son representativos de la composición y estado fisiológico de la biomasa contenida en el sistema (Jawed, 2000). Así, para obtener una información más amplia sobre esta biomasa, junto con los parámetros anteriores se han utilizados otros para caracterizar a los microorganismos responsable del proceso anaerobio. El parámetro utilizado tradicionalmente para cuantificar la biomasa anaerobia ha sido los sólidos volátiles suspensión (SVS), aunque de forma más reciente también se vienen utilizando técnicas de recuento celular, mientras que en los estudios de actividad se han empleado tests de actividad que permiten determinar la máxima actividad alcanzable por estos microorganismos en las condiciones estándares en las que se realiza el test, y que no necesariamente tiene que coincidir con la unidad de tratamiento en la que se encuentren (Lazarova, 1995).

Las determinaciones de actividad metanogénica se suelen realizar relacionando el consumo de sustrato o la producción de metano generado en el proceso con la cantidad de biomasa contenida en el sistema. Sin embargo, el parámetro utilizado clásicamente para determinar la biomasa, los sólidos voláti-

les en suspensión, no siempre es representativo de los grupos minoritarios implicados en la depuración anaerobia, como es el caso de la población metanogénica (Solera, 1999), lo que supone una limitación en las determinaciones de actividad realizadas por este procedimiento.

En este estudio se ha determinado la actividad metanogénica en reactores anaerobios termofílicos relacionando la cantidad de metano generado en cada sistema con la concentración de metanógenas determinada por microscopía. Estas determinaciones de actividad se han comparado con las obtenidas de forma clásica (relativas a SVS).

Se han utilizado reactores anaerobios termofílicos de tanque agitado de una y dos etapas, operando a distintos tiempos hidráulicos de retención. En los reactores de una etapa, la acidogénesis y metanogénesis tienen lugar en el mismo reactor, y en los sistemas de dos etapas, éstas tienen lugar en reactores separados conectados en serie.

## Material y métodos

### Protocolo experimental

El protocolo experimental fue diseñado con la finalidad de determinar la actividad metanogénica referida a la concentración de

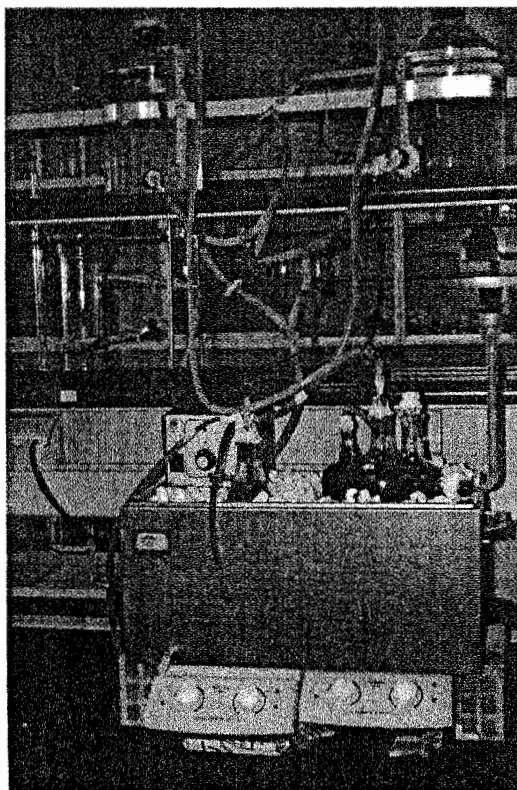


Foto 1.

metanógenas determinada por procedimientos directos de recuento bacteriano, y comparar los resultados obtenidos con los de actividad referidos a la biomasa total contenida en el sistema. Asimismo se establece una correlación entre la producción de metano generado en el proceso y la concentración de bacterias metanógenas en cada uno de los sistemas estudiados.

Los equipos utilizados se corresponden con reactores de tanque agitado sin recirculación de biomasa. En este tipo de reactor el tiempo hidráulico de retención (THR) coincide con el tiempo de retención de sólidos en el sistema. Se utilizaron dos tipos de sistemas: reactores de una y dos etapas. Los reactores monoetapa operaron a dos THR: 4 y 10 días (digestores R4 y R10, respectivamente). El sistema de fases separadas, tanto el reactor acidogénico (reactor RA) como el reactor metanogénico (reactor RM) operaron a un THR de 4 días.

