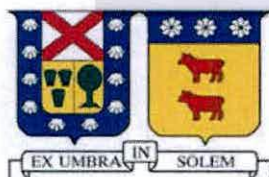




PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO



**Doctorado en Biotecnología (Chile)**

**Doctorado en Ingeniería Química y Ambiental (España)**

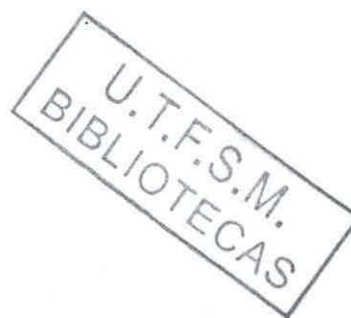
**Estudio del comportamiento de reactores anaerobios  
de tipo ASBR frente a compuestos de difícil  
degradación y/o efectores negativos**

---

**Nombre: Francisca Rosenkranz Fernández**

**Profesores: Rolando Chamy Maggi**

**Juan Manuel Lema Rodicio**



**Septiembre de 2013**

## RESUMEN

El siguiente documento corresponde a una tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología y Doctor en Ingeniería Química y Ambiental. La propuesta está referida a una investigación sobre el “Estudio del comportamiento operacional y poblacional de reactores anaerobios de tipo ASBR para el tratamiento de un agua residual con presencia de un compuesto de difícil degradación y/o efectores negativos”. Esta investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de la Universidad de Santiago de Compostela.

Una alternativa interesante de tratamiento de aguas residuales corresponde a la digestión anaerobia, debido a que presenta una serie de ventajas que hacen atractivo su desarrollo, entre la que destaca la producción de biogás como fuente de energía. Entre las tecnologías disponibles en procesos de digestión anaerobia se encuentran los reactores de tipo ASBR (Anaerobic sequencing batch reactor), que se caracterizan por la gran flexibilidad de operación que presentan. Una aplicación interesante de estos reactores corresponde al tratamiento de compuestos de difícil degradación, compuestos que generan ciertas características inhibitorias a los microorganismos encargados de las diferentes etapas de la degradación de la materia orgánica durante la digestión anaerobia. Estudios previos realizados tratando fenol (Donoso *et al.*, 2009), demuestran una gran eficiencia de estos reactores para el tratamiento de aguas residuales que presentan compuestos con características inhibitorias.

Debido a que estos reactores pueden estar sometidos a diferentes perturbaciones como son presencia de compuestos inhibitorios (fenol) u otro efecto negativo, como la variación de algún parámetro operacional (temperatura), es atractivo estudiar, además de determinar las condiciones más adecuadas de operación, los cambios poblacionales ante estas diferentes perturbaciones para lograr una mayor estabilidad al proceso.

Esta investigación permitirá evaluar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana en lazo con el tipo de sustratos, las perturbaciones fisicoquímicas, asociado al rendimiento o comportamiento del reactor.

Se evaluó el rendimiento de un reactor ASBR ante la disminución de temperatura en periodos cortos de operación con respecto al tiempo de ciclo y estructura de la comunidad arqueas. Se consideraron cuatro temperaturas: 37, 31, 25 y 20 °C.

Con el fin de mantener similares eficiencias de eliminación, la duración de la etapa de reacción tuvo que ser aumentada de 24 h a 37°C hasta 48, 72 y 96 h cuando la temperatura se redujo a 31, 25 y 20°C, respectivamente. La disminución de temperatura dio como resultado una disminución de la tasa de producción de biogás, un aumento de la acumulación de ácido propiónico y una reducción de porcentaje de eliminación de materia orgánica. Se observó que la tasa de degradación fue más rápida durante las primeras 2-3 h de funcionamiento a las cuatro diferentes temperaturas, con valores de 1.18 g DQO·g SSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> a 37 °C y a 0.77, 0.54 y 0.50 g DQO·g SVV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> a 31, 25 y 20 °C, respectivamente.

Los resultados experimentales fueron ajustados de acuerdo al modelo ADM2 en dos etapas (acidogénesis y metanogéniesis). Se calcularon las tasas de crecimiento máximas y las constantes de afinidad de la biomasa acidogénica y metanogénica ( $\mu M_1$ ,  $\mu M_2$ ,  $KS_1$ ,  $KS_2$  respectivamente). A los 37, 31 y 25°C, el modelo describió adecuadamente el perfil de las variables más relevantes (concentración de sustrato, la producción de biogás y el pH). Sin embargo, a 20°C, el modelo no fue capaz de reproducir la producción de biogás. A esa temperatura, el flujo de biogás producido era muy bajo y muy probablemente la exactitud del medidor de flujo no era suficiente.

Los perfiles de comunidades de archaeas fueron determinados por DGGE. La mayor diversidad se observó a 37°C, con un índice de Shannon de  $2,96 \pm 0,02$ . Cuando la temperatura se redujo a 25°C, la diversidad de archaeas se redujo drásticamente ( $2,30 \pm 0,01$ ). Los microorganismos hidrogenotróficos fueron más afectados que acetoclasticos debido al equilibrio (solubilidad de H<sub>2</sub>), cinética (tiempo de retención

hidráulica) y los efectos de funcionamiento (concentración de ácidos grasos volátiles).

Otro de los objetivos fue evaluar el comportamiento del reactor ASBR ante la presencia de un compuesto inhibitorio como fenol. El fenol es un contaminante común de aguas residuales de diversos procesos industriales, incluidas las refinerías petroquímicas y de producción de compuestos químicos. Debido a su toxicidad para la actividad microbiana, puede afectar a la eficiencia de los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales. En ésta investigación se estudio la eficiencia de un reactor (ASBR) alimentado con concentraciones crecientes de fenol ( $120$  a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y se determinó la relación entre la capacidad de degradación de fenol y la estructura de la comunidad microbiana. Hasta una concentración de alimentación de  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , la velocidad de degradación inicial fue aumentando constantemente con la concentración de fenol (hasta  $180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y la capacidad de eliminación se mantuvo relativamente constante alrededor de  $27 \text{ mg de fenol eliminado}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . La operación en concentraciones más altas ( $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dio lugar a un proceso eficiente, pero más lento: la capacidad de eliminación y la velocidad de degradación inicial disminuyó a  $11 \text{ mg de fenol eliminado}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  y  $154 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , respectivamente. Además es importante destacar que un modelo con una ecuación de tipo sigmoideal, es capaz de reproducir adecuadamente la desaparición de fenol y el tiempo de retardo de inicio de degradación de éste compuesto.

Según lo revelado por el análisis de DGGE, el aumento de la concentración de fenol indujo modificaciones estructurales dependientes del nivel de la composición de la comunidad, que sugiere un proceso de adaptación. El aumento de la concentración de fenol  $120$ - $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  tuvo un menor efecto sobre la estructura de la comunidad, mientras que se observaron drásticos cambios estructurales cuando se aumentó la concentración desde  $800$  a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , incluyendo el enriquecimiento de las especies bacterianas más tolerantes. Los umbrales de las alteraciones estructurales y funcionales fueron similares, lo que sugiere una correlación entre el rendimiento de degradación y estructura de la comunidad. El Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) confirmó que el rendimiento funcional ASBR se debe esencialmente a las características específicas de la comunidad. A mayor concentración, los

ribotipos mas abundantes y probablemente involucrados en el éxito la degradación de fenol a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , fue afiliado a la familia *Anaerolineaceae*.

## AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que han sido parte de este proceso, que es difícil demostrarles en tan pocas palabras lo importante que son.

Primero que todo, quiero dedicarle este logro a mi Padre, por ser mi fuerza impulsora a lo largo de mi vida. A pesar de que no estés físicamente aquí, te siento más presente que nunca. Gracias por luchar tanto por Maca y por mí, por hacer esto posible, por ser un ejemplo de padre y por amarnos tanto.

A mi Madre, por su apoyo y preocupación, por confiar siempre que esto sería posible.

Macarena, por ser mi sustento, mi complemento. Esto es un logro de las dos, eres parte fundamental en todo esto. Gracias por el apoyo, paciencia y tu incondicionalidad.

No puedo dejar de mencionar a mis demás hermanos Carlos, Pablo, María Isabel y Christian por todo su cariño y preocupación.

Le doy gracias a mis profesores, Rolando Chamy, por confiar tanto en mí, por no ser solo un profesor, sino que un ejemplo a seguir a quien estimo y admiro mucho.

A Juan Lema, le agradezco por su gran acogida en el Biogrup en España, gracias por el apoyo que siempre me brindó, incluso a distancia, por su paciencia y gran enseñanza.

Gonzalo Ruiz, gracias por el impulso a atreverme a ir dos años a Europa, por mostrarme su enseñanza de vida y ser un amigo.

Gracias a Marta Carballa, Lea Cabrol y Andrés Donoso, de quienes aprendí mucho, fueron parte muy importante en este trabajo. Es una suerte que estuvieran presentes en mi camino, soy una privilegiada.

También agradezco a Pablo Araya por ser parte importante en esta etapa.

<b>CAPITULO 4: IMPORTANCIA DE LA DISMINUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN EL COMPORTAMIENTO DE REACTORES ASBR .....</b>	<b>44</b>
4.1 ANTECEDENTES.....	45
4.1.1 Importancia de la temperatura en sistemas anaerobios y en la ecología microbiana.....	45
4.1.2 Efecto de variaciones de temperatura en digestión anaerobia .....	49
4.1.3 Efecto de la temperatura en reactor ASBR.....	51
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	54
4.2.1 Montaje Experimental.....	54
4.2.2 Procedimiento Experimental .....	55
4.2.3 Inóculo y Sustrato .....	56
4.2.4 Metodología analítica .....	57
4.2.5 Determinación de parámetros cinéticos .....	59
4.3 RESULTADOS .....	60
4.3.1 Consumo de materia orgánica (DQOs).....	60
4.3.2 Ácidos Grasos Volátiles.....	62
4.3.3 Evolución del pH .....	68
4.3.4 Producción de biogás.....	70
4.3.5 Cambio de la estructura de la diversidad de archaeas.....	72
4.3.6 Retorno a la temperatura óptima de digestión anaerobia de 37° C .....	74
4.3.7 Determinación de parámetros cinéticos .....	75
4.4 CONCLUSIÓN.....	80
4.5 REFERENCIAS.....	81
<b>CAPITULO 5: INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE FENOL EN EL FUNCIONAMIENTO DE UN REACTOR ASBR .....</b>	<b>87</b>
5.1 ANTECEDENTES.....	88
5.1.1 Compuestos inhibitorios para el proceso de digestión anaerobia .....	88
5.1.2 Fenol .....	88
5.1.3 Propiedades químicas y físicas .....	89
5.1.4 Presencia en aguas residuales industriales y sistemas de eliminación .....	89

5.1.5 Mecanismos de degradación de fenol mediante microorganismos .....	94
5.1.6 Antecedentes de degradación anaerobia de fenol .....	100
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	107
5.2.1 Ensayos de biodegradabilidad anaerobia de fenol en botellas.....	108
5.2.2 Ensayos en reactor ASBR de degradación anaerobia de fenol.....	111
5.2.3 Metodología Analítica .....	114
5.2.4 Ajuste de datos a Modelo Matemático .....	115
5.3 RESULTADOS .....	117
5.3.1 Degradación anaerobia de fenol en botellas.....	117
5.3.2 Degradación anaerobia de fenol en reactor ASBR .....	133
5.3.2 Ajuste de datos a modelo matemático.....	145
5.4 CONCLUSION.....	148
5.5 REFERENCIAS.....	150
<b>CAPITULO 6: DINÁMICA DE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EN ENSAYOS DE DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE FENOL.....</b>	<b>156</b>
6.1 ANTECEDENTES.....	157
6.1.1 Métodos y Técnicas Moleculares .....	157
6.1.2 Microorganismos encargados de la degradación anaerobia de fenol ....	160
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	165
6.2.1 Procedimiento y montaje Experimental.....	165
6.2.2 Metodología análisis molecular.....	166
6.3 RESULTADOS .....	169
6.3.1 Ensayos en Botellas .....	169
6.3.2 Ensayos en reactor ASBR .....	171
<b>CAPITULO 7: CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>187</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>191</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Etapas de proceso de digestión anaerobia (Appels <i>et al.</i> , 2008).....	7
Figura 2.2: Etapas de operación de un reactor de tipo ASBR (1) alimentación, (2) reacción, (3) sedimentación (4) descarga. ....	13
Figura 2.3: Comparación de la productividad de un sistema continuo y uno por lotes secuenciales. Lotes (– –) continuo ( ). La zona achurada representa la ganancia de productividad de un sistema por lotes por sobre un continuo (Donoso-Bravo, 2008). ....	15
Figura 3.1: Esquema general de estudios de comportamiento de reactores de tipo ASBR. ....	29
Figura 3.2: Proceso de extracción de ADN, amplificación por PCR y observación de los productos mediante electroforesis en gradiente (DGGE). ....	39
Figura 4.1: Tasa de crecimiento relativo de microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos. ....	46
Figure 4.2: Montaje experimental usado para el estudio de comportamiento de reactor ASBR al disminuir la temperatura (37°C, 31°C, 25°C y 20°C).....	55
Figura 4.3: Esquema del procedimiento experimental. ....	56
Figura 4.4: Cinética de consumo de materia orgánica operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37°C (○) 31°C (□), 25°C (▲), 20°C (×)).El gráfico superior representa un zoom de las primeras 5 horas del ciclo. ....	61
Figura 4.5: Concentración de AGVs operando en estado estacionario a 37°C (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■))......	63
Figura 4.6: Concentración de AGVs operando en estado estacionario a 31°C (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■))......	64
Figura 4.7: Concentración de AGVs operando en estado estacionario a 25°C, (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■))......	64
Figura 4.8: Concentración de AGV operando en estado estacionario a 20°C (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■), i-butírico (▲) y de ácido valérico (×))......	65

Figura 4.9: Relación concentración propiónico: acético operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37°C (○), 31°C (□), 25°C (▲), y 20°C (×)). La línea indica el valor límite de 1.....	67
Figura 4.10: pH operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37°C (○), 31°C (□), 25°C (▲), 20°C (×)).....	69
Figura 4.11: Caudal de biogás operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37°C (○); 31°C (□), 25°C (▲), 20°C (×)). .....	71
Figura 4.12: Biogás acumulado a las diferentes temperaturas (37°C (○), 31°C (□), 25°C (▲), 20°C (×)).....	72
Figura 4.13: Perfiles de DGGE de la población archaeas operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37, 31 y 25° C). Las muestras duplicadas se distinguen por el número 1 o 2 junto a la temperatura en el nombre de la muestra. Las muestras son ordenadas de acuerdo a su similitud pairwise (coeficiente de Jaccard) y el orden está representado por dendograma UPGMA. ....	73
Figura 4.14: Producción de biogás a diferentes ciclos al cambiar la temperatura de 20 a 37°C (indicada por la flecha).....	75
Figura 4.15: Ajuste de datos de producción de biogás (○), glucosa (□) y pH (Δ) a 37°C (A), 31°C (B), 25°C (C) y 20°C (D). .....	77
Figura 5.1: Vía de degradación de fenol a temperaturas mesofílicas (Fezzani <i>et al.</i> , 2009) .....	95
Figura 5.2: Propuesta de vía de degradación de fenol, basado en resultados preliminares de transformación de fenol a benzoato y acetato en botellas-modificadas con BES. El fenol es inicialmente reducido, formando benzoyl CoA, desde 4-Hidroxybenzoil-CoA. En la etapa de reducción son consumidos 6 [H]. Un tercio de 4 hidroxybenzoyl CoA es oxidado a acetato durante la formación de 6 [H]. El 4-Hidroxybenzoil-CoA remanente es convertido a benzoato (Karlsson <i>et al.</i> , 1999). .....	96
Figura 5.3: Degradación de fenol vía ciclohexanona (Fang <i>et al.</i> , 2006).....	97
Figura 5.4: Vía de degradación de fenol (Barrios <i>et al.</i> , 2006).....	99
Figura 5.5: Esquema general de ensayos de degradación anaerobia de fenol.....	107
Figura 5.6: Fotografía de ensayo en botellas de degradación anaerobia de fenol....	108

