

Digestión anaerobia de lodos de depuradora: aplicación de la microscopía de epifluorescencia al análisis del proceso

R. Solera, M.A. de la Rubia, L.I. Romero y D. Sales

Dept. de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnología del Medio Ambiente

Facultad de Ciencias del Mar

Universidad de Cádiz

Summary

In this paper, we studied the industrial-scale mesophilic anaerobic digestion of sludge. We used fluorescence microscopy methods to count the bacterial population involved in this process. The results are compared to those obtained in a previous laboratory-scale study in thermophilic temperature.

Antecedentes

La digestión anaerobia es un proceso de degradación microbiológico en el que la materia orgánica se transforma en dióxido de carbono y metano, en ausencia de oxígeno, mediante la acción coordinada e interdependiente de un conjunto de poblaciones bacterianas con metabolismos diferentes. La microbiota responsable del proceso se compone de varios grupos bacterianos asociados simbióticamente, que han de mantener un delicado equilibrio entre sí, ya que los productos finales de las rutas metabólicas de cada uno de ellos constituye el sustrato adecuado para el siguiente (1).

El proceso puede realizarse a dos rangos de temperaturas: mesofílico y termofílico, cuyos valores óptimos son 35°C y 55°C, respectivamente. La temperatura de operación determina la actividad microbiana. Así, dentro de cada rango determinado, la velocidad de crecimiento aumenta exponencialmente con el incremento de temperatura hasta alcanzar un máximo (temperatura óptima) después del cual decae bruscamente, hasta anularse, unos pocos grados después del óptimo (2). Además, la mayoría de las reacciones de biodegradación requieren menores energías de activación a altas temperaturas, lo cual implica un proceso de digestión más rápido (3).

Actualmente, la digestión anaerobia

El estudio se realizó con una doble finalidad: analizar el funcionamiento de dos digestores anaerobios mesofílicos de lodos de depuradora a escala industrial y comparar los resultados con los obtenidos en un trabajo previo con reactores anaerobios termofílicos a escala de laboratorio

robía de lodos de depuradora se realiza en rango mesofílico de temperatura. No obstante, hoy día es objeto de investigación y estudio la viabilidad técnica de la implantación de esta tecnología de conversión biológica en rango termofílico.

El operar en rango termofílico de temperatura supone una serie de ventajas. En primer lugar, la velocidad de crecimiento de los microorganismos es dos o tres veces superior a la correspondiente en condiciones mesófilas, lo cual permite trabajar a tiempos hidráulicos de retención inferiores y, por tanto, con reactores más pequeños. En segundo lugar, se produce un elevado grado de eliminación de patógenos (la mayoría mesófilos), lo que

es especialmente importante cuando el fango digerido vaya a ser utilizado. En tercer lugar, el fango generado en los procesos termofílicos es bajo, a pesar de la alta velocidad de crecimiento bacteriano, y tiene una mejor capacidad de secado que el fango del proceso mesofílico.

Este estudio se realizó con una doble finalidad: analizar el funcionamiento de dos digestores anaerobios mesofílicos de lodos de depuradora a escala industrial, en base a la caracterización de la población bacteriana presente mediante microscopía de epifluorescencia, y comparar estos resultados con los obtenidos en un estudio previo (4) con reactores anaerobios termofílicos a escala de laboratorio.

Material y métodos

Equipos experimentales y condiciones de operación

Los equipos utilizados a escala de laboratorio 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. Los reactores operaron a dos THR: 4 y 10 días.

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

El equipo utilizado está constituido por los siguientes elementos:

A.- 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

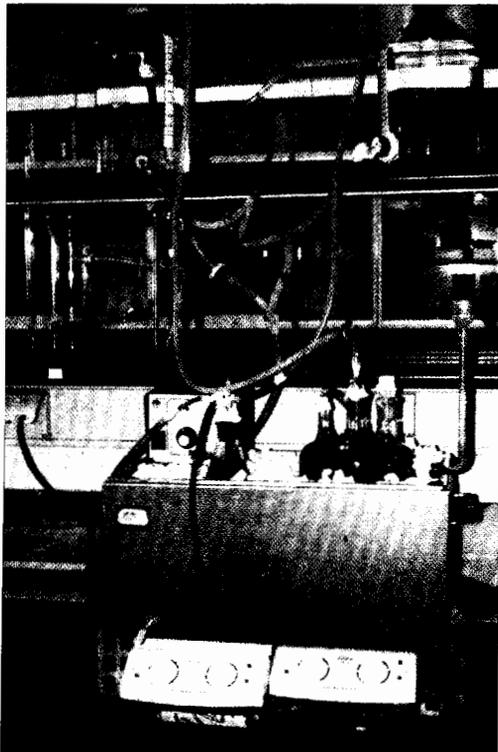


Figura 1. Esquema del reactor de tanque agitado utilizado en los ensayos

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 biogás 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 ($55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) mediante un termostato de inmersión (marca Selec-

Los ensayos a escala industrial se han realizado en la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) 'Guadalete', ubicada en el término municipal de Jerez de la Frontera

ta, modelo Tectra 100). La homogeneización del medio en el interior del reactor se consigue mediante un dispositivo de agitación magnética.

B.- 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 biogás 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.

Los reactores de laboratorio se alimentaron con vinazas de vino procedente de una destilería de alcohol vínico ubicada en Tomelloso (Ciudad Real), 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 gDQO/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 biológico (5). Dado el carácter ácido de la vinaza, previamente a su introducción en los reactores se realizaba una corrección de pH de la alimentación: se alcalinizaba hasta 8-8,5 con una solución de NaOH concentrada.

Los ensayos a escala industrial se han realizado en la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) "Guadalete" ubicada en el término municipal de Jerez de la Frontera. La planta posee una capa-

Escala del estudio	THR de operación	VCOo	DQOc	pH _e	Biogas	CH ₄	CO ₂
Laboratorio	10	1.44	82.1	7.35	0.47	82	18
	4	3.75	80.1	7.60	0.80	85	15
Industrial	40	1.06	40.4	7.35	0.37	68	32

THR (días); velocidad de carga orgánica (VCOo) expresada en g·L⁻¹·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·L⁻¹·d⁻¹ digestor; porcentajes de CH₄, CO₂, e H₂ en el biogas.

(*) Los resultados se corresponden con los valores medios de las dos unidades de digestión anaerobia utilizadas en el estudio durante el periodo de realización del mismo.

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

idad de depuración de 5400 m³/h, correspondiente a una población de 691000 habitantes-equivalente.

En el presente trabajo, se han utilizado dos de las unidades de digestión anaerobia de lodos que posee la planta. Los fangos primarios y secundarios producidos en la planta se someten a una digestión anaerobia. La digestión primaria de fangos se realiza en cuatro tanques circulares de 5500 m³ de capacidad que se corresponden con equipos convencionales de crecimiento en suspensión que operan en rango mesofílico de temperatura. El calentamiento de las unidades se realiza mediante un sistema de calderas que se alimentan con parte del biogas generado en el proceso. La homogeneización interna se favorece mediante la inyección de biogas a presión en el fondo de los digestores. El tiempo hidráulico de retención en las unidades osciló en torno a 40 días durante el periodo de estudio.

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" (6). Se analizaron pH y DQO en las muestras líquidas de efluente e influente. Se determinó la DQO mediante dicromatometría. Se

Se analizaron pH y DQO en las muestras líquidas de efluente e influente; se determinó la DQO mediante dicromatometría y el volumen de biogas producido mediante desplazamiento de agua en el gasómetro. Su composición se estableció por cromatografía

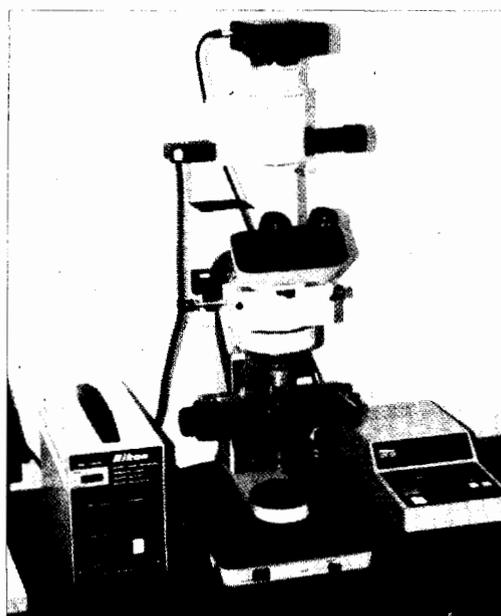


Figura 2. Equipo de microscopía utilizado en el estudio

determinó el volumen de biogas producido mediante desplazamiento de agua en el gasómetro y su composición (CH₄, CO₂ e H₂) por cromatografía (7).