### Equipo experimental

En la *figura 1* se muestra un esquema del reactor de tanque agitado utilizado en los ensayos a escala de laboratorio.

El equipo está constituido por los siguientes elementos:

Un cuerpo central de forma cilíndrica, con una altura de 30 cm, que constituye el reactor anaerobio propiamente dicho. La capacidad total de esta unidad es de 5 litros, con un volumen útil de 4,7 litros en las condiciones experimentales seleccionadas.

El sistema está provisto de una boca superior por donde se incorpora la alimentación en semicontinuo (una dosis diaria), que descarga en la parte inferior del reactor mediante un tubo interno incorporado al sistema. Una abertura, situada al nivel del líquido, permite desalojar una cantidad de efluente equivalente a la de alimentación. El biogas producido en la digestión, se recoge en un gasómetro, que está conectado con el reactor a través de una salida en la parte superior del mismo.

El cuerpo del reactor se encuentra inmerso en un baño de agua que se mantiene a la temperatura de trabajo ( $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mediante un termostato de inmersión (marca Selecta, modelo Tectra 100). La homogeneización del medio en el interior del reactor se consigue mediante un dispositivo de agitación magnética.

Un gasómetro, constituido por un recipiente de 5 litros de volumen, inicialmente lleno con agua. La posición del gasómetro, a un nivel más elevado que la del reactor, provoca una ligera depresión en este último, favoreciendo las condiciones anaerobias del medio.

El gasómetro, conectado a la cabeza del reactor, permite la cuantificación del volumen generado de biogas en cada instante a partir del volumen equivalente de agua desplazada. Una llave colocada en la parte inferior facilita la salida/entrada de agua del sistema permitiendo, también, la extracción de la muestra gaseosa por desplazamiento, nuevamente, con agua. Las muestras, así recogidas, son posteriormente analizadas para determinar su composición.

En la *foto 1* se muestra el equipo de fases separadas utilizados.

### Características de la alimentación

Los reactores se alimentaron con vinaza de vino procedente de una destilería de alcohol vínico ubicada en Tomelloso (Ciudad Real, España), la cual era almacenada y congelada hasta su utilización. Las alimentaciones se diluían con agua destilada para obtener la concentración utilizada en los ensayos (15 g DQO/L). En general las vinazas muestran una relación adecuada entre los diferentes macro y micro-nutrientes con una relación DQO:N:P favorable para un tratamiento microbiológico (Sales, 1982). Debido al carácter ácido de la vinaza, previamente a su introducción en los reactores se realizaba una corrección del pH de la alimentación. Así, para los reactores monoetapa y metanogénico se alcalinizaba hasta 8-8,5 con una solución de NaOH concentrada y, en el caso del reactor acidogénico, hasta pH 5,5.

Ensayos de biodegradabilidad (Pérez, 1995) han mostrado que la vinaza está constituida por dos sustratos de diferente naturaleza y biodegradabilidad:  $S_1$ , fracción fácilmente biodegradable (80% del total), y  $S_2$ , fracción recalcitrante. La