Figura 5.7: Configuración de reactores ASBR, para la degradación anaerobia de diferentes concentraciones de fenol. ....112

Figura 5.8: Metano acumulado en ensayos sin adición de sustrato (blanco) de degradación anaerobia de fenol utilizando biomasa de planta de tratamiento de una industria cervecera. Blanco de ensayo de primera adición de fenol (■); segunda adición de fenol (○). ....118

Figura 5.9: Concentración de materia orgánica en el blanco en de ensayo de degradación anaerobia de fenol utilizando biomasa proveniente de planta de tratamiento de tratamiento de una industria procesadora de tabaco. Blanco de ensayo de primera adición de fenol (○); segunda adición de fenol (■).....120

Figura 5.10: Velocidad específica de degradación de fenol, utilizando inóculos de diferente origen, al aplicar adiciones sucesivas de fenol.....121

Figura 5.11: Velocidad específica de degradación de fenol de distintos tipos de inóculos, utilizando glucosa como co-sustrato. ....122

Figura 5.12: Metano acumulado, concentración de fenol y DQOs en ensayo de adiciones sucesivas de 200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol. Inóculo planta de tratamiento de cerveza. ....124

Figura 5.13: Concentración de fenol y DQOs en ensayo de adiciones sucesivas de 200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol, utilizando un inóculo de una planta de tratamiento de una industria de tabaco.....127

Figura 5.14: Concentración de fenol (A) pH (•) y alcalinidad (Δ) (B) en periodo de aclimatación de la biomasa (120-240 mg·L<sup>-1</sup> de fenol) en reactor ASBR. ....134

Figura 5.15: Concentración de fenol durante los diferentes ciclos de operación a diferentes concentraciones iniciales (120, 240, 500, 800 y 1200 mg·L<sup>-1</sup>). ....135

Figura 5.16: VCO (■) y tiempo de reacción (Δ) en el último ciclo de operación a diferentes concentraciones de fenol (120, 240, 500, 800 and 1200 mg phenol·L<sup>-1</sup>) en reactor ASBR. La línea punteada representa la VCO promedio.....136

Figura 5.17: Concentración de fenol durante el último ciclo de operación, en ensayo de degradación anaerobia de 120, 240, 500, 800 y 1200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol. ....139

Figura 5.18: Efecto del aumento de la concentración de fenol en la velocidad inicial y promedio de degradación en un reactor ASBR. Velocidad inicial de degradación (○);

velocidad promedio de degradación (■). La línea punteada representa el promedio de las velocidades. ....	141
Figura 5.19: Ajuste de datos de degradación anaerobia de fenol. Simulación ( ); datos experimentales (○), a 120, 240 500, 800 y 1200 mg·L <sup>-1</sup> de fenol.....	146
Figura 6.1: Esquema general de ensayos de relación de parámetros ambientales de degradación anaerobia de fenol, obtenidos de ensayos en botellas y reactor ASBR. ....	165
Figura 6.2: Análisis de Componentes Principales (PCA) de perfiles de DGGE de ensayos en batch (botellas). El tamaño del símbolo es proporcional a la velocidad de degradación de fenol. El sustrato es indicado por P (solo Fenol) o P+G (Fenol+Glucosa). 1-2-3: número de adiciones de fenol. R: replica de ensayos; NC: control negativo. ....	170
Figura 6.3: Dendograma UPGMA de los perfiles de DGGE de las muestras del reactor ASBR basado en el análisis de similaridad Bray Curtis. El número indica la concentración de entrada de fenol (medida) al comienzo de cada ciclo de operación. ....	172
Figure 6.4: Análisis de correspondencia canónica (CCA) de las comunidades microbianas generada por análisis 16S-DGGE a partir de 11 muestras de comunidades presentes en un ASBR (círculos). El tamaño de los círculos es proporcional a la concentración de fenol en el reactor. Los números indican el día de operación en que fue tomada la muestra, y el periodo de prueba se indica en paréntesis (como en la Figura 6.3). El eje primario y secundario representan el 40.9% y el 37.6% del total de la varianza. Las variables ambientales seleccionadas (flechas) explican el 59% de la inercia de los datos de DGGE establecidos. Entre todas las variables individuales (bandas DGGE), están representados sólo las cortadas y secuenciadas (símbolos de diamantes y la letras (como en la Figura 6.3)). ....	174

## INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Principales diferencias entre sistemas de tratamiento anaerobio y aerobios (Tauseef <i>et al.</i> , 2013).....	8
Tabla 2.2: Clasificación de reactores anaerobios de acuerdo al tipo de biomasa. ....	9
Tabla 2.3 (a): Algunas aplicaciones de reactores ASBR para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales.....	16
Tabla 2.3 (b): Algunas aplicaciones de reactores ASBR para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales.....	17
Tabla 2.3 (c): Algunas aplicaciones de reactores ASBR para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales.....	18
Tabla 3.1: Contenido del Kit <i>PowerSoil</i> DNA Isolation para la extracción y purificación del ADN.....	40
Tabla 4.1: Producción de metano a diferentes rangos de temperatura, en tratamiento de aguas municipales (Gerardi, 2003). ....	47
Tabla 4.2: Reacciones consideradas en el sistema anaerobio (Stams, 1994). ....	49
Tabla 4.3: VCO aplicada a reactor ASBR a diferentes temperaturas de operación. ..	62
Tabla 4.4: Velocidades específicas de acumulación de ácido acético y propiónico a 37, 31, 25 y 20°C.....	66
Tabla 4.5: Parámetros cinéticos aplicados a la simulación a 37, 31 and 25°C.....	78
Tabla 5.1: Propiedades físicas y químicas de fenol (Busca <i>et al.</i> , 2008) .....	89
Tabla 5.2 (a): Características de diferentes tipos de aguas residuales que poseen fenol (Veeresh <i>et al.</i> , 2005).....	91
Tabla 5.2 (b): Características de diferentes tipos de aguas residuales que poseen fenol (Veeresh <i>et al.</i> , 2005).....	92
Tabla 5.3 (a): Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh <i>et al.</i> , 2005). ....	101

Tabla 5.3 (b): Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh <i>et al.</i> , 2005).	102
Tabla 5.3 (c): Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh <i>et al.</i> , 2005).	103
Tabla 5.3 (d): Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh <i>et al.</i> , 2005).	104
Tabla 5.3 (e): Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh <i>et al.</i> , 2005).	105
Tabla 5.4: Características de las botellas preparadas para el estudio de la degradación anaerobia de fenol, ante la presencia de glucosa.	110
Tabla 5.5: Características de las botellas preparadas para el estudio adaptaptación de fenol (adiciones sucesivas).	111
Tabla 5.6: Fases y periodos de operación de reactor ASBR en ensayos de degradación anaerobia de fenol.	114
Tabla: 5.7: Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de degradación anaerobia de fenol en botellas con biomasa de planta de tratamiento de industria cervecera y tabaco.	129
Tabla 5.8: Velocidades de degradación de fenol a diferentes concentraciones aplicadas en el reactor ASBR.	140
Tabla 5.9: Parámetros cinéticos de la simulación de degradación anaerobia de diferentes concentraciones de fenol	147
Tabla 6.1: Ventajas y desventajas de Técnica molecular DGGE (Sanz <i>et al.</i> , 2007).	158
Tabla 6.2 (a): Aplicaciones de DGGE en tratamientos de tipo anaerobio (Sanz <i>et al.</i> , 2007)	158
Tabla 6.2 (b): Aplicaciones de DGGE en tratamientos de tipo anaerobio (Sanz <i>et al.</i> , 2007)	159
Tabla 6.3: Poblaciones importantes presentes en siete diferentes consorcios metanogénicos en degradación de fenol (Levén <i>et al.</i> , 2012).	162
Tabla 6.4: Bacterias degradadoras de fenol, aisladas de ambientes metanogénicos (Levén <i>et al.</i> , 2012)	163

Tabla 6.5 (a): Afiliación BLAST de las secuencias de las cinco bandas dominantes extirpados de los perfiles de DGGE correspondientes a la más alta concentración de fenol (período V), como se indica en la Figura 6.3.....175

Tabla 6.5 (b): Afiliación BLAST de las secuencias de las cinco bandas dominantes extirpados de los perfiles de DGGE correspondientes a la más alta concentración de fenol (período V), como se indica en la Figura 6.3.....176

## **CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 1.1 INTRODUCCIÓN .

Una alternativa interesante de tratamiento de aguas residuales corresponde a la digestión anaerobia, debido a que presenta una serie de ventajas que hacen atractivo su desarrollo, entre la que destaca la producción de biogás como fuente de energía (Muha *et al.*, 2013). Entre las tecnologías disponibles en procesos de digestión anaerobia se encuentran los reactores de tipo ASBR, que se caracterizan por una gran flexibilidad de operación y ventajas fundamentalmente cinéticas. Debido a esta última ventaja, una aplicación interesante de estos reactores podría corresponder al tratamiento de compuestos de difícil degradación o compuestos que generan ciertas características inhibitorias a los microorganismos encargados de las diferentes etapas de la degradación de la materia orgánica durante la digestión anaerobia. Estudios previos realizados tratando fenol demuestran una gran eficiencia de estos reactores para el tratamiento de aguas residuales que presentan compuestos con características inhibitorias (Donoso-Bravo *et al.*, 2009).

Debido a que estos reactores pueden estar sometidos diferentes perturbaciones como son presencia de compuestos inhibitorios (fenol, p-cresol, pentaclorofenol), u otro efecto negativo, como la variación de algún parámetro operacional (temperatura o pH), es atractivo estudiar, además de determinar las condiciones más adecuadas de operación, los cambios de la comunidades microbianas ante éstas diferentes condiciones para lograr una mayor estabilidad al proceso de degradación. El análisis microbiológico se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas moleculares como DGGE (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización), permitiéndonos obtener información de las distintas comunidades presentes durante las diferentes condiciones estudiadas.

Esta investigación permitirá determinar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana en lazo con el tipo de sustratos, las perturbaciones fisicoquímicas, asociado al rendimiento o comportamiento del reactor. Esto es importante para contribuir a un funcionamiento estable del ecosistema presente.

## **1.2 HIPOTESIS**

Dadas las ventajas fundamentalmente cinéticas que presentan los reactores ASBR es posible obtener las condiciones que permitan tratar las aguas residuales que presenten efectores negativos ya sea física ( $T^\circ$ ), inhibidor y/o compuestos de difícil degradación, con un rendimiento y productividad mayor que con un reactor tradicional.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el comportamiento operacional y poblacional de reactores anaerobios de tipo ASBR frente compuestos de difícil degradación y/o efectores negativos.

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar el comportamiento de reactores ASBR, ante variaciones de temperatura.

Estimar los parámetros operacionales para el tratamiento de compuestos inhibitorios, tipo fenol, mediante reactores anaerobios de tipo ASBR.

Evaluar la dinámica de las comunidades microbianas encargadas de la degradación de materia orgánica ante diferentes perturbaciones en reactores anaerobios de tipo ASBR.

Disponer de un modelo validado que permita predecir el comportamiento de reactores ASBR asociado a las distintas perturbaciones.

## **CAPITULO 2: ANTECEDENTES**

## 2.1 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS: DIGESTIÓN ANAEROBIA

Durante el último siglo, el crecimiento constante de la población y la industrialización han provocado la degradación de diversos ecosistemas en los que se basa la vida humana. En el caso de los océanos y la calidad de los ríos, este tipo de contaminación es causada principalmente por el vertido de aguas residuales industriales y municipales inadecuadamente tratados (Chan *et al.*, 2009).

Los tratamientos biológicos surgen como una gran alternativa para la estabilización de los residuos generados. Las tecnologías convencionales aerobias, sobre la base de lodos activados son aplicadas predominantemente para el tratamiento de aguas residuales debido a la posibilidad de eliminación de nutrientes y la alta eficiencia operacional (Gavrilescu *et al.*, 1999). Sin embargo, el alto capital requerido y los costos operacionales presentan limitaciones financieras en la aplicación de estas tecnologías para el tratamiento de aguas residuales especialmente en los países de bajos ingresos (Kassab *et al.*, 2010).

En todos los sistemas de tratamiento de residuos, la descomposición ocurre aeróbica o anaeróbicamente, donde cada una de las rutas tiene alguna característica distintiva que se busca optimizar en los procesos de tratamiento (Tauseef *et al.*, 2013). En condiciones aeróbicas, el aceptor final de electrones es el oxígeno disuelto libre. Para cada unidad de masa de sustrato, que se mide como demanda biológica de oxígeno (DBO), donde aproximadamente el 70% se utiliza para el crecimiento celular y el 30% para fines energéticos (Haandel *et al.*, 2012). Bajo condiciones anaeróbicas, la degradación se desarrolla en ausencia de oxígeno y el medio ambiente es reductor en contraste con el estado de oxidación de las condiciones aeróbicas. Bajo condiciones anaeróbicas, los átomos de carbono asociados con algunos de los compuestos orgánicos convertidos son aceptores de electrones y se reducen, mientras que otros compuestos orgánicos se oxidan a dióxido de carbono y ácidos volátiles. Esta reacción resulta en productos finales que contienen grandes cantidades de energía (es decir, el potencial de aceptar electrones) en forma de metano (Tauseef *et al.*, 2013).

La digestión anaerobia, tiene como principal producto biogás, que como se mencionó anteriormente, contiene mayormente metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y minoritariamente compuestos inorgánicos ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}$ , entre otros) (Chan *et al.*, 2007).

La transformación de la materia orgánica en los productos finales de la digestión anaerobia se desarrolla predominantemente a través de las etapas que se describen a continuación:

**Hidrolítica:** Esta etapa consiste en el rompimiento enzimático de compuestos de alto peso molecular, como polímeros y lípidos, que pueden servir como fuente de energía y carbono a los microorganismos, al ser transformados en monosacáridos, ácidos grasos y aminoácidos, entre otros. La hidrólisis es considerada una etapa de limitante de la velocidad del proceso de digestión anaerobia, especialmente durante el tratamiento de residuos sólidos (Ghyoot *et al.*, 1997).

**Acidogénica:** Corresponde a la etapa en la cual las bacterias se encargan de transformar los compuestos obtenidos en la etapa anterior (hidrolítica) en compuestos identificables de menor peso molecular, principalmente ácidos orgánicos, como: acético, propiónico y butírico (Gali *et al.*, 2009). Las bacterias asociadas a este proceso se denominan acidogénicas, y son de tipo facultativas y anaerobias estrictas; colectivamente se denominan "bacterias formadoras de ácidos".

**Acetogénica:** En la tercera etapa, conocida como acetogénesis, el resto de los productos acidogénicos, es decir, el ácido propiónico, ácido butírico y alcoholes son transformados por las bacterias acetogénicas en dióxido de carbono e hidrógeno, y ácido acético. El hidrógeno juega un papel de intermediario importante en este proceso, ya que la reacción sólo se produce si la presión parcial de hidrógeno es lo suficientemente baja como para permitir que termodinámicamente la conversión de todos los ácidos. Tal disminución de la presión parcial se lleva a cabo por bacterias eliminadoras de hidrógeno (Mata-Álvarez, 2003).

**Metanogénica:** Esta etapa se caracteriza por la conversión de los ácidos generados en la etapa de acidogénesis, en compuestos finales simples, mayoritariamente

metano y dióxido de carbono. La producción de metano es realizada por dos grupos de archaeas: metanógenos acetoclásticos, grupo que utiliza acetato para producir metano y dióxido de carbono; y metanógenos hidrogenotróficos grupo que utiliza hidrógeno como donante de electrones y dióxido de carbono como aceptor para producir metano (Appels *et al.*, 2008). Los microorganismos encargados de esta transformación son anaerobios estrictos entre los que destaca *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanococcus* y *Methanosarcina*.