La población de metanógenas se ha determinado mediante microscopía de fluorescencia natural según el procedimiento descrito por

Doddema y Vogels (8), y Jain (9). En primer lugar, la muestra era fijada con glutaraldehído (concentración final 5%) y sometidas a un tratamiento con ultrasonido para deshacer los flóculos. A continuación se homogeneizaba y diluía en tampón fosfato KH₂PO₄ (pH 7.2). 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 mm², procediendo al llenado, con una pipeta Eppendorf, de cada una de las áreas de recuento con 5μL de muestra diluida. Para la observación y recuento bacteriano se utilizó un equipo Nikon Labophot-2A/2 (ver Figura 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 estos autores en sus estudios. El recuento se realizó, a 1000 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 concentración total de microorganismos en el sistema se ha

determinado por microscopía de epifluorescencia mediante tinción con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) según el procedimiento decrito por Kepner (10).

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

Escala del estudio	THR de operación	Población total ($\times 10^9$)	Población metanogénica ($\times 10^{10}$) ⁽¹⁾	Metanógenas (%)	Actividad $\text{mLCH}_4/\text{cel/d}$ ($\times 10^{-9}$)
Laboratorio	10	0.8±0.2	0.13±0.05	16.8	2.71±0.38
	4	2.9±0.7	0.46±0.08	16.6	1.10±0.08
Industrial	40	11.2±8.8	0.39±0.04	6.3	0.65±0.03

(1) Bacteria $\cdot \text{mL}^{-1}$

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

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 a escala de laboratorio e industrial.

Los reactores de laboratorio funcionan con un rendimiento en torno al 80%; este valor coincide con la fracción biodegradable de la vinaza según ensayos de biodegradabilidad realizados en estudios precedentes (11). La diferencia entre ambos se debe a las condiciones de operación impuesta, así en el reactor R4 la mayor velocidad de carga orgánica aplicada conlleva una mayor producción de biogas en este reactor con respecto al R10.

Los reactores industriales operan con una densidad media de carga orgánica de 1.06 gDQO/L/d y una eficacia depurativa en torno al 40%. Los bajos valores de eficacia determinados pueden explicarse en parte a que un porcentaje de la alimentación de estos reactores está constituida por lodos primarios que son de naturaleza parcialmente biodegradables debido a su contenido en material inorgánico. La producción media de biogas es de 0,37 Lbiogas/Ldigestor/d con un contenido en metano del 68%.

En la Tabla 2 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de microorganismos totales y metanogénicos en los sistemas estudiados, así como los resultados correspondientes a los porcentajes de metanógenas y a las determinaciones de actividad referi-

das a la producción de metano y concentración de metanógenas en los reactores utilizados.

La población de metanógenas presente en los reactores de laboratorio es del 16% en ambos sistemas. Como se ha comentado anteriormente, la producción de biogas obtenida en el reactor R4 es superior como consecuencia de la mayor velocidad de carga orgánica suministrada en este caso. El hecho, sin embargo, de que la actividad metanogénica sea menor en este digestor con respecto al R10 puede explicarse en base a que la población estacionaria para un caudal de alimentación más elevado (mayor cantidad de sustrato) es de mayor tamaño y, además, la mayor velocidad de dilución impuesta al sistema implica un aumento de la cantidad de microorganismos que salen junto con el efluente por lo que, presumiblemente, el mantenimiento del tamaño de la población para las condiciones consideradas, requerirá que una mayor cantidad de sustrato sea utilizada en la ruta anabólica que no genera metano.