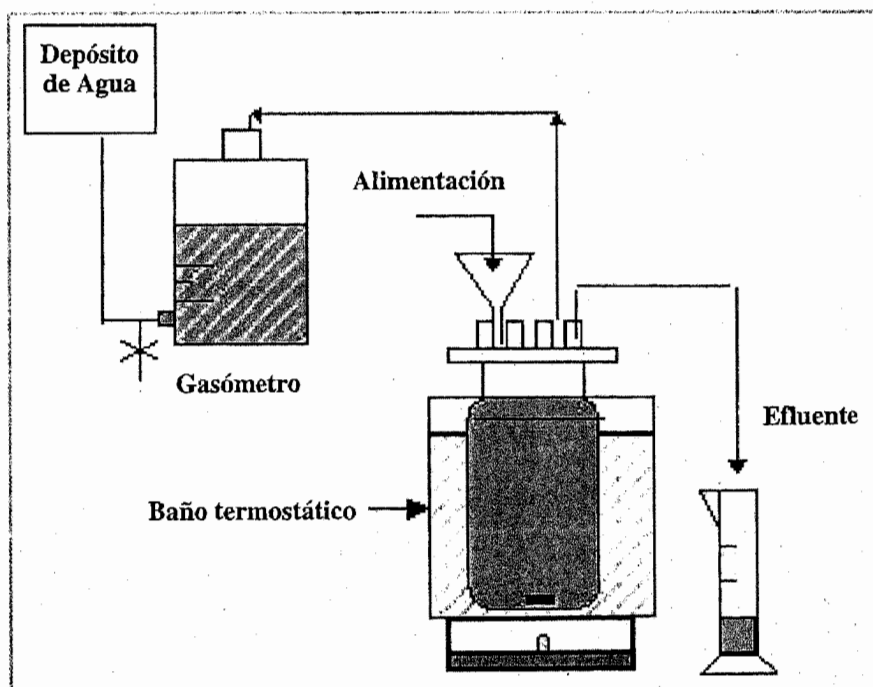


Figura 1. Esquema del reactor de tanque agitado utilizado en los ensayos.

DQO inicial de la vinaza era de 30 g DQO/L con un contenido en SVS y microbiológico no significativo.

El reactor metanogénico se alimentó con afluente acidogénico filtrado (filtro Millipore GVWP, tamaño medio de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) para retener los microorganismos acidogénicos.

### Caracterización bacteriana de los equipos utilizados

En un estudio previo (Solera, 1999; 2001) se realizó la separación de fases y se caracterizó la población bacteriana contenida en cada uno de los sistemas. Las bacterias acidogénicas y metanogénicas presentan diferentes tiempo de duplicación y requerimientos nutricionales y medioambientales. Estas diferencias permitió

seleccionar y enriquecer cada digestor con uno de estos grupos a partir de un inóculo precedente de un digestor monoetapa, conjugando factores medioambientales (pH, fundamentalmente) y factores cinéticos (tiempo de retención impuesto al sistema). Se determinó la población total y metanogénica mediante microscopía de epifluorescencia. El recuento total se realizó mediante tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) según el procedimiento descrito por Kepner y Pratt (1994). El número de metanógenas se determinó mediante fluorescencia natural acorde con el protocolo descrito por Doddema y Vogels (1978) y Jain (1991). Se determinaron los siguientes porcentajes de metanógenas en el total de la población bacteriana contenida

en cada sistema estudiado: 16% en los reactores monoetapa, 0,17% en el reactor acidogénico y 26 % en el reactor metanogénico. Cabe resaltar que no se consiguió una separación total de ambas fases, sino un enriquecimiento de las mismas. La diferente morfología predominante observada para las metanógenas que permanecen en el reactor acidogénico, así como las condiciones de operación impuestas en la selección de microorganismos acidogénicos hace pensar que la población de metanógenas de este digestor corresponde fundamentalmente a las utilizadoras de hidrógeno.

### Métodos analíticos

Todas las determinaciones analíticas aplicadas al seguimiento y control de los parámetros del proceso de digestión anaerobia se han realizado según se describen en los "Métodos Normalizados" (A.P.H.A., A.W.W. A., W.P.C.F., 1990). Se analizaron pH y DQO en las muestras líquidas de efluente e influente. Se determinó la DQO soluble mediante dicromatometría: las muestras eran filtradas previamente a través de un filtro Millipore AP4004705 con un tamaño medio de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Se determinó el volumen de biogás producido mediante desplazamiento de agua en el gasómetro y su composición ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) por cromatografía (Nebot, 1995).

La población de metanógenas se ha determinado mediante microscopía de fluorescencia natural según el procedimiento descrito por Doddema y Vogels (1978) y Jain (1991). En primer lugar, la muestra era fijada con glutaraldehído (concentración final 5%), a continuación se homogeneizaba y diluía siguiendo el mismo procedimiento descrito para el caso anterior. En la etapa de recuento al microscopio se utilizó una cámara Neubauer improved *bright-line* de 0,1 mm de profundidad y un área 0,0025  $\text{mm}^2$ , procediendo al llenado, con una pipeta Eppendorf, de cada una de las áreas de recuento con 5  $\mu\text{L}$  de muestra diluida. Para la observación y recuento bacte-