En la Figura 2.1, se presenta un esquema de los distintos pasos del proceso de digestión anaerobia.

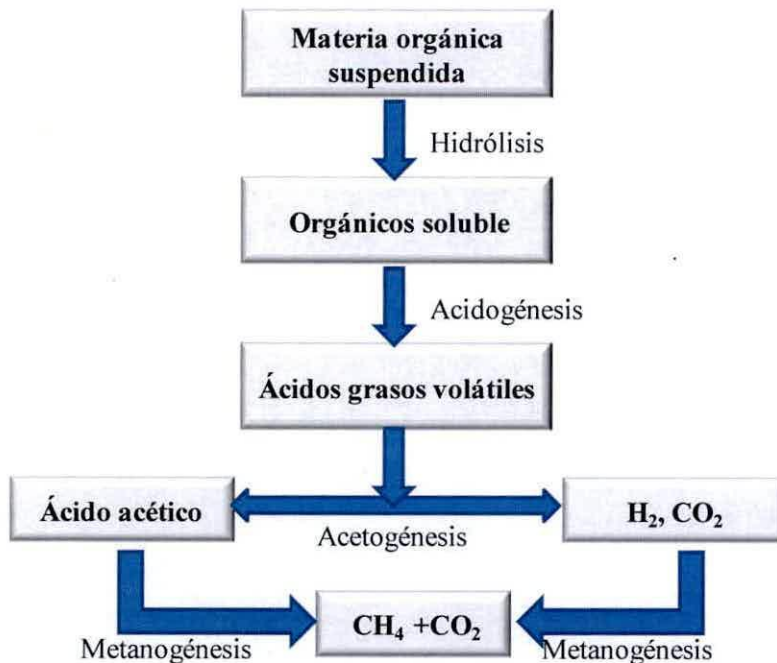


Figura 2.1: Etapas de proceso de digestión anaerobia (Appels *et al.*, 2008)

El tratamiento anaerobio ha despertado gran interés en las últimas décadas. Este fenómeno puede atribuirse principalmente a dos factores, a) al reconocimiento de las ventajas de los procesos anaerobios, y b) Mayor entendimiento de la bioquímica y microbiología anaerobia junto con los avances de la ingeniería de procesos (Sarti *et*

*al.*, 2007). Otro factor que debe ser considerado corresponde al aumento del consumo de combustible, que despierta interés en el biogás.

Las principales diferencias que presenta este tipo de tratamiento con un sistema aerobio se presentan en la Tabla 2.1

**Tabla 2.1:** Principales diferencias entre sistemas de tratamiento anaerobio y aerobios (Tauseef *et al.*, 2013).

Aspecto	Anaerobio	Aerobio
Requerimientos energéticos	Bajo	Muy alto
Medida de carga orgánica posible	Alta a muy baja	Moderada a muy baja
Grado de tratamiento	Alto (> 90%)	(> 95%)
Producción de lodo	Muy bajo	Muy alto
Estabilidad del proceso (compuestos tóxicos y cambios de carga)	Bueno	Bueno
Puesta en marcha	2-4 semanas	2-4 semanas
Requerimiento de nutrientes	5 veces menor que los procesos aerobios	Alto, 5 veces mayor para ciertos residuos industriales
Producción de energía	Si	No
Recuperación de nutrientes	Posible	No es posible

De acuerdo a las diferencias presentadas en la Tabla 2.1, las principales ventajas que hacen que la digestión anaerobia sea considerada como una tecnología consolidada, son las siguientes (Demirel *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006):

- No requiere de sistemas de aireación.
- Generación de pequeñas cantidades de lodo estabilizado, reduciendo así el transporte, eliminación o los costos de tratamiento.

- Producción de biogás como producto final y de hidrógeno como producto intermedio, los cuales pueden ser explotados como una fuente de energía renovable.

Como todos los procesos, la digestión anaerobia puede presentar algunas desventajas, como: una lenta tasa de crecimiento de microorganismos anaerobios, que pueden dar lugar a problemas en el sistema si se produce una gran pérdida de los microorganismos (sólidos biológicos) en el efluente (Udeme *et al.*, 1997). Sin embargo, la lenta tasa de crecimiento se debe mayoritariamente a que la fuente de carbono está destinada hacia la producción de biogás, obteniéndose así, menores producciones de lodo en comparación con el tratamiento aerobio. Otro aspecto que debe ser considerado, es que la temperatura más adecuada para el desarrollo del proceso anaerobio es de 35-37°C, lo que puede requerir de una fuente de calor externa. Sin embargo esto puede ser compensado por utilización del biogás producido (Udeme *et al.*, 1997).

## 2.2 TECNOLOGÍAS ANEROBIAS

En cuanto a las tecnologías anaerobias disponibles, una de las características que permite hacer diferentes distinciones tanto en los reactores anaerobios como aerobios, es la posibilidad de que la biomasa se pueda encontrar fija o suspendida al interior del reactor. De acuerdo a esta característica, en la Tabla 2.2 se presentan los distintos tipos de reactores anaerobios existentes (Chamy *et al.*, 2003).

**Tabla 2.2:** Clasificación de reactores anaerobios de acuerdo al tipo de biomasa.

Biomasa suspendida	Biomasa Fija	Biomasa autoinmovilizada
Por lotes	Filtro anaerobio	UASB
RCTA	Lecho expandido	EGSB
Contacto	Lecho fluidizado	

En la mayoría de las tecnologías anaerobias que se encontraban disponibles, el tiempo de residencia de sólidos (TRS) se corresponde con el tiempo de residencia

hidráulico (TRH). Sin embargo, las cinéticas de degradación microbiana de los distintos sustratos orgánicos sugieren altas y bajas tasas de degradación, debido a que durante la degradación anaerobia, la población mixta, consume rápidamente los compuestos fácilmente biodegradables y más lentamente la materia orgánica recalcitrante (Ndegwa *et al.*, 2008). Es por este motivo fundamentalmente de aumentar la biomasa y permitir el crecimiento de microorganismos con bajas velocidades de crecimiento, que para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales es necesaria la implementación de reactores donde se separe el TRS y el TRH. Como se mostró anteriormente en la Tabla 2.3, uno de los reactores que cumplen con esta característica corresponde al reactor UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) y EGSB (Expanded granular sludge blanket (EGSB), los cuales presentan una gran trayectoria para el tratamiento de aguas residuales (Seghezzo *et al.*, 1998). Además se encuentran reactores de biopelícula, biofiltros anaeróbicos, los cuales presentan distintos grados de éxito en cuanto al tratamiento (Ndegwa *et al.*, 2008).

Los reactores de filtro anaerobio presentan el problema de taponamiento de los filtros por el crecimiento bacteriano suspendido, lo que es superado en gran medida por los reactores de tipo UASB, ya que la biomasa activa forma gránulos densos, altamente sedimentables (Abassi *et al.*, 2012), por lo que es posible alcanzar una mayor concentración de biomasa activa por unidad de volumen de trabajo en este tipo de digestores a diferencia del filtro anaerobio.

Los reactores UASB pueden manejar mayores tasas de carga de DQO y proporcionar un tratamiento adecuado a menor TRH. Sin embargo, la clave para un buen rendimiento de este tipo de reactores es la calidad de los gránulos (Durai *et al.*, 2011). Si bien, es fácil obtener un lodo granular con algunos sustratos como por ejemplo, azúcar de procesamiento de desechos y residuos que contengan principalmente ácidos volátiles, puede que existan algunos tipos de residuos que desarrollen gránulos más lentamente y otros no los desarrollen, por lo tanto, éste aspecto corresponde al reto principal para obtener éxito mediante esta tecnología anaerobia. La inoculación con una gran cantidad de lodo granular es favorable en muchos casos para un buen funcionamiento, pero a pesar de que los gránulos

conservan sus características la mayoría del tiempo con un determinado tipo de residuos, no necesariamente van a ser capaces de hacerlo al cambiar a otros tipo de sustrato (O'Flaherty *et al.*, 2006).

El reactor de tipo EGSB, es una tecnología desarrollada a partir del reactor de tipo UASB, con modificaciones de tipo hidrodinámicas (Rebac *et al.*, 1999) para tratar aguas residuales de baja resistencia soluble y con características de aguas complejas. Se basa en: (i) el uso exclusivo de lodo granular, (ii) el funcionamiento en condiciones de una ligera expansión del lecho, y, en particular, (iii) la expectativa de que su biofilms aumenta, en la medida que los gránulos se mantengan estables (Lettinga *et al.*, 2010). Debido a la mayor velocidad superficial aplicada en este tipo de reactores, no se produce de manera eficiente la hidrólisis de coloides y partículas gruesas en suspensión, por lo que su aplicación se limita al tratamiento de aguas residuales de esencialmente solubles (Tauseef *et al.*, 2013).

Los reactores de lecho fluidizado y expandido tuvieron lugar poco después de los UASB (Lettinga *et al.*, 2010), en el cual, la biomasa activa se cultiva en pequeñas partículas inertes como arena fina o alúmina. Estas partículas se mantienen en suspensión por un rápido flujo ascendente de las aguas residuales entrantes (van Haandel *et al.*, 2006). Mientras mayor sea la tasa de flujo, mayor es el grado de expansión del lecho de partículas. Sobre esta base, el reactor se denomina reactor de lecho fluidizado (425 a 300% de expansión) o un reactor de lecho expandido (15-25% de expansión). Este tipo de reactores han presentado un buen comportamiento pero tratando un tipo aguas residuales que contienen material en suspensión que es fácilmente biodegradable como el suero de leche, suero permeado, licor negro condensado, entre otros (Tauseef *et al.* 2013).

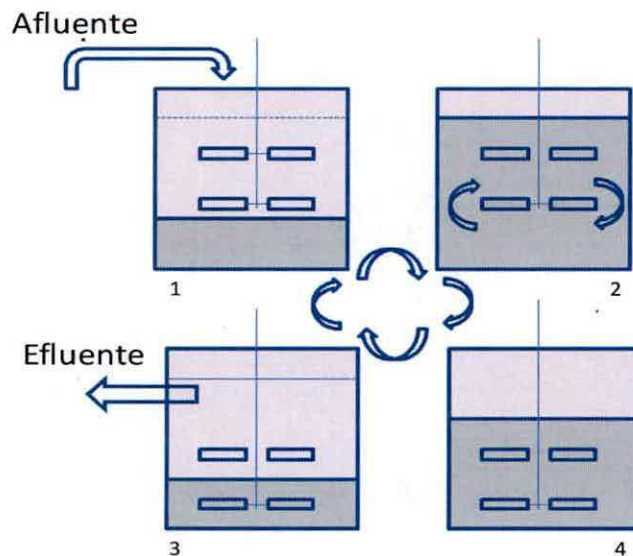
Una tecnología anaerobia corresponde al reactor anaerobio por lotes secuenciales ASBR, el cual aparece como una alternativa para los reactores de flujo continuo (Reyes *et al.*, 1995). Este tipo de reactores, presentan una serie de ventajas que hacen atractiva su utilización para el tratamiento de aguas residuales con distintas características como las que se presentan a continuación (Ma *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2011; Donoso-Bravo *et al.*, 2009 a):

- Adaptación de operación a diferentes estrategias de alimentación.
- Altos tiempos de residencia de sólidos.
- Permite tratar compuestos de difícil degradación y/o tóxicos.
- Mejor control de calidad de efluente, facilitado por el manejo de los tiempos de residencia hidráulico.
- ASBRs son conocidos por ser capaces de desacoplar el tiempo de reacción o de tratamiento del residuo líquido a tratar con el tiempo de residencia de sólidos (TRS), por una secuencia de funcionamiento correcto, ejerciendo presiones de selección para favorecer la retención de biomasa.

El potencial tecnológico por la cantidad de ventajas que presenta, la tecnología ASBR ha sido evaluada para el tratamiento de diferentes tipos de efluentes, incluyendo los generados por las industrias lácteas, industrias de colorantes y textil, cerveceras, fábricas de celulosa, industrias petroquímicas curtiembres, entre otras (Suresh *et al.*, 2011; Mohan *et al.*, 2005; Pasukphu *et al.*, 2002).

### **2.2.1 Reactores Anaerobios por lotes secuenciales ASBR**

Los reactores ASBR (anaerobic sequencing batch reactor) como su nombre lo indica, funcionan mediante lotes secuenciales y han sido estudiados como una alternativa de tratamiento a los sistemas continuos debido a la versatilidad de su operación. La operación típica de un reactor ASBR, originalmente fue propuesta por Dangué *et al.*, 1992, compuesta por cuatro etapas 1) alimentación, 2) reacción 3) sedimentación, 4) descarga, como se presenta en la Figura 2.2.



**Figura 2.2:** Etapas de operación de un reactor de tipo ASBR (1) alimentación, (2) reacción, (3) sedimentación (4) descarga.

Durante la alimentación, el agua residual a tratar con presencia de materia orgánica, es introducida al reactor en un periodo de tiempo relativamente corto. En la fase de reacción hay una variación en la concentración de los componentes constituyentes, mostrando picos de concentración de los compuestos intermedios y producción de biogás. Este paso es el más importante y puede corresponder hasta un 80% o más de la duración total del ciclo. (Dague *et al.*, 1992; Angenent y Dague, 1995; Ndon y Zaiat *et al.*, 2001).

La fase de sedimentación corresponde a la separación sólido-líquido la que es llevada a cabo en el interior del reactor, por lo que no se requiere de una unidad de separación adicional, dado que la utilización de biomasa granular en el reactor favorece el proceso de sedimentación. Cabe destacar, que las características de sedimentación de la biomasa utilizada son muy importantes para el correcto desarrollo de ésta etapa para evitar el lavado de la biomasa durante la descarga.

Debido a las características de las diferentes etapas involucradas en la operación de reactores de tipo ASBR, es importante mencionar algunos aspectos fundamentales

para un adecuado funcionamiento. Uno de ellos corresponde a las distintas estrategias de alimentación que pueden ser implementadas de acuerdo a los requerimientos del residuo a tratar. Se han implementado comúnmente dos estrategias que corresponden a alimentación por lote y por lote alimentado, ésta última implementada principalmente cuando se trata algún compuesto que presenta características inhibitorias a los microorganismos encargados de la degradación (Donoso-Bravo *et al.*, 2009). Otro aspecto operacional que es importante destacar corresponde al mecanismo de agitación. La importancia de la agitación se debe a que proporciona un adecuado contacto entre el sustrato y los microorganismos en la fase de reacción. Si bien, esto es un factor importante, una fuerte y excesiva agitación, puede causar daños en la biomasa granular disminuyendo la eficiencia de separación (Michelan *et al.*, 2009). Los caminos para producir este movimiento, en el caso de reactores de tipo ASBR, corresponde a la recirculación del flujo de biogás producido en el reactor (no aplicables para el tratamiento de aguas de baja carga por el poco biogás producido), recirculación de líquido o sistemas mecánicos de recirculación (Michelan *et al.*, 2009).