En el caso del estudio a escala industrial, conviene considerar que la naturaleza de la alimentación utilizada en este caso interfiere en la cuantificación de la población total de microorganismos contenida en el digestor. Esta alimentación está compuesta en un alto porcentaje por lodos que provienen del tratamiento biológico aerobio lo que implica una gran entrada de microorganismos al sistema que no puede ser diferenciada de la población anaerobia del digestor por la

La naturaleza de la alimentación utilizada interfiere en la cuantificación de la población total de microorganismos contenida en el digestor

técnica de microscopía de epifluorescencia con DAPI. Por el contrario, este aspecto no afecta al recuento de metanógenas ya que éstas no se encuentran en la alimentación y la técnica de microscopía por autofluorescencia permite su recuento específico e independiente de las otras poblaciones presentes en el digestor.

En relación con las consideraciones anteriores, la población bacteriana presente en este digestor está formada principalmente por microorganismos no metanogénicos que alcanzan porcentajes superiores al 90%. Estos resultados son consecuencia del elevado contenido de microorganismos en la alimentación. En este sentido los resultados obtenidos para la concentración de metanógenas presentan una menor variabilidad que los del recuento total por ser un conteo específico que no depende del contenido bacteriano de la alimentación.

La población total de microorganismos en el digestor industrial es dos órdenes de magnitud superior a los digestores monoetapa de laboratorio en tanto que el tamaño de la

población metanogénica (no contenida en la alimentación) es similar a la del reactor R4. Cabe destacar que, para un mismo tamaño de población metanogénica, los valores de actividad determinados a escala industrial son bastante inferiores a los del reactor R4.

Los resultados obtenidos en el digestor industrial son consecuencia de las condiciones de operación seleccionadas para este digestor: temperatura mesófila y elevado tiempo de retención. Así, el desarrollo del proceso a menor temperatura y a un tiempo de retención muy superior a los seleccionados en los ensayos de laboratorio determinan la menor actividad metanogénica a escala industrial.

Conclusiones

La técnica de recuento directo de microorganismos por microscopía de autofluorescencia es aplicable a reactores industriales para la degradación de lodos de depuradora. No obstante, la técnica de recuento mediante tinción con DAPI no permite discernir entre la población procedente de la alimentación y la propia del digestor, por lo que no ofrece información de relevancia en este caso dado que la alimentación posee altas concentraciones de microorganismos. Este aspecto, probablemente, determine en gran medida los elevados resultados de concentración

total y porcentaje de población no metanogénica obtenidas para este digestor.

La temperatura mesófila y el elevado tiempo de retención impuesto al digestor industrial explican los menores valores de actividad metanogénica obtenidos en este sistema con respecto a los digestores que operan en rango termofílico de temperatura.

Agradecimientos

A Aguas de Jerez, S.A. y PROSEIN, S.A., por su colaboración en el estudio a escala industrial.

Bibliografía

1. Schink, B. (1997). *Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 61, 262-280.

2. Sinclair, C.G. (1990). *Cinética de los procesos microbianos*. En Biotecnología Básica. Bu'lock J., Kristiansen B., eds. Cap. 4, 75-127. Ed: Acribia, Zaragoza.

3. Nozhevnikova, A.; Hollinger, C.; Ammann, A.; Zehnder, A. (1997). *Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (2-27°C)*. Water Sci. Technol., 36, 57-64.

4. 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.

5. 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.

6. APHA; AWWA; WPCF. (1990). *Métodos Normalizados. Para análisis de aguas potables y residuales*. Ed: Díaz de Santos, S.A.

7. Nebot, E., Romero, L.I., Quiroga, J.M., Sales, D. *Effect of the Feed Frequency on the Performance of Anaerobic Filters*. Anaerobe, 1, 113-120. (1995).

8. Doddema, H.; Vogels, G. (1978). *Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy*. App. Environ. Microbiol., 36(5) 752-754.

9. Jain, M.; Zeikus, G.; Bhatnagar, L. (1991). *Anaerobic microbiology. A practical approach*. Cap. 12, 223-245. Ed: Levett, P.N. Oxford Press. N.York.

10. Kepner, R.L.; Pratt, J.R. (1994). *Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present*. Microbiol. Rev., 58 (4), 603-615.

11. 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.

AGUAS LIMPIAS CON DEPÓSITOS ACONTAN

Innovación en la construcción de depósitos prefabricados para depuración y agua potable

ACONTANK[®]
depósitos

STAND A-12

PABELLÓN 7 - MONJUIC. I