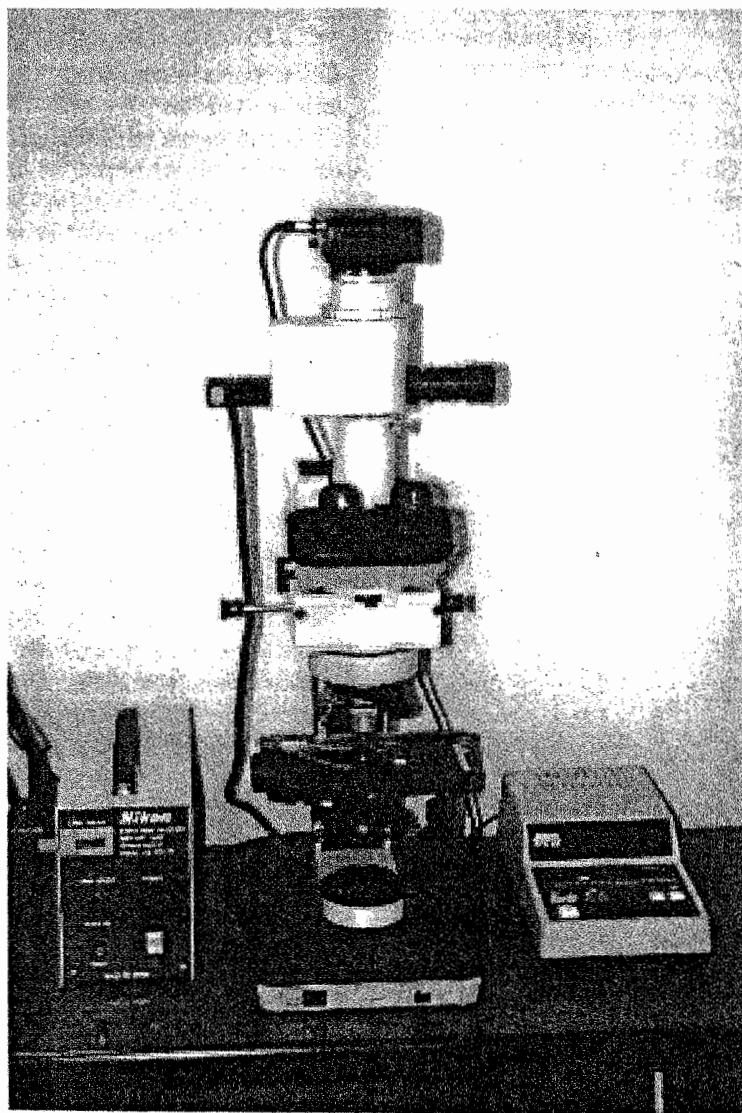


Foto 2.

Reactor	THR	VCOo	DQOc	pH <sub>e</sub>	Biogas	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>
R10	10	1,44	82,1	7,35	0,47	82	18	0
R4	4	3,75	80,1	7,60	0,80	85	15	0
RA	4	3,79	30,1	5,53	0,18	66	29	7
RM	4	2,65	71,7	7,80	0,45	91	9	0

Tabla 1. Resultados de los principales parámetros de operación y control del proceso de digestión anaerobia.

THR (días); velocidad de carga orgánica (VCOo) expresada en  $g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ ; eficacia de depuración; demanda química de oxígeno consumida (DQOc) medida como porcentaje de DQO inicial eliminada; pH; volumen de biogas generado como  $l \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$  digestor; porcentajes de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, e H<sub>2</sub> en el biogas.

riano se utilizó un equipo Nikon Labophot-2A/2 (foto 2), empleando un bloque de filtros Nikon BV-1A que permite la obtención de una radiación de excitación con una longitud de onda entre 400 y 440 nm, y la selección, mediante el filtro barrera, de una longitud de onda de 460 nm. Longitudes de ondas similares a las descritas por Doddema y Vogels (1978) en sus estudios. El recuento se realizó, a 1.000 aumentos, en 80 cuadrículas pequeñas en las que se contaron las bacterias del interior de las mismas y de los lados superior y derecho. Se enfocó el microscopio a diferentes niveles de profundidad, ya que sólo una pequeña proporción de las bacterias queda en la superficie pegadas al cubreobjeto.

La cuantificación de la biomasa se realizó mediante determinación de SVS en el efluente de los digestores según el método descrito en los Métodos Normalizados (A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., 1990).

La actividad metanogénica se determinó por medio de la formación de metano en relación con la concentración microorganismos metanogénicos y la biomasa presentes en cada digestor.

## Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestran los resultados de los principales parámetros de operación y control de los reactores utilizados en los ensayos.