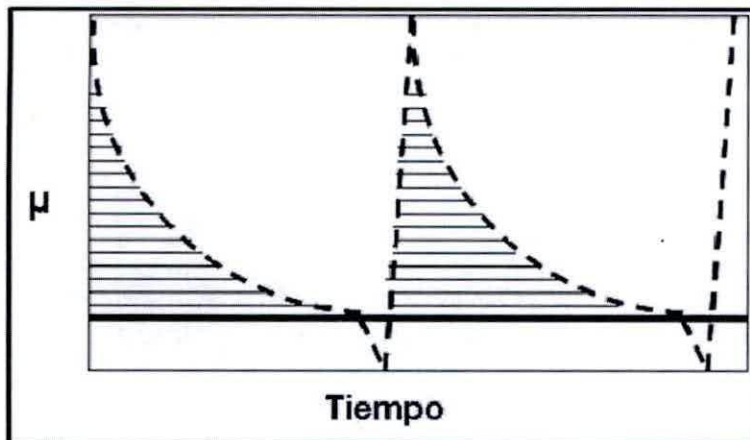
El tiempo de residencia hidráulico equivalente es otro factor a considerar y es proporcional a la duración de cada ciclo. Éste depende, a su vez, de las características del agua residual y de la carga orgánica a eliminar, entre otros aspectos.

Como se mencionó anteriormente, ésta tecnología anaerobia muestra una serie de ventajas para el tratamiento de efluentes procedentes de distintas actividades, pero además es interesante destacar una ventaja de tipo cinética que presenta con respecto a otras tecnologías, como por ejemplo sistemas de operación en continuo. Si consideramos una cinética de tipo Monod (saturación), al comienzo de la etapa de reacción se favorecerá la velocidad de reacción ya que la concentración de sustrato será la máxima, a diferencia de un reactor continuo donde siempre se trabaja con la concentración de sustrato de salida (valor bajo del orden de  $K_s$ ), que disminuye la velocidad del proceso. Esta ventaja cinética permite suponer que un ASBR puede alcanzar mayores productividades con sustratos diluidos de lenta biodegradación, como también para residuos sólidos donde de acuerdo a una cinética de primer

orden una mayor concentración de sustrato favorece la velocidad del proceso hidrolítico (Donoso-Bravo, 2008). Esto puede ser representado mediante la ecuación 2.1.

$$\int_0^t ASBR > \int_0^t CONTINUO \quad \text{Ec.2.1}$$

Gráficamente se puede describir como la velocidad de crecimiento versus el tiempo para una operación con 2 lotes consecutivos comparando con una operación continua (Figura 2.3).



**Figura 2.3:** Comparación de la productividad de un sistema continuo y uno por lotes secuenciales. Lotés (---) continuo (—). La zona achurada representa la ganancia de productividad de un sistema por lotes por sobre un continuo (Donoso-Bravo, 2008).

### 2.2.2 Aplicaciones de reactores ASBR

Los reactores de tipo ASBR han presentado una gran versatilidad para el tratamiento de distintos tipos de aguas residuales, las cuales pueden contener una variedad de compuestos con diferentes características.

Algunos de los reportes registrados a escala laboratorio de diferentes aplicaciones de reactores ASBR, se presentan en la Tabla 2.3 (a, b, c).

**Tabla 2.3 (a):** Algunas aplicaciones de reactores ASBR para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
Tratamiento de aguas residuales porcinas a temperaturas psicrófilas (20°C).	Se aplicaron cargas orgánicas de 0.7-1.2 g DQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> .	El reactor fue eficiente en la retención de la biomasa, alcanzándose un porcentaje de eliminación de 73% de la materia orgánica total medida como DQO.	(Massé <i>et al.</i> , 1997).
Tratamiento de lixiviado de vertedero.	Se utilizó 2 L de volumen de reactor ASBR a 35°C. Los ensayos del estudio se realizaron con una tasa de carga volumétrica entre 0.4-9.4 g DQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> y una carga orgánica específica entre 0.2-1.9 g DQO·g SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> y tiempos de residencia hidráulico desde 1.5 hasta 10 días.	La eficiencia de eliminación varió desde 64 a un 85% dependiendo de la carga aplicada.	(Timur <i>et al.</i> , 1999)
Tratamiento de aguas residuales del procesamiento del vino.	Se trabajó a 8.6 g DQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> y un tiempo de residencia hidráulico de 2.2 días.	Se obtuvo un porcentaje de eliminación de materia orgánica del 98%.	(Ruiz <i>et al.</i> , 2001)

**Tabla 2.3 (b):** Algunas aplicaciones de reactores ASBR para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
Tratamiento de lodos porcinos diluidos.	La investigación se desarrolló a diferentes temperaturas de operación (20 y 35 °C), determinando la interacción de DQO y producción de biogás. Se aplicaron diferentes tiempos de residencia hidráulica: 7.2 y 9.1 días.	Se obtuvo un porcentaje de reducción de DQO de 90 y 84%, respectivamente.	(Ndegwa <i>et al.</i> , 2005)
Tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria cervecera, utilizando biomasa granular.	Se trabajó a una velocidad de carga orgánica entre 2 y 10 kg DQO·m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> y 10 y 20 Kg DQO·m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> .	Se obtuvo un porcentaje de eliminación de materia orgánica entre 80 y el 90% para el primer rango de carga orgánica aplicado y por debajo de 80% para el segundo tramo, con una mayor eficiencia a 35°C.	(Li <i>et al.</i> , 2005)
Tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria automotriz en un reactor ASBR.	Se trabajó con biomasa inmovilizada, probando distintas estrategias de alimentación y diferentes concentraciones de materia orgánica.	Se registraron los mejores resultados realizando una alimentación por lote del 50% del volumen efluente a tratar, y el resto mediante la estrategia por lote alimentado durante un periodo de tiempo de 4 horas.	(Oliveira <i>et al.</i> , 2008)

**Tabla 2.3 (c):** Algunas aplicaciones de reactores ASBR para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
Tratamiento aguas residuales sintéticas con fenol en reactores ASBR.	Se aplicaron dos modalidades de alimentación; lote y lote alimentado. Por lote se utilizó una concentración de $5 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ , la cual contenía un 10, 25 y 40% de fenol. Por lote alimentado se utilizó solo fenol como fuente de carbono a una concentración de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .	Mediante la alimentación por lote se obtuvo bajos porcentajes de degradación de fenol, cercanos al 30%. Sin embargo, mediante por lote alimentado, se alcanzaron porcentajes de eliminación de fenol del 95%	(Donoso-Bravo <i>et al.</i> , 2009 (a))

Un interesante estudio en este tipo de reactores ASBR de acuerdo a la flexibilidad de operación y a las ventajas cinéticas que presenta, corresponde a evaluar su comportamiento no solo desde el punto de vista operacional, sino que también poblacional, ante la presencia de diferentes efectores negativos que se puedan presentar durante su funcionamiento. Este es el caso de tratamientos de compuestos de difícil degradación presentes en diferentes tipos de aguas residuales, que en la mayoría de los casos, son compuestos que generen ciertas características inhibitorias sobre los microorganismos encargados de la degradación de la materia orgánica. Otro efector negativo que puede afectar su comportamiento, es a la variación de parámetros operacionales como es el caso de la temperatura.

## **2.3 EFECTOS NEGATIVOS PARA EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA**

### **2.3.1 Compuestos de difícil degradación y/o inhibidores**

La presencia de compuestos orgánicos de difícil degradación puede causar efectos inhibitorios en la actividad microbiana encargada de la eliminación de la materia orgánica, y como consecuencia, una disminución en el porcentaje eliminación de ésta o bien un largo tiempo de tratamiento.

Los estudios realizados respecto al tratamiento de efluentes industriales con presencia de compuestos de difícil degradación, han sido remitidos a un grupo reducido de compuestos que presentan cierta actividad inhibitoria sobre la biomasa de los reactores utilizados, por ejemplo: ácido 2,4 diclorofenoxiacético, pentaclorofenol y fenol, entre otros, los cuales tienen importancia por estar presentes en el efluente de industrias de diversas áreas. Para los dos primeros compuestos mencionados, se realizaron trabajos en reactores de tipo ASBR por Chin *et al.*, (2005), los que investigaron sobre la influencia del pH y temperatura, al tratar una alimentación con 2,4 ácido diclorofenoxiacético, obteniendo un 65% de eliminación del compuesto, a partir de una concentración inicial de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , a temperatura ambiente y Ribarova *et al.*, (2002), investigaron la relación entre la concentración de lodos anaerobios y el porcentaje de eliminación de DQO tratando un efluente con pentaclorofenol, obteniéndose valores de eliminación del tóxico entre  $0.17\text{-}0.44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , pero sólo como estudio de la puesta en marcha del reactor.

La actividad de industrias que procesan compuestos químicos o que utilizan químicos en sus procesos, como por ejemplo plantas procesadoras de celulosa, son las que aportan mayormente aguas residuales inhibitorias para los microorganismos encargados de la degradación. Esta característica es otorgada por la presencia de diversos compuestos, entre los que se destaca el fenol.

### **2.3.2 Variación de parámetros operacionales como temperatura**

En el proceso de digestión anaerobia y por lo tanto en la operación de reactores de tipo ASBR, existen importantes parámetros que deben ser considerados (Pinho *et*

*al.*, 2004; Mockaitis *et al.*, 2006; Ndegwa *et al.*, 2008; Miqueleto *et al.*, 2010). Uno de ellos corresponde a un importante parámetro de operación como es la temperatura, la cual está relacionada con la velocidad de las reacciones involucradas con el proceso, y características de las comunidades microbianas como supervivencia, crecimiento y competición entre especies.

Muchos estudios han demostrado un efecto negativo en la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios al disminuir la temperatura (McHugh *et al.*, 2004; Morgan-Sagastume y Allen, 2003, 2005; Connaughton *et al.*, 2006; Nadarajah *et al.*, 2007; Enright *et al.*, 2009). A pesar de que los microorganismos anaerobios pueden aclimatarse a diferentes condiciones de temperatura de operación, esto podría afectar la actividad de la biomasa y por lo tanto el rendimiento del digestor (Bérgamo *et al.*, 2009).

Como se señaló anteriormente, la temperatura tiene una fuerte influencia sobre la respuesta de las comunidades microbianas responsables de la digestión anaerobia, sin embargo los estudios se han centrado en el efecto de la temperatura en periodos largos de tiempo (más de 100 días), los cuales son bien conocidos (Xiaoqi *et al.*, 2007). Sin embargo, el efecto de la temperatura en períodos cortos de tiempo (semanas/días) no ha sido ampliamente estudiado.

Teniendo en cuenta que las modificaciones de temperatura podrían ser consideradas como una perturbación o un factor inhibición para los microorganismos que son responsables de la digestión anaerobia, es interesante evaluar el desempeño de los reactores anaerobios ASBR al modificar la temperatura en períodos cortos de tiempo (semanas/días).

## **2.4 ECOLOGÍA MICROBIANA PRESENTE EN DIGESTIÓN ANAEROBIA**

Las consecuencias de diferentes perturbaciones del proceso de digestión anaerobia (variación de pH, temperatura, TRH, características de los lodos, presencia de compuestos tóxicos en el agua a tratar, etc.) sobre la población microbiana que asegura este proceso, no son bien conocidas. Esto pone la pregunta del lazo entre diversidad y funcionamiento que es una cuestión fundamental en ecología y que ha sido objeto de un gran debate actual (Dumont *et al.*, 2008). Es para esto que es

interesante estudiar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana en relación con el tipo de sustratos, las perturbaciones fisicoquímicas, asociado al rendimiento o comportamiento del reactor. Esto es importante para contribuir a un funcionamiento estable del ecosistema presente (Roest *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente digestores metanogénicas, son operados para mineralizar los compuestos orgánicos complejos de los residuos a metano y dióxido de carbono, a través de la acción secuencial de cuatro grupos microbianos principalmente: Bacterias Hidrolíticas fermentativas, Acetogénicas, Archaeas Metanogénicas Acetoclásticas y Metanogénicas Hidrogenotróficas. (Zinder *et al.*, 1984).

Las bacterias hidrolíticas fermentativas son las responsables de la degradación de los polímeros orgánicos generando ácidos grasos volátiles y otras reducen compuestos orgánicos como lactato y etanol. Las bacterias acetogénicas reducen protones produciendo hidrógeno, formato y acetato desde el sustrato orgánico reducido. Algunas bacterias acetogénicas (homoacetogénicas) utilizan hidrogeno para producir acetato (Talbot *et al.*, 2008).

El último paso de la digestión anaerobia, corresponde a la producción de metano y dióxido de carbono a partir de hidrógeno, formato y acetato (Mah *et al.*, 1990; Stams and Zehnder, 1990). Boone *et al.* (1993) han definido la presencia de cinco órdenes de archaeas metanogénicas: Metanobacterias, Metanococcales, Metanomicrobiales, Metanosarcinas y Metanopyrales en condiciones termófilas.

De acuerdo a clasificaciones taxonómicas, y fenotípicos, entre otras, las metanogénicas pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo al sustrato que consumen: 1) Hidrogenotrofos, que oxidan hidrógeno formando metano y dióxido de carbono. Algunas especies pueden utilizar formato. 2) Metilotróficas las cuales utilizan metanol, metilamidas y demetilsulfidos. 3) Acetoclásticas o acetotrofos que utilizan acetato para producir metano. Existen otras especies que no pueden ser clasificadas en una simple categoría por los sustratos que requieren, como es el caso de *Metanosarcina* que es metabolitamente más diversificada y *Metanosaeta* que puede usar solo acetato como sustrato (Talbot *et al.*, 2008).

## 2.5 REFERENCIAS

- Abbasi T, Abbasi SA. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. 2012. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(3),1696–708.
- Angenent, L.T., Dague, R.R., 1995. A laboratory-scale comparison of the UASB and ASBR processes. In: 50th Purdue Industrial Wastewater Conference Proceedings. Ann Arbor Press, Chelsea, 365–377.
- Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., Dewil. R. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34 (6), 755–781.
- Bergamo, C., Di Mônaco, R., Ratusznei, S., Rodrigues, J., Zaiat, M., Foresti, E. 2009. Effects of temperature at different organic loading levels on the performance of a fluidized-bed anaerobic sequencing batch bioreactor. *Chemical Engineering and Processing*, 48 (3), 789–796.
- Chamy, R.Oyanedel, V. 2003. Remoción Biológica de Materia Orgánica. En: *Avances en Biotecnología Ambiental: Tratamiento de Residuos Líquidos y Sólidos*. 1ª edición. p 27. Chile: Salesianos S.A.
- Chan, C.-H., Lim, P.-E. 2007. Evaluation of sequencing batch reactor performance with aerated and unaerated FILL periods in treating phenol-containing wastewater. *Bioresource Technology*, 98 (7), 1333–8.
- Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C.L., Hassell, D.G. 2009. A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal* 155 (1-2), 1–18.
- Chin, H. Elefsiniotis, P. Snghal, N. 2005. Biodegradation of 2,4-dicholophenoxyacetic acid using an acidogenic anaerobic sequencing batch reactor . *Environ. Eng. Sci.* 4: 57-63.
- Connaughton, S.; Collins, G.; O’Flaherty, V. 2006. Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18°C. *Water Research* 40, 1009 – 1017.
- Dague RR, Habben CE, Pidaparti SR. Initial studies on the anaerobic sequencing batch reactor.1992.*Water Science and Technology*,26 (9-11), 2432–2492.
- Demirel, B., Yenigün, O., 2006. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresource Technology* 97, 1201–8.

- Donoso-Bravo, A. 2008. Aplicación y modelación de reactores por lotes secuenciales anaerobios (ASBR) para el tratamiento de residuos de lenta biodegradación. Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Donoso-Bravo, A., Rosenkranz, F., Ruiz-Filippi, G., and Chamy, R. 2009. "Development and validation of a simplified model for the anaerobic degradation of phenol.". *Water Science & Technology*, 60 (5), 1155-1160.
- Durai G, Rajasimman M. Biological treatment of tannery wastewater—a review. 2011 *Journal of Environmental Science and Technology*; 4(1):1–17.
- Enright, A.; McGrath, V.; Gill, D.; Collins, G.; O’Flaherty, V. 2009. Effect of seed sludge and operation conditions on performance and archaeal community structure of low-temperature anaerobic solvent-degrading bioreactors. *Systematic and Applied Microbiology* 32 (1), 65–79.
- Galí, a, Benabdallah, T., Astals, S., Mata-Alvarez, J., 2009. Modified version of ADM1 model for agro-waste application. *Bioresource technology* 100 (11), 2783–90.
- Gavrilescu, M., Macoveanu, M., 1999. Process engineering in biological aerobic wastewater treatment. *Acta Biotechnol*, 19 (2), 111–145
- Ghyoot W, Verstraete W. 1997. Anaerobic digestion of primary sludge from chemical precipitation. *Water Science & Technology*, 6-7, 357–65
- Haandel AV, Lubbe JVD. 2012. Handbook biological waste water treatment: design and optimization of activated sludge systems, anaerobic–aerobic waste- water treatment. London: IWA Publishing.
- Kassab, G., Halalsheh ,M., Klapwijk, A., Fayyad, M., Van Lier JB. 2010. Sequential anaerobic–aerobic treatment for domestic wastewater – A review. *Bioresource Technology*, 101(10), 3299–3310.
- Kim, K., Rock Oh, B.; Chun, J., Kim, S. 2006. Effects of Temperature and Hydraulic Retention Time on Anaerobic Digestion of Food Waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102 (4), 328–332.
- Lettinga G. The route of anaerobic waste (water) treatment toward global acceptance. In: Fang Herbert HP, editor. 2010. *Environmental anaerobic technology: applications and new developments*. London: Imperial College Press.

- Li, P., Mulligan, C.N. 2005. Anaerobic treatment of waste beer, *Environmental Progress*. 24 (1), 88–95.
- Ma, J., Yu, L., Frear, C., Zhao, Q., Li, X., Chen, S., 2012. Kinetics of psychrophilic anaerobic sequencing batch reactor treating flushed dairy manure. *Bioresource technology* 131, 6–12.
- Massé, D.I.; Droste, R.L; Kennedy, K.; Patni, K.L; Munroe, J.A.1997. Potential for the psychrophilic anaerobic treatment of swine manure using a sequencing batch reactor, *Canadian Agricultural Engineering*, 39 (1), 25–33.
- Mata-Alvarez, J. 2003. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA publishing.
- Michelan, R.; Zimmer, T.; Rodrigues, J.; Ratusznei, S.; Moraes, D.; Zaiat, M.; Foresti, E. 2009. Effect of impeller type and mechanical agitation on the mass transfer and power consumption aspects of ASBR operation treating synthetic wastewater. *Journal of Environmental Management* 90, 1357–1364.
- McHugh, S., Carton, M., Collins, G., O’Flaherty, V., 2004. Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewater at 16°–37°C. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 369–378.
- Miqueleto, A.P.; Dolosic, C.C.; Pozzi, E.; Foresti, E.; Zaiat, M. 2010. Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 101, 324–1330.
- Mockaitisa, G.; Ratusznei, S.; Rodrigues, J.; Zaiat, M.; Foresti, E. 2006. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. *Journal of Environmental Management* 79, 198–206.
- Mohan SV, Rao NC, Prasad KK, Madhavi BTV, Sharma PN. 2005. Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. *Process Biochemistry*; 40(5), 1501–8.
- Morgan-Sagastume, F., Allen, D.G. 2003. Effects of temperature transient conditions on aerobic biological treatment of wastewater. *Water Research* 37, 3590–3601.
- Morgan-Sagastume, F.; Allen, D.G. 2005. Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45°C. *Water Research* 39, 1061–1074.

- Nadarajaha, N.; Allen, D.G.; Fulthorpe, R. 2007. Effects of transient temperature conditions on the divergence of activated sludge bacterial community structure and function. *Water Research* 41, 2563 – 2571.
- Ndegwa, P.M., Hanilton, D.W., Lalman, J.A., Cumba, H.J., 2005. Optimization of anaerobic sequencing batch reactors treating dilute swine slurries. *Transactions of the ASAE* 48, 1575–1583
- Ndegwa, P.; Hamilton, P.; Lalman, J.A.; Cumba, H.J.; 2008. Effects of cycle-frequency and temperature on the performance of anaerobic sequencing batch reactors (ASBRs) treating swine waste. *Bioresource Technology* 99, 1972–1980
- Ndon, U.J., Dague, R.R., 1997. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic sequencing batch reactor treatment of low-strength wastewater. *Water Research* 31, 2455–2466.
- O’Flaherty V, Collins G, Mahony T. 2006. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*; 5(1):39–55.
- Oliveira, R; Ghilardi, J; Ratusznei, S; Rodrigues, J; Zaiat, M; Foresti, E. 2008. Anaerobic sequencing batch biofilm reactor applied to automobile industry wastewater treatment: Volumetric loading rate and feed strategy effects. *Chemical Engineering and Processing* 47, 1374–1383
- Pinho, S.; Ratusznei, S.; Rodrigues, J.; Foresti, E.; Zaiat, M. 2004. Influence of the agitation rate on the treatment of partially soluble wastewater in anaerobic sequencing batch biofilm reactor. *Water Research* 38, 4117–4124.
- Pasukphun, N and Vinitnantharat, S. 2002. Degradation of organic substances and reactive dye in an immobilized-cell sequencing batch reactor operation on simulated textile wastewater. In: 5th international conference on small water and wastewater treatment systems.
- Rebac S, van Lier JB, Lens P, Stams AJM, Dekkers F, Swinkels KTM, et al. 1999. Psychrophilic anaerobic treatment of low strength wastewaters. *Water Science and Technology*; 39(5):203–10.
- Reyes, F.L.; Dague, R.R. 1995. Effects of initial seed concentration on the startup of the anaerobic sequencing batch reactor. In: 50th Purdue Ind. Waste Conference Proc., Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan, pp. 449–459.

- Ribarova, I. Topalova, J. Ivanov, I. Kozuharov, D. Dimkov, R. Cheng, C. 2002. Anaerobic sequencing batch reactor as initiating stage in complete pentachlorophenol biodegradation. *Water Science and Technology* 46: 565-569.
- Rosselló-Mora, R.; Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 39-67.
- Ruiz, C; Torrijos, M; Sousbie, P; Martinez, L; Moletta, R; Delgenes, J.P. 2001. Treatment of winery wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR), in: *Proceedings of Ninth World Congress on Anaerobic Digestion, Antwerp*, pp. 347-353.
- Sarti, A; Fernandes, B; Zaiat, M; Foresti, E. 2007. Anaerobic sequencing batch reactors in pilot-scale for domestic sewage treatment. *Desalination* 216,174-182
- Seghezzi, L; Zeeman, G.; Van Lier, J.; Hamelers, J.; Lettinga, G. 1998. Review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB Reactors. *Bioresource Technology* 65, 175-190.
- Singh M, Srivastava RK. 2011- Sequencing batch reactor technology for biological wastewater treatment: a review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* ; 6(1), 3-13.
- Suresh S, Tripathi RK, Gernala Rana MN. 2011. Review on treatment of industrial wastewater using sequential batch reactor. *International Journal of Science Technology & Management*; 2:64-84.
- Tauseef, S.M., Abbasi, T., Abbasi, S. a. 2013. Energy recovery from wastewaters with high-rate anaerobic digesters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 19, 704-741.
- Timur, H.; Zturk, O. 1999. Anaerobic sequencing batch reactor treatment of landfill leachate, *Water Res.* 33, 3225-3230.
- Udeme, J.; Dague, R. 1997. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic sequencing batch reactor treatment of low-strength wastewater. *Wat. Res.* Vol. 31, No. 10, pp. 2455-2466.
- van Haandel A, Kato MT, Cavalcanti PFF, Florencio L. 2006. Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*; 5(1):21-38.
- Xiaoqi, Z.; Yanfen, W.; Ying, C.; Xiangzhong, H.; Yanbin, H.; Jianqing, T.; Tuanyao, C. 2007. PCR-DGGE detection of the bacterial community structure in the Inner Mongolia steppe with two different DNA extraction methods. *Ecologica Sinica*, 2007, 27(5), 1684-1689.

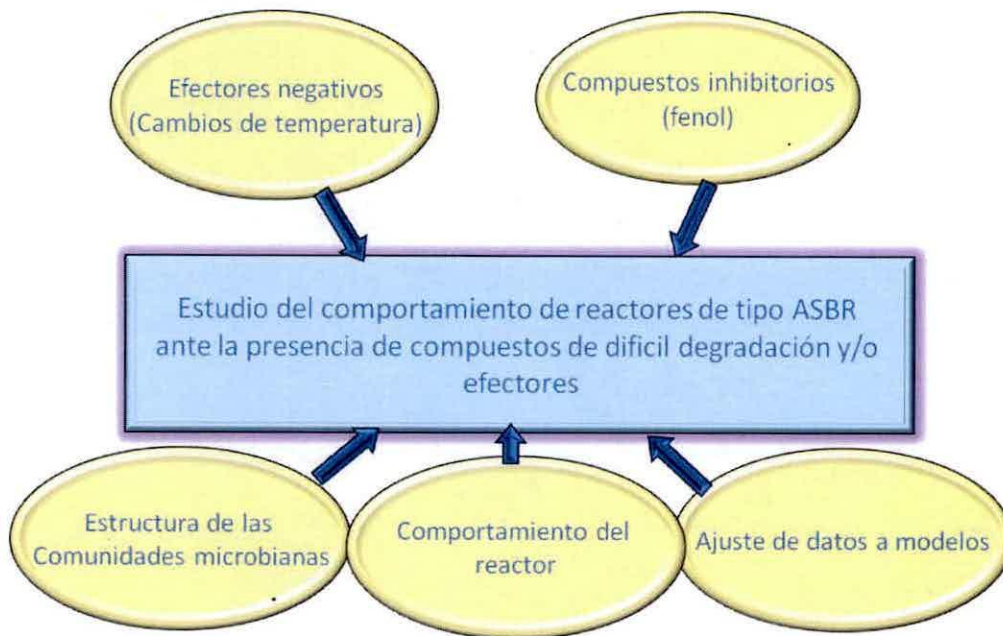
Zaiat, M., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Camargo, E.F.M., Borzani, W., 2001. Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater treatment: a developing technology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 29–35.

## **CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En esta sección se presenta un esquema general de los ensayos que fueron llevados a cabo para el cumplimiento del objetivo general de la investigación, relacionada con el estudio del comportamiento de reactores de tipo ASBR ante la presencia de compuestos de difícil degradación y/o efectores negativos.

En la Figura 3.1 se presenta un esquema con los objetivos involucrados en la investigación. La primera parte del estudio correspondió a la evaluación de reactores ASBR ante la variación de algún parámetro que pueda generar un efecto negativo en el comportamiento de éste, incluso tratando un compuesto fácilmente biodegradable como glucosa. Para esto, se desarrolló el estudio de la disminución de temperatura, en un rango mesofílico desde 37°C hasta 20°C (Capítulo 4).



**Figura 3.1:** Esquema general de estudios de comportamiento de reactores de tipo ASBR.

Se desarrolló además el estudio de la degradación anaerobia de compuestos inhibitorios como fenol. Se evaluó el comportamiento del reactor ASBR a diferentes concentraciones del compuesto desde (120 a 1200 mg·L<sup>-1</sup>), estudiando previamente

en ensayos en botellas, la influencia del tipo de inóculo utilizado para la degradación, la presencia de un co-sustrato como glucosa y el efecto de adiciones sucesivas del compuesto en estudio (fenol), a causa de una posible adaptación de los microorganismos (Capítulo 5).

Como una herramienta complementaria a los objetivos principales de investigación y para así entender con más detalle el efecto generado sobre la biomasa la presencia de compuestos de difícil degradación y/o una eventual variación de algún parámetro operacional importante como la temperatura, se estudió el cambio estructural de las comunidades microbianas presentes, mediante electroforesis en gel gradiente denaturante (DGGE) y posterior análisis de imagen.

Además se complementó la investigación, como la validación de modelos matemáticos previamente descritos para el caso de la degradación anaerobia de fenol y el estudio de cambios de temperatura.

La metodología experimental para el cumplimiento de cada objetivo se detalla completamente en los capítulos correspondientes (4,5 y 6).

### 3.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

A continuación se presentan los procedimientos analíticos utilizados en los distintos ensayos desarrollados, degradación anaerobia de fenol y comportamiento del reactor ante disminución de temperatura.

#### 3.2.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

**Fundamento:** La Demanda Química de Oxígeno se define como la cantidad de oxígeno necesario para la oxidación total de la materia orgánica presente en la muestra. Este método es aplicable a muestras líquidas, pero posee una modificación para poder aplicarla en sólidos. La determinación de este parámetro puede ser en fase soluble o total, soluble es cuando la muestra ha sido expuesta a un paso de filtración, en donde el sobrenadante será analizado con su respectiva dilución y total cuando la muestra ha sido diluida dentro de los rangos de medición, sin ser expuesta a procesos de separación.

Para el desarrollo de esta metodología analítica se requieren diferentes reactivos y soluciones como: Solución catalítica (10.7 g de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  en 1 L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (PA)); Solución digestora: (4.903 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 33.33 g  $\text{HgSO}_4$ , 167 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); Solución FAS (39.2 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 500 mL de agua destilada, 20 mL de ácido sulfúrico concentrado y llevar a 1 L); Indicador de ortofenantrolina (1.485 g de ortofenantrolina (1.10 monohidrato de fenantrolina) y 0.695 g de sulfato de hierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) en 100 mL de agua destilada); Solución de dicromato estándar (Dicromato de potasio 0.05 N).

#### **Metodología:**

La metodología es descrita de acuerdo a APHA (1995).

- Agregar 1.5 mL de solución digestora y 3.5 mL de solución catalítica a 2.5 mL de muestra.
- La solución catalítica se debe agregar por el borde el tubo de ensayo, manteniendo este levemente inclinado y evitando que se mezclen las fases, con el fin de impedir que la solución reaccione.

- Cerrar y herméticamente los tubos de ensayo con las tapas roscas (poner teflón) y colocar una vez agitados en el digestor por 2 horas a 150°C.
- Una vez transcurrido el tiempo de digestión, las muestras son enfriadas y trasladadas a matraces erlenmeyer, cuidando de lavar los restos de muestra que queden en los tubos de ensayo con pequeñas cantidades de agua destilada.
- Se agregan dos gotas de indicador y se titula con la solución FAS estandarizada, hasta el punto final, indicado por la aparición de un color rojizo.
- El método es lineal entre 40 y 400 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>, por lo que se debe considerar la dilución requerida para que esté dentro del rango indicado.
- Se realiza un blanco, en el que se reemplaza la muestra por 2.5 mL de agua destilada.

**Cálculos:** La demanda química de oxígeno (DQO) se determina a partir de la siguiente relación:

$$DQO = \frac{(V_{\text{blanco}} - V_{\text{muestra}})}{M} \cdot 8000 \cdot M_{\text{FAS}} \cdot F \left[ \frac{\text{mgO}_2}{L} \right] \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde:

$V_{\text{blanco}}$ : volumen de FAS gastado en la titulación del blanco, mL.

$V_{\text{muestra}}$ : volumen de FAS gastado en la titulación de la muestra, mL.

M: volumen de muestra, 2.5 mL.

$M_{\text{FAS}}$ : molaridad de la solución de FAS estandarizada.

F: factor de dilución de la muestra analizada.

8000: constante adimensional.

**Estandarización solución de FAS:** Tomar una alícuota de 5 mL de solución digestora y agregarle 10 mL de agua destilada: Enfriar a temperatura ambiente. Luego agregar

1 a 2 gotas de indicador de ortofenantrolina y titular con FAS hasta punto final, indicado por la aparición de un color rojizo.

$$M_{FAS} = \frac{M_D \cdot V_D \cdot 6}{V_{FAS}} = \frac{0,01667 \cdot 5 \cdot 6}{V_{FAS}} = \frac{0,500}{V_{FAS}} \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde:

$M_D$ : Molaridad solución digestora.