Los reactores monoetapa funcionan con un rendimiento en torno al 80%, este valor coincide con la fracción biodegradable de la alimentación comentado anteriormente. Las diferencias entre ambos reactores se deben a las condiciones de operación impuestas (diferentes THR) y al mantenimiento de una alimentación con la misma concentración de materia orgánica. Así, en el reactor R4 la mayor velocidad de carga orgánica aplicada conlleva a una mayor producción de biogas en este reactor con respecto al R10.

En el sistema de fases separadas, el reactor acidogénico alcanza una eficacia depurativa del 30%.

En la tabla 2 se muestran los resultados medios correspondientes a la concentración de metanógenas (células/ml), biomasa (SVS) y actividad en cada uno de los sistemas estudiados.

En los digestores monoetapa una disminución del THR conlleva a un aumento de la población metanogénica y a una disminución de la actividad metanogénica referida tanto a la biomasa como a la concentración de metanógenas. En sistemas sin retención de biomasa la disminución del THR conlleva a una mayores velocidades de dilución y, por tanto, a que un mayor número de microorganismos abandonen el sistema diariamente en el efluente. Consecuentemente es mayor la cantidad de sustrato que se consume en la ruta anabólica, en la que no se genera metano, para el mantenimiento del tamaño de la población estacionaria.

En el sistema acidogénico los valores medios correspondientes al periodo de estudio no son coincidentes. Así, los valores de actividad referidos a la biomasa son los menores en tanto que los referidos a la concentración de metanógenas son los mayores en este digestor. En este caso la población metanogénica representa menos del 1% de la población bacteriana del digestor por lo que la biomasa total no es representativa de la misma.

En cualquier caso cabe destacar que los valores de actividad obtenidos en este trabajo son inferiores a los determinados en estudios realizados con reactores y condiciones de operación similares pero en los que los valores de actividad se corresponden con valores de actividad máxima específica (Shang, 1998).

La producción de metano se ha correlacionado con la concentración de microorganismos metanogénicos y biomasa presentes en los sistemas estudiados, obteniéndose una relación de tipo logarítmico (figura 2) en el primer caso. No se ha obtenido relación alguna entre la producción de este gas y la biomasa. La pendiente de la curva representa la actividad referida a las bacterias metanogénicas. Se observa una distribución de los puntos en tres zonas perfectamente diferenciadas: en la zona superior quedan representados los digestores monoetapa R4 y

Reactor	Población metanogénica ( $\times 10^9$ ) <sup>(1)</sup>	SVS (g/L)	Actividad mLCH <sub>4</sub> /cel/d ( $\times 10^{-9}$ )	Actividad mLCH <sub>4</sub> /gSVS/d
R10	1,29 ± 0,50	0,47 ± 0,09	2,71 ± 0,38	684 ± 157
R4	4,60 ± 0,80	1,57 ± 0,22	1,10 ± 0,08	352 ± 24
RA	0,17 ± 0,05	1,05 ± 0,09	7,40 ± 3,16	111 ± 25
RM	2,68 ± 0,27	0,89 ± 0,15	1,56 ± 0,14	478 ± 82

Tabla 2. Concentración y actividad de metanógenas en los sistemas estudiados.

(1) Bacteria  $\cdot ml^{-1}$ .

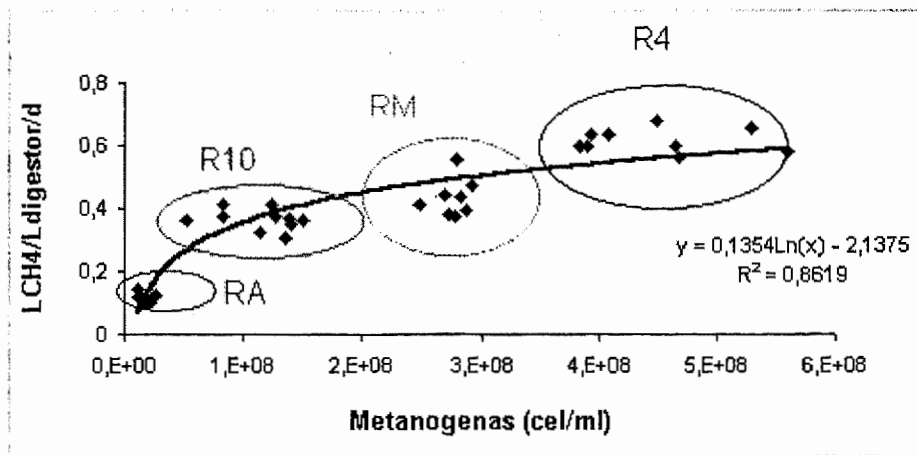


Figura 2. Relación entre la producción de metano y población metanogénica en los sistemas estudiados.

reactor metanogénico RM para los que se estimaron unos valores de actividad metanogénica similares y en los que la concentración de metanógenas es superior a los otros casos estudiados; la zona intermedia se corresponde con el digestor R10, con una producción media de metano y mayores valores de actividad que los digestores anteriores, y en la zona inferior queda representado el digestor acidogénico, con una producción y tamaño de población metanogénica inferior a los otros sistemas estudiados y representativo, fundamentalmente de la población de metanógenas utilizadas de hidrógeno.

Cabe destacar que los valores de esta actividad estimados en el reactor acidogénico fueron muy superiores a los otros casos, aspecto que coincide con el hecho de que las metanógenas utilizadas de hidrógeno presenten un crecimiento mucho más rápido que sus homólogas acetoclasticas.

### Conclusión

Cuando se comparan los resultados de actividad referida a la concentración de metanógenas y biomasa, utilizando diferentes tecnologías anaerobias, se observa que:

- \* La actividad metanogénica se puede determinar referida a tanto a la concentración de metanógenas como a los SVS en sistemas monoetapa que

operan en condiciones estables. Esto es consecuencia de que en estos sistemas la relación entre metanógenas y biomasa total se mantiene constante, independientemente del tiempo de retención utilizado.

- \* En los sistemas de fases separadas, en la etapa acidogénica la población de metanógenas es lo suficientemente pequeña como para que los SVS sean representativos de las mismas, por tanto, en este caso, las determinaciones de actividad metanogénica referidas a la concentración de metanógenas proporcionan una información más específica del estado fisiológico de esta población que con respecto a la biomasa total.

La productividad de metano en los reactores anaerobios sin sistemas de retención de biomasa se relaciona con el tamaño de la población metanogénica hasta un nivel máximo a partir del cual el aumento del tamaño de la población se compensa con una disminución de la actividad global.

### Bibliografía

1. APHA; AWWA; WPCF. (1990). *Métodos Normalizados. Para análisis de aguas potables y residuales*. Ed: Díaz de Santos, S.A.
2. Doddema, H.; Vogels, G. 1978. *Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy*.

- App. Environ. Microbiol., 36(5) 752-754.
3. Jain, M.; Zeikus, G.; Bhatnagar, L. 1991. *Anaerobic microbiology. A practical approach*. Cap.12, 223-245. Ed: Levett, P.N. Oxford Press. N.York.
4. Jawed, M.; Tare, V. 1999. *Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity test*. Water S A, 25 (3), 345-350.
5. Lazarova, V.; Manem, J. 1995. *Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment*. Wat. Res., 29, (10), 2227-2245.
6. Nebot, E., Romero, L.I., Quiroga, J.M., Sales, D. 1995. *Effect of the Feed Frequency on the Performance of Anaerobic Filters*. Anaerobe, 1, 113-120.
7. Pérez, M.; Romero, L.I.; Sales, D. 1997. *Performance of fixed-film reactors for anaerobic treatment of wine-distillery wastewater: effect of the influent pH conditions*. Chem. Biochem. Eng. Q., 11(3) 133-137.
8. Sales, D.; Valcárcel, M.J.; Pérez, L.; Martínez de la Ossa, E. 1982. *Determinación de la carga contaminante y naturaleza de los vertidos de destilerías de alcohol de vino y alcohol vínico*. Química e Industria, 28 (10), 701-706.
9. Shang, Y.; Sung, S. 1998. *Comparison of temperature-phased and two-phase anaerobic digestion of cellulose*. Proc. Water Environ. Fed. Annu. Conf. Expo., 71, (1), 431-442.
10. Solera, R. 1999. *Cuantificación de los microorganismos responsables de la degradación anaerobia. Aplicación al análisis del funcionamiento de reactores anaerobios*. Universidad de Cádiz. ISBN:84-7786-579-5.
11. Solera, R. 2001. *Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: comparative analysis by different counting methods*. Anaerobe (en prensa).