$V_D$ : 5 mL de volumen solución digestora.

$V_{FAS}$ : volumen de FAS usado en titulación, mL.

### 3.2.2 Alcalinidad

- **Razón de alcalinidades**

**Fundamento:** Corresponde a una relación entre alcalinidades que se puede determinar como el valor de alcalinidad debida a AGV sobre la alcalinidad total. Este valor se puede usar como parámetro de control de estabilidad, recomendando no superar el valor de 0.3 para evitar la acidificación del reactor (Ripley *et al.*, 1986).

Para el desarrollo de esta metodología se requieren las siguientes soluciones: Solución de ácido sulfúrico (5.57 mL de  $H_2SO_4$  concentrado aforado en 2 L de agua destilada); Solución estándar  $NaCO_3$  (2.5 g en 1 L de agua destilada).

**Metodología:**

- Colocar en un vaso precipitado de 10 mL de muestra.
- Titular con  $H_2SO_4$ , hasta pH 5.75. Anotar el volumen gastado.
- Continuar la titulación hasta llegar pH 4.3. Anotar el volumen total de  $H_2SO_4$  gastado.

**Cálculos:** El valor de la razón  $\alpha$  de alcalinidad está dado por:

$$\text{razón } \alpha = \frac{V_{\text{pH } 5.75-4.3}}{V_{\text{pH } 4.3}}$$

Ec. 3.3

donde:

$V_{\text{pH } 5.75-4.3}$ : Volumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gastado entre pH 5.75 y pH 4.3 mL

$V_{\text{pH } 4.3}$ : Volumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gastado hasta llegar a pH 4.3 mL

- **Alcalinidad Total**

**Fundamento:** Se define alcalinidad como la capacidad de neutralizar ácidos. Dicha capacidad se debe a la presencia de sustancias tampón o amortiguadoras. El comportamiento de dichas sustancias puede variar ampliamente de acuerdo con el pH de la disolución.

Para el desarrollo de esta metodología se requieren las siguientes soluciones: Solución de ácido sulfúrico (5.57 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado aforado en 2 L de agua destilada); Solución estándar  $\text{NaCO}_3$  (2.5 g en 1 L de agua destilada).

**Metodología:** La alcalinidad se determina por titulación con una solución estándar de un ácido mineral fuerte a los puntos sucesivos de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico. Se utilizará el método propuesto por Jenkins *et al.* (1983) para determinar la alcalinidad en digestores anaerobios, en donde se utilizan dos puntos de titulación uno a pH 5.75 y otro a pH 4.3.

**Cálculos:**

$$\text{alcalinidad} = \frac{V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot PM_{\text{CaCO}_3} \cdot 1000}{V_{\text{muestra}} \cdot N_{\text{eq}}}$$

Ec. 3.4

donde:

Alcalinidad: expresada como  $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$

$V_{\text{HCl}}$ : volumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gastado hasta llegar a pH 4.3

$V_{\text{muestra}}$ : volumen de muestra

$N_{\text{HCl}}$ : normalidad del  $\text{H}_2\text{SO}_4$

$\text{PM}_{\text{CaCO}_3}$ : Peso Molecular del Carbonato de Calcio ( $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$N_{\text{eq}}$ : número de equivalentes, 2.

### 3.2.3 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)

**Fundamento:** Corresponde a una medida materia orgánica (volátil a  $550^\circ\text{C}$ ) de una muestra, representando ésta una medida de la concentración de biomasa.

**Metodología:**

La metodología es descrita de acuerdo a APHA (1995).

- Centrifugar un volumen conocido de lodos (V) por 10 minutos a 9.000 rpm.
- Descartar el sobrenadante.
- Lavar con agua destilada, repetir tres veces.
- Secar la muestra hasta obtener peso constante.
- Incinerar por ocho horas en una mufla a  $550^\circ\text{C}$ .
- Dejar enfriar a temperatura ambiente en una desecadora y pesar.

**Cálculos:** Para determinar la concentración de SSV se realiza el siguiente cálculo:

$$SSV = \frac{P_1 - P_2}{V} \cdot 1000 \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde:

SSV: Concentración de sólidos suspendidos volátiles  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

$P_1$ : peso muestra seca g.

$P_2$ : peso muestra incinerada g.

V: volumen de muestra utilizada mL.

El número 1000 es utilizado para convertir las unidades de mL a L.

### 3.2.4 Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

**Fundamento:** La determinación de los AGV se realiza mediante cromatografía de gases. Las muestras son ingresados en el inyector del equipo donde, a una alta temperatura, se produce la vaporización de los distintos compuestos presentes en ella; luego éstos penetran en la columna cromatográfica donde son arrastrados por un gas portador (nitrógeno) siendo separados de acuerdo a la afinidad que presentan con la columna para luego ser combustionados en un detector de ionización de llama.

#### **Metodología:**

La metodología es descrita de acuerdo a APHA (1995).

Para determinar AGV mediante cromatografía de gases, es necesario centrifugar las muestras a 10000 rpm durante 15 minutos y luego el sobrenadante debe ser filtrado en filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  y posteriormente diluidas con el fin de obtener una concentración que este dentro del rango de sensibilidad al que se esté trabajando. Se inyecta 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo y se cuantifica los AGV.

En esta investigación se utilizó un cromatógrafo de gases GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado con 30" x 4mm ID columna empacada GP 60/80 Carbowax C/0.3% Carbowax 20M/0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Sigma Aldrich, St Louis, MO, US). Temperatura 120°C, con nitrógeno como carrier gas (50  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ) y detector FID (200°C).

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes: Solución mixta de ácido fórmico más patrón interno (0.2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de patrón interno 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido fórmico); Solución de ácido fórmico (10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); Soluciones para la curva patrón de los AGVs (20/100/150/200/300  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 3.2.5 Fenol

La medición de fenol fue utilizada para los ensayos descritos en el Capítulo 5. Esta se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases con detector FID. Temperatura del

inyector fue de 220°C, detector 250°C y columna a 170°C; volumen de inyección 1 µL (carrier de nitrógeno a 1 ml·min<sup>-1</sup>).

La curva de calibrado se elaboró a partir de un patrón de fenol de 40 g·L<sup>-1</sup> ppm con el cual se elaboraron las diferentes diluciones. La preparación de los viales es la misma que las muestras, adicionando además un patrón interno. La curva de calibrado se obtiene al graficar la división entre las áreas de fenol y patrón interno versus la concentración de fenol en la dilución correspondiente.

La cuantificación de las muestras se realiza al interpolar la división del fenol y el patrón interno de la muestra.

Para el desarrollo de ésta metodología, se utilizaron las siguientes soluciones: Solución mixta de fenol más patrón interno (0.5 g·L<sup>-1</sup> de patrón interno); Soluciones para la curva patrón de fenol (entre 0.5 y 1000 mg·L<sup>-1</sup>).

#### **Metodología:**

- Centrifugar la muestra durante 15 min y posteriormente debe ser filtrada en una membrana de 0.45 µL.
- Adicionar 2 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado por mL de muestra, para preservación de ésta.
- Colocar 500 mL de la muestra, diluida en caso que sea necesario, junto con 500 mL de patrón interno (Etanol 100% 0.79 g·L<sup>-1</sup>), en viales para cromatógrafo de 1.5 mL.
- Analizar las muestras en el cromatógrafo.
- Cuantificar la concentración de fenol de las muestras, mediante la interpolación de las mediciones en la curva de calibrado.

#### **3.2.6 Composición de Biogás**

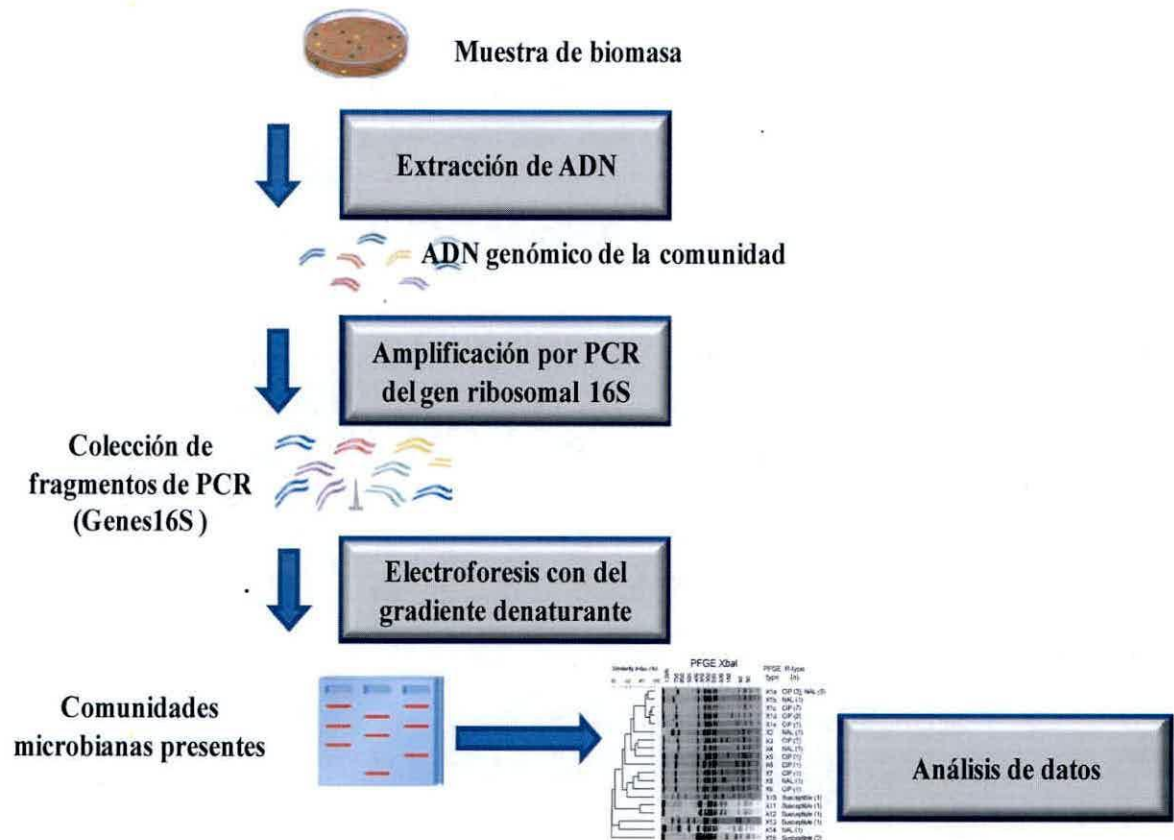
**Fundamento:** La composición de biogás es un parámetro importante ya que corresponde a indicador de rendimiento del reactor, debido a que una acumulación

de ácidos en el sistema llevaría a un aumento del contenido de CO<sub>2</sub> en el biogás (producido durante la neutralización de los ácidos por el bicarbonato).

**Metodología:** La composición del biogás (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) se determina por cromatografía con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó un cromatógrafo de gases, Clarus 500 (Perkin Elmer, Waltham, MA, US) equipado con columna de teflón Hayesep-Q, Supelco; 4 m x 1/8" OD. Las temperaturas del inyector, columna y detector son de 80, rampa de temperatura de 30 a 80 y 120°C. El helio se utiliza como gas portador con un flujo de 15 mL·min<sup>-1</sup>. El volumen de muestra (1 ml) se inyecta a través de un septo en la entrada del equipo.

### 3.2.7 Análisis de Microbiología (DGGE)

En la Figura 3.2 se muestra un esquema con los diferentes procedimientos utilizados para la determinación de la estructura de las comunidades microbianas presentes mediante la técnica molecular DGGE.



**Figura 3.2:** Proceso de extracción de ADN, amplificación por PCR y observación de los productos mediante electroforesis en gradiente (DGGE).

A continuación se describen los protocolos utilizados en cada una de las etapas.

#### **Protocolo de extracción y purificación de ADN:**

La extracción y purificación de moléculas de ADN se realiza mediante el *kit* de extracción *PowerSoil DNA Isolation*, que se utiliza para la extracción de ADN genómico de muestras ambientales y luego se separan por electroforesis. El detalle del *kit* de extracción se presenta en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1:** Contenido del Kit *PowerSoil* DNA Isolation para la extracción y purificación del ADN.

Componente	Kit Catálogo #	12888-50	Kit Catálogo #	12888-100
	Catálogo #	Cantidad	Catálogo #	Cantidad
Tubos PowerBead (750µL solution)	12888-50-PBT	50	12888-100-PBT	100
Solución C1PowerSoil	12888-50-1	3,3mL	12888-100-1	6.6mL
Solución C2PowerSoil	12888-50-2	14mL	12888-100-2	28mL
Solución C3PowerSoil	12888-50-3	11mL	12888-100-3	22mL
Solución C4PowerSoil	12888-50-4	72mL	12888-100-4	144mL
Solución C5PowerSoil	12888-50-5	30mL	12888-100-5	2 X 30mL
Solución C6PowerSoil	12888-50-6	6mL	12888-100-6	12mL
Filtros Spin PowerSoil Spin	12888-50-SF	50	12888-100-SF	100
Tubos de recolección PowerSoil 2mL	12888-50-T	200	12888-100-T	400

**Metodología:**

- Traspasar el contenido de tubos Power bead a eppendorf de acuerdo al número de muestras a analizar.
- Adicionar 0.5 o 1 mL de lodo a un tubo vacío (power bead),
- Centrifugar lodo 5 minutos a 10000 g.
- Eliminar sobrenadante y agregar contenido de Power bead.
- Agitar en vortex.
- Adicionar 60 µL de solución C1.
- Agitar en vortex horizontal 10 minutos al máximo.
- Centrifugar por 30 segundos a 10000 g.

- Traspasar 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a tubos limpios.
- En estos tubos con sobrenadante adicionar 250  $\mu\text{L}$  de solución C2.
- Agitar en vortex en segundos.
- Incubar a 4°C por 5 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 10000 g.
- Evitando resuspender el pellet traspasar 600  $\mu\text{L}$  a tubos limpios.
- En estos tubos con sobrenadante adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solución C3.
- Agitar en vortex.
- Encubar a 4°C por 5 minutos.
- Centrifugar a 10000 g.
- Evitando resuspender el pellet traspasar 750  $\mu\text{L}$  a tubos limpios.
- En los tubos adicionar 1200  $\mu\text{L}$  de solución C4.
- Agitar en vortex.
- Cargar 675  $\mu\text{L}$  en Spin filter.
- Centrifugar A 10000 g por 1 minuto.
- Vaciar contenido.
- Adicionar nuevamente 675  $\mu\text{L}$  en spin filter.
- Centrifugar por 1 minuto a 10000 g.
- Descargar flujo (repetir hasta que no quede sobrenadante).
- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de solución C5.
- Centrifugar 30 segundos a 10000 g.
- Descargar flujo.
- Centrifugar 1 minuto a 10000 g.
- Sacar tubo central spin filter y poner en eppendorf limpio.
- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de solución C6.
- Centrifugar 30 segundos a 10000 g.
- Sacar spin filter y lo que queda en el eppendorf corresponde a DNA.
- Refrigerar a -20°C.

**Amplificación mediante PCR**

La amplificación de PCR se lleva a cabo en 50  $\mu\text{L}$  con 1.25U GoTaq ADN Polimerasa (Promega, Madison, WI, US), 25 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  de cada primer, 10  $\mu\text{M}$  dNTP y 1 $\mu\text{L}$  template de ADN, en un termociclador GSI (G-Storm, Somerton, UK). Las características del ciclo dependerán de cada condición estudiada, lo cual se detalla en la sección de materiales y métodos de los capítulos de resultados.

**Protocolo DGGE**

Los productos de PCR (10  $\mu\text{L}$ ) deben ser separados por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), acorde al protocolo de Muyzer *et al.*, 1993.

Al igual que el protocolo de PCR, el detalle de este procedimiento de DGGE dependerá de las condiciones estudiadas, la cual se detalla en la sección de materiales y métodos de los capítulos de resultados.

El análisis de imagen y estadístico implementado, se detalla igualmente en la sección de materiales y métodos de cada capítulo de resultados.

### 3.3 REFERENCIAS

- APHA, 1995. *Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Jenkins, S. R., Morgan, J. M., and Sawyer, C. L. (1983). "Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration." *Journal WPCF*, 55(5), 448-453.
- Muyzer, G.; E C de Waal, Uitterlinden, A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59(3): 695-700.
- Ripley, L. E., Boyle, J. C., and Converse, J. C. (1986). Improved alkalimetric monitoring buffer capacity and total volatile fatty acid levels in anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, 58(5), 406-411.
- Standard methods for Examination of Water and Wastewater 5220C. Close Reflux, Titrimetric Method. 21<sup>o</sup> Ed. 1999.

**CAPITULO 4: IMPORTANCIA DE LA DISMINUCIÓN DE LA  
TEMPERATURA EN EL COMPORTAMIENTO DE REACTORES ASBR**

## 4.1 ANTECEDENTES

### 4.1.1 Importancia de la temperatura en sistemas anaerobios y en la ecología microbiana

Entre los diferentes parámetros que pueden tener alguna incidencia importante en el proceso de digestión anaerobia y que además puedan suponer un efector negativo en la degradación, si no son controlados de la manera adecuada, se encuentra la temperatura.

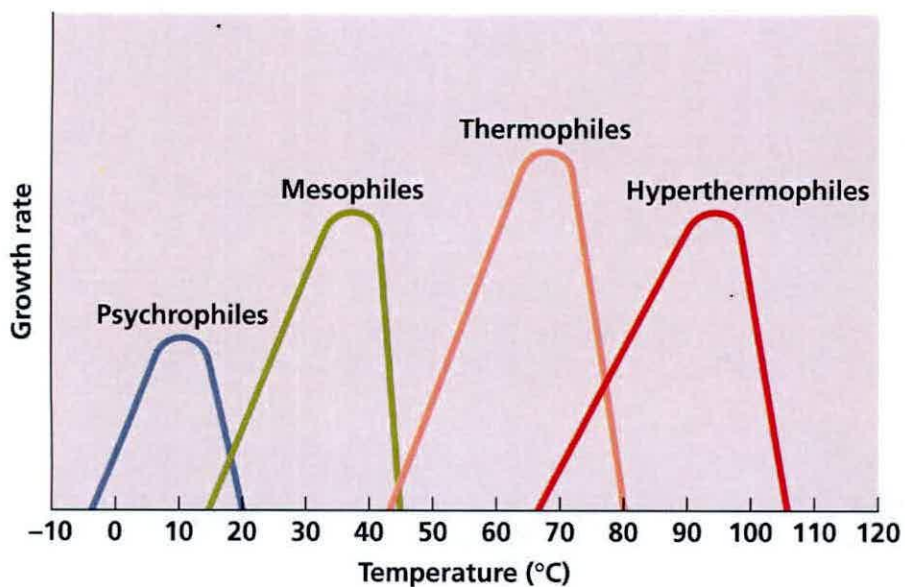
La temperatura está relacionada con la velocidad de las reacciones químicas involucradas en el proceso y características de las comunidades microbianas, como supervivencia, crecimiento y competición entre especies (Alvarez *et al.*, 2009; Metcalf & Eddy, 1995). Por este motivo, en los sistemas de tratamiento, como puede ser la digestión anaerobia, se busca monitorear el proceso y realizar algunas mejoras esenciales en el diseño de los digestores, de manera que permitan la aplicación de temperaturas sub-óptimas (Lettinga *et al.*, 2001).

En el tratamiento de aguas residuales, el diseño del digestor debe permitir la suficiente flexibilidad para ajustar las variables de control del proceso y asegurar su sistematización. La variable de control principal en la fase bioquímica para el tratamiento de aguas residuales es el tiempo de retención celular, que se debe ajustar para compensar los cambios de temperatura. Otra consideración que se debe tener en cuenta en la operación de los reactores anaeróbicos, es la presencia de diferentes grupos de microorganismos con distintos valores óptimos de temperatura para las diversas condiciones de operación. Los microorganismos acetogénicos tienen una temperatura óptima de 30°C, mientras que las metanogénicas tienen una temperatura óptima de 35°C en el rango mesófilo (Bergamo *et al.*, 2009).

A pesar de los distintos sistemas de control que pueden ser aplicados, existen instancias (en muchos casos no programadas), en que la biomasa anaerobia encargada de la degradación, puede estar expuesta a variaciones de temperatura, - como por ejemplo en períodos de puesta en marcha, cortes de energía que afecte el sistema de calefacción, traslado de biomasa,- entre otros- que genera efectos en

la actividad microbiana y como consecuencia en los rendimientos de producción de metano. Estos cambios pueden ser más o menos significativos, dependiendo del tiempo de exposición al cambio y las características de la biomasa. ( Enright *et al.*, 2009; Connaughton *et al.*, 2006; Leitão *et al.*, 2006).

En función de los diferentes intervalos de temperatura que puedan presentar los microorganismos que participan en las diversas etapas del proceso de degradación, estos se pueden clasificar en diferentes “clases de temperatura” en función de la temperatura óptima y el rango de temperaturas en el que las especies son capaces de crecer y metabolizar (Wiegel, 1990; Lettinga *et al.*, 2001), como se muestra en la Figura 4.1.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Figura 4.1:** Tasa de crecimiento relativo de microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos.

La mayoría de los microorganismos productores de metano son activos en dos rangos de temperatura: Mesófilico entre 30 a 35°C y Termófilico entre 50 a 60°C. A

temperaturas entre 40°C y 50°C, éstos microorganismos ya sufren una disminución importante de su actividad ( Gerardi, 2003; Connaughton *et al.*, 2006).

Como se muestra en la Tabla 4.1, aunque la producción de metano puede tener lugar en un amplio intervalo de temperaturas, la digestión anaerobia de lodos y la producción de metano en plantas de tratamiento de aguas residuales se realiza mayoritariamente en el intervalo mesofílico, con una temperatura óptima de aproximadamente 35°C , temperatura en donde la producción de metano se ha registrado como óptima (Gerardi, 2003; Alvarez *et al.*, 2009).

**Tabla 4.1:** Producción de metano a diferentes rangos de temperatura, en tratamiento de aguas municipales (Gerardi, 2003).

Temperatura °C	Producción de Metano
35	Óptima
32-34	Mínimo
21-31	Poco, digestor comienza a acidificar
21	Nula, digestor acidificado

Cuando un digestor opera en estado estacionario, las actividades de los diferentes grupos de microorganismos se encuentran balanceadas y consecuentemente no se predice acumulación de productos intermedios metabólicos en el reactor. Sin embargo, cuando el proceso se expone a un cambio súbito de temperatura, las condiciones del proceso de digestión pueden perder el balance debido a las diferentes respuestas de los grupos de microorganismos (Skilton *et al.*, 1986; Cha *et al.*, 1997; Maharaj *et al.*, 2001). Cuando la temperatura cae por debajo de 32°C, se debe tener en cuenta la acumulación de ácidos grasos volátiles, ya que los microorganismos encargados de su formación pueden permanecer activos a esas temperaturas, pero la producción de metano transcurre más lentamente (Borja *et al.*, 1995) . Los microorganismos metanogénicos por su parte, son muy sensibles a las variaciones de temperatura, ya que ésta influye en factores físicos y biológicos del proceso de conversión. La producción de ácidos puede continuar a un ritmo rápido a 21°C, mientras que la producción de metano se ve gravemente afectada (Lettinga *et al.*, 1980; Skilton *et al.*, 1986; Speece, 1996; van Lier *et al.*, 1997; Gerardi, 2003; Demirer *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008).

Por otra parte, a temperaturas menores a la óptima, no solo se han observado efectos generados por parte de los microorganismos presentes, sino que también existen otros factores que influyen en el comportamiento del digestor, como es por ejemplo el incremento de la viscosidad, lo que genera un mayor requerimiento energético para su agitación y lenta sedimentación de material particulado debido a una disminución de la separación sólido-líquido (Lettinga *et al.*; 2001). Además a temperaturas por debajo de 20°C la disminución de la solubilidad de las grasas, partículas y polímeros orgánicos puede constituir la etapa limitante del proceso y causar la inestabilidad del reactor (Speece, 1996).

Es importante señalar que el efecto de la temperatura no sólo en el aspecto cinético (velocidad de consumo de sustrato, velocidad de crecimiento de biomasa) sino también en el aspecto termodinámico (conversión de sustrato a producto) referente a las condiciones de equilibrio que se pueden lograr para una etapa determinada de la digestión anaerobia.

Como se puede apreciar en la Tabla 4.2, los procesos acetogénicos son energéticamente desfavorables, por lo que necesitan la acción sinérgica de microorganismos metanogénicos u otros microorganismos consumidores de hidrógeno ya que la energía libre de la reacción depende de la presión parcial de hidrógeno del medio (Stams, 1994).

**Tabla 4.2:** Reacciones consideradas en el sistema anaerobio (Stams, 1994).

Reacción acidogénica		$\Delta G^{\circ}$ [kJ/mol]
(a)	$Glucosa + H_2O \leftrightarrow 0,66Acetato + 1,33 Propionato + 0,66CO_2 + 2H^+$ $+ 0,66H_2O$	-74,2
.Reacciones acetogénicas		
(b)	$HAc + 4H_2O \leftrightarrow H^+ + 4H_2 + 2HCO_3^-$	+104,6
(c)	$HProp + 3H_2O \leftrightarrow HAc + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+76,1
(d)	$HProp + 7H_2O \leftrightarrow 3HCO_3^- + 2H^+ + 7H_2$	+181,1
Reacciones Metanogénicas		
(e)	$HAc + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + CH_4$	-31,0
(f)	$HProp + H_2O \leftrightarrow 1\ 3/4CH_4 + 1\ 1/4HCO_3^- + 1/4H^+$	-53,0

#### 4.1.2 Efecto de variaciones de temperatura en digestión anaerobia

En digestión anaerobia, la mayoría de las investigaciones y las aplicaciones a gran escala, han estado enfocadas a estudios dentro de la gama de temperaturas mesofílicas (25-45°C). Esto es debido en gran parte a que en la gama termofílica (> 45°C) puede resultar menos estable por la mayor sensibilidad a los procesos de inhibición y, en algunos casos por el incremento de costos. Por otro lado, la operación en el rango psicrófilo (20°C) la actividad microbiana se ve muy afectada, lo que provoca una operación menos eficaz (Connaughton *et al.*, 2006).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se han desarrollado investigaciones evaluando el efecto de la disminución de temperatura en el tratamiento anaerobio de residuos de estiércol de cerdos, realizando la digestión a tres temperaturas - 25, 30 y 35°C-, con cuatro cargas de alimentación de 5%, 10%, 20% y 40% (volumen de alimentación/volumen digestor). A una temperatura de 30°C, el rendimiento de metano se redujo en sólo 3% en comparación con 35°C, sin embargo, se observó una reducción de 17.4% al realizar la digestión a 25°C. Los rendimientos finales de metano correspondieron a 327, 389 y 403 mL CH<sub>4</sub>·g SV<sup>-1</sup> a 25, 30 y 35°C, respectivamente; con cargas moderadas de alimentación del 5% al 20% (V/V) (Chae *et al.*, 2008).

Cha y Noike (1997) investigaron sobre los efectos de un cambio rápido de temperatura y del tiempo de residencia hidráulico sobre la etapa acidogénica, concluyendo que la remoción de sustrato se ve significativamente afectada por una bajada rápida de temperatura particularmente a bajos TRH, disminuyendo hasta 57% a un TRH de 6 horas si la temperatura cae de 20 a 15°C. Por otro lado la estabilidad del reactor se recupera lentamente a bajos TRH y a bajas temperaturas.

Se han realizado además investigaciones en donde se evalúa el cambio de las comunidades microbianas presentes en un lodo anaerobio al someter un birreactor de filtro anaerobio (EGSB-AF), durante un tiempo largo de operación (625 días), a variaciones de carga orgánica operando a baja temperatura (18°C). Durante la operación, se pudo observar modificación de la población de bacterias y archaeas durante el tiempo de ensayo en respuesta a la operación del reactor a bajas temperaturas, incremento de carga orgánica y acumulación de ácidos grasos volátiles (Connaughton *et al.*, 2006).

Enright *et al.* (2009) estudiaron dos reactores anaerobios de tipo EGSB inoculados de diferentes plantas de tratamiento mesofílico (37°C), para el tratamiento de aguas residuales de un disolvente orgánico a 9°C y 14°C a diferentes velocidades de carga orgánica (VCO). En una operación a 9°C y aplicando una carga de 2.4 kg DQO·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> se produjo una eliminación eficiente de DQO, junto con una productividad alta de metano. La técnica molecular FISH (Hibridación in situ con fluorescencia) indicó que los microorganismos dominantes fueron las archaeas metanogénicas acetoclásticas

(> 60%). Los reactores desarrollaron actividad metanogénica psicotolerante, siendo la metanogénesis acetoclástica la ruta principal de producción de metano. Al prolongar el tiempo de operación a 9°C durante 30 días, se obtuvo el desarrollo de especies metanogénicas hidrogenotróficas.

Utilizando la misma tecnología que en la investigación anterior, se determinó la factibilidad de realizar la digestión anaerobia a temperaturas aún menores, aplicando disminuciones graduales de temperatura con variaciones de 1°C desde 14° a 9°C, en un tiempo largo de operación de aproximadamente 340 días, a una velocidad de carga orgánica entre 1.2-3.6 kg DQO·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>. Al momento de alcanzar los 9°C, se obtuvo una eliminación estable de DQO, junto con productividad alta en metano, con una VCO aplicada de 2.4 kg DQO·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>. Como resultado se obtuvo un desarrollo de la actividad metanogénica psicotolerante. Se observó una reducción de la abundancia de *Methanosaeta*, junto con la detección de especies metanogénicas hidrogenotróficas y alteración en la morfología de los gránulos, tras un período de operación prolongado a una temperatura de 9°C.

#### 4.1.3 Efecto de la temperatura en reactor ASBR

Diversas investigaciones relacionadas con el efecto de la temperatura en reactores ASBR muestran un efecto negativo sobre la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios al disminuir la temperatura (Bergamo *et al.*, 2009). A pesar de que los microorganismos anaerobios pueden aclimatarse, la operación en temperaturas fuera del rango óptimo, puede afectar a la actividad de la biomasa y al rendimiento del digestor.

Dague *et al.* (1998) llegaron a la conclusión que en un ASBR cuando se modifica la temperatura de operación desde el rango mesófilo al psicrófilo se produce una disminución no lineal en la velocidad máxima específica de consumo de sustrato ( $v_{me}$ ). A 20°C el  $v_{me}$  fue un 28 % menor que a 25°C mientras que sólo disminuyó un 7 % entre 20 y 15°C.

En la operación de un reactor ASBR con biomasa inmovilizada para el tratamiento de agua residual sintética se pudo mantener una operación estable a pesar de ir disminuyendo la temperatura (30, 25, 20 y 15°C). La eficiencia de eliminación fue

disminuyendo alcanzando un valor de 86% para 20°C y 75% para 15°C (Bergamo *et al.*, 2009).

En el tratamiento de residuos no grasos de la industria láctea Ndon *et al.* (1997) obtuvieron porcentajes de remoción de DQO superiores al 80% en operación a diversas temperaturas (35, 25 y 20°C) y concentración de materia orgánica (1000 y 400 mg DQO·L<sup>-1</sup>), excepto a 15°C para el tratamiento de aguas residuales más concentradas (1000 mg DQO·L<sup>-1</sup>) y aplicando TRH cortos (12 h).

El tratamiento de purines de cerdo diluidos en un ASBR a una temperatura de 20°C presentó una mayor degradación de ácidos grasos volátiles que a 35°C y no afectó a la cantidad y calidad del biogás, por lo que la investigación sugiere que para el tratamiento de estiércol de cerdo, sobre todo por el control de olores, podría ser más favorable llevar a cabo la degradación a bajas temperaturas (Ndegwa *et al.*, 2008). Si bien los autores no profundizan en las causas de éstos resultados, podrían eventualmente ser un efecto producido por una disminución de la inhibición de amonio a temperaturas inferiores.

Se ha utilizado este tipo de reactores también a escala piloto para el tratamiento de purines de cerdo a temperatura psicrófila (20°C), con cargas orgánicas de 0.7-1.2 g DQO·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (Massé *et al.*, 1997). El reactor fue eficiente en la retención de la biomasa y se alcanzó un porcentaje de eliminación del 73% de la materia orgánica total medida como DQO. Los estudios de Massé *et al.* (2003) sugieren que el rendimiento del ASBR disminuye de manera significativa si disminuye la temperatura de operación de 20°C a 10°C, pero el ASBR se mantiene estable y la actividad se recupera al aumentar la temperatura de nuevo a 20°C. Los resultados también indicaron que el estiércol de cerdo podría ser parcialmente tratado en ASBR operando a 10°C, pero sería necesario un gran volumen del biorreactor dada la baja tasa de degradación registrada a dicha temperatura. Esta investigación demuestra la capacidad de estos reactores de poder recuperar su actividad al haber sido sometido a shocks térmicos, lo cual resulta una característica importante considerando cambios repentinos en las condiciones ambientales que puedan ocurrir o por fallos del sistema.

Los efectos de bajas temperaturas en periodos largos de operación (sobre 100 días) han sido extensamente estudiadas por otros autores (Leitão *et al.*, 2006; Connaughton *et al.*, 2006; Xiaoqui *et al.*, 2007; Enright *et al.*, 2009) revelando principalmente, una acumulación de ácidos grasos volátiles y cambios en la población de bacterias y archaeas, siendo las comunidades metanogénicas las mayormente afectadas en respuesta a la disminución de la temperatura. Sin embargo, existen pocas referencias bibliográficas en donde se estudie con detalle el efecto de la disminución de la temperatura en cortos periodos de tiempo (días/semanas) y menos aún su consecuencia a nivel funcional y microbiológico.

Teniendo en cuenta que las variaciones de temperatura pueden ser consideradas como un factor negativo o de inhibición para el proceso de digestión anaerobia y de la estructura microbiana, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de una disminución de temperatura en cortos tiempos (días/semanas) sobre la duración del ciclo de operación y sobre la estructura de comunidades de archaeas en un reactor ASBR.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Montaje Experimental

Para el desarrollo de los experimentos se utilizó un reactor ASBR a escala laboratorio con un volumen total de 6 L, 5 L de volumen útil y 1 L de espacio de cabeza para el almacenamiento de biogás. El reactor cilíndrico tenía un diámetro de 15 cm y una altura de 34 cm.

El digestor disponía de una chaqueta externa de agua, para mantener constante la temperatura, controlada por un termostato.

El reactor de tipo ASBR, incluye cuatro etapas en su ciclo de operación, alimentación (20 min), reacción (de 24 a 96 h, dependiente de la temperatura), sedimentación (1 h) y descarga (20 min). El volumen de intercambio fue del 60% en todos los ciclos. La agitación del reactor se efectuó mediante recirculación de líquido, con un caudal de  $0.43 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , como una forma de mejorar el contacto entre la biomasa y el líquido. Los caudales de alimentación, recirculación y descarga del reactor fueron controlados mediante bombas peristálticas.

Para la medición de pH y caudal de biogás, se utilizó un sensor de pH en línea y un medidor másico (AALBORG) respectivamente, los cuales fueron conectados a un dispositivo de transmisión de señal, obteniendo los datos mediante el programa Labview (National Instruments, Austin, TX, US).

En la Figura 4.2 se muestra un esquema de la configuración experimental.

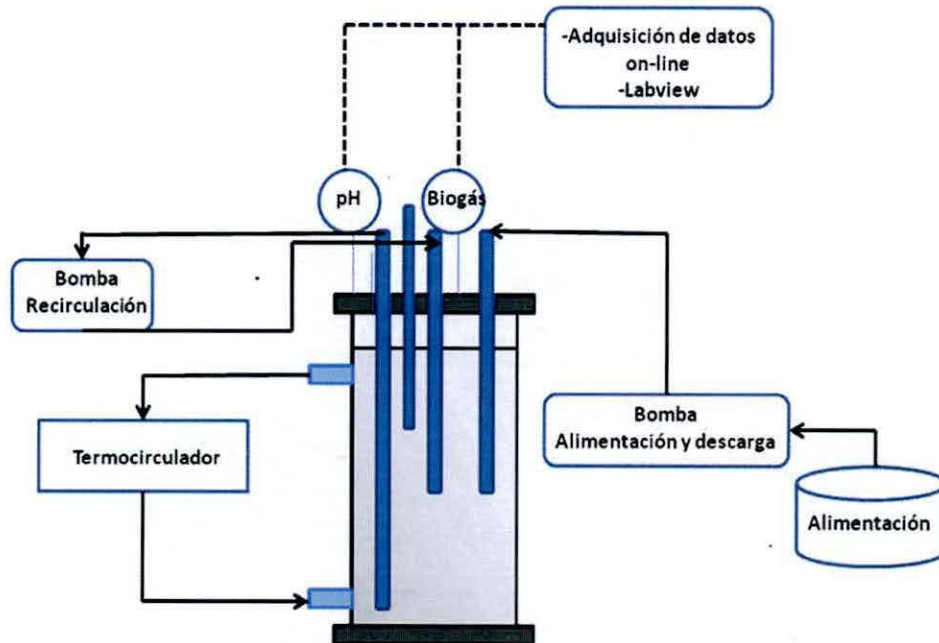


Figure 4.2: Montaje experimental usado para el estudio de comportamiento de reactor ASBR al disminuir la temperatura (37°C, 31°C, 25°C y 20°C)

#### 4.2.2 Procedimiento Experimental

Se probaron cuatro temperaturas, partiendo inicialmente de la temperatura óptima de operación que posteriormente se fue disminuyendo con una variación entre 5-6°C ( $T=37\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $T=31\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $T=25\pm 1^\circ\text{C}$  y  $T=20\pm 1^\circ\text{C}$ ). Una vez que se evaluó el comportamiento del digestor a la última temperatura (20°C), el digestor fue nuevamente operado a la temperatura óptima de 37°C, para determinar la capacidad de recuperación del sistema. En la Figura 4.3 se muestra la secuencia de la operación.

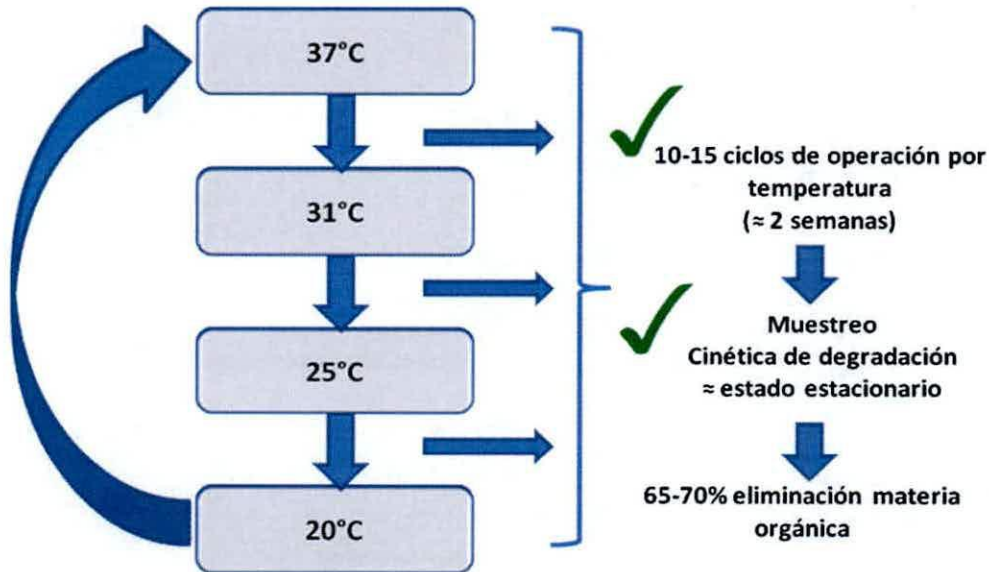


Figura 4.3: Esquema del procedimiento experimental.

La duración de la etapa de reacción del reactor a cada temperatura se modificó a fin de alcanzar una eliminación mínima de materia orgánica del 65-70%. Sin embargo, la duración de las otras etapas se mantuvo en todos los casos.

Se consideró que una operación en estado estacionario se alcanza cuando se logran los objetivos de eliminación a lo largo de 5 ciclos consecutivos. Por lo tanto el número de ciclos a cada temperatura varió entre 10 (37°C) y 15 (20°C).

Durante el último ciclo a cada temperatura fueron medidos el perfil de DQOs, AGV y la producción de metano, los que fueron utilizados para la determinación de la cinética del proceso.

#### 4.2.3 Inóculo y Sustrato

La alimentación del reactor, correspondió a un agua residual sintética constituida por  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa como única fuente de carbono,  $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extracto de levadura (considerada despreciable para el balance de masa),  $21.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de dihidrógeno de fosfato de potasio y  $4.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cloruro de amonio (Donoso-Bravo *et al.*, 2009 (b)) y bicarbonato de sodio ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

El inóculo fue obtenido de una planta procesadora de tabaco, que posteriormente fue utilizado para el tratamiento de fenol en un reactor ASBR, el cual tenía una concentración de biomasa de 20 g SSV·L<sup>-1</sup> (Donoso-Bravo *et al.*, 2009(c)). La concentración de biomasa en el interior del reactor se mantuvo en 12 g SSV·L<sup>-1</sup> durante todas las condiciones experimentales desarrolladas.

#### **4.2.4 Metodología analítica**

##### ***Métodos analíticos***

El pH fue medido online por un sensor de pH (OAKTON, WD-35801-00).

Las concentraciones de demanda química de oxígeno (DQOs) y alcalinidad (CaCO<sub>3</sub>) fueron medidas de acuerdo a Standard Methods (APHA, 1995). Los ácidos grasos volátiles (AGVs) fueron detectados y cuantificados mediante cromatografía gaseosa GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado con 30" x 4mm ID columna empacada GP 60/80 Carbopack C/0.3% Carbowax 20M/0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, St Louis, MO, US). El análisis fue llevado a cabo a 120°C, con nitrógeno como carrier gas (50 mL·min<sup>-1</sup>) y detector FID (200°C).

El metano fue medido igualmente por cromatografía gaseosa, usando un cromatógrafo de gas Clarus 500 (Perkin Elmer, Waltham, MA, US) equipado con columna de teflón Hayesep-Q, Supelco; 4 m x 1/8" OD.

##### ***Caracterización de la estructura de comunidades de archaeas en reactor ASBR diferentes condiciones de temperatura***

Se tomaron muestras por duplicado de biomasa del lodo sedimentado durante el último ciclo de operación. Posteriormente las muestras fueron mantenidas a -20°C para los futuros análisis.

El ADN fue extraído desde 0.5 mL de la muestra de lodo usando un kit de extracción Powersoil DNA, MO BIO Laboratories Inc (Carlsbad, CA, US), acorde a las instrucciones del proveedor. Posteriormente, la extracción de ADN fue verificada mediante electroforesis en gel a un 1.2%-agarosa.

La región V2-V3 16S rDNA de archaea fue amplificada por PCR usando los primers A109f 5'-ACT GCT CAG TAA CAC GT-3' (Groskopf *et al.*, 1998) and A515r-GC 5'-CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC-3' con GC clamp al extremo 5' (Lane, 1991). La amplificación de PCR fue llevada a cabo en 50  $\mu$ L con 1.25U GoTaq ADN Polimerasa (Promega, Madison, WI, US), 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M de cada primer, 10  $\mu$ M dNTP y 1 $\mu$ L template de ADN, en un termociclador GSI (G-Storm, Somerton, UK) a través de 35 ciclos de denaturación a 95°C (30 s), hibridación a 56°C (40 s) y elongación a 72°C (1 min) (Urra, 2009).

La amplificación por PCR fue verificada por electroforesis en gel a 1%-agarosa. Los productos de PCR (10 $\mu$ L) fueron separados por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) sobre un 8% gel policrilamida con un gradiente lineal que fue desde 30% a 50%, acorde al protocolo de Muyzer *et al.* (1993). Las soluciones de denaturación, fueron preparadas sobre la base de una solución de 100%- denaturación que contenía 7M de urea y 40% de formamida.

La migración fue realizada por 10 min a 200 V y posteriormente por 16 h a 85 V y 60°C, en buffer TAE 0.5X, usando el DCode System (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, US). El gel fue teñido con solución nitrato de plata acorde al protocolo de Sanguinetti *et al.* (1994), y capturado con PDQuest 2D (Bio-Rad Laboratories Inc).

La fotografía del gel fue analizada con el software Bionumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). La diversidad de Archaea fue computarizada por el índice Shannon H, tras la exclusión de ceros, acorde a:

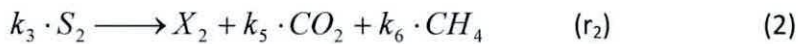
$$H = -\sum_i p_i \log(p_i), \text{ donde } p_i \text{ representa la intensidad de la banda } i^{\text{th}}.$$

La índice de similitud entre las muestras fue computarizada mediante el Índice de Jaccard en base a la intensidad y posición de las bandas. Las muestras se agruparon jerárquicamente según su nivel de similitud y se construyó un dendograma usando el método no ponderado grupo par con el promedio aritmético (UPGMA) vinculado.

#### 4.2.5 Determinación de parámetros cinéticos

Los resultados obtenidos fueron simulados mediante el modelo ADM<sub>2</sub> propuesto por (Bernard *et al.*, 2001). Este modelo asume que la digestión anaerobia puede ser clasificada en dos etapas, en el cual las comunidades microbianas presentes son clasificadas en dos grupos de características homogéneas. En una primera etapa, las bacterias acidogénicas (X<sub>1</sub>) consumen el sustrato orgánico (S<sub>1</sub>) y producen CO<sub>2</sub> y ácidos grasos volátiles (S<sub>2</sub>). Posteriormente, las comunidades metanogénicas (X<sub>2</sub>) consumen los ácidos grasos volátiles produciendo CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Bernard *et al.*, 2001).

Este modelo fue construido y ejecutado en MATLAB. Las ecuaciones consideradas fueron las siguientes:



$$r_1 = \mu_1 \cdot X_1 = \left( \mu_{M1} \cdot \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \right) \cdot X_1 \quad (3)$$

$$r_2 = \mu_2 \cdot X_2 = \left( \mu_{M2} \cdot \frac{S_2}{K_{S2} + S_2 + \frac{S_2^2}{K_{12}}} \right) \cdot X_2 \quad (4)$$

donde:

S<sub>1</sub>: Concentración de sustrato (g sDQO·L<sup>-1</sup>).

S<sub>2</sub>: Concentración de AGV (mmol HAC·L<sup>-1</sup>).

X<sub>1</sub>: Concentración de biomasa acidogénica (g SVV·L<sup>-1</sup>).

X<sub>2</sub>: Concentración de biomasa metanogénica (g SSV·L<sup>-1</sup>).

μ<sub>1</sub>: Velocidad específica de crecimiento acidogénica (d<sup>-1</sup>).

μ<sub>2</sub>: Velocidad específica de crecimiento metanogénica (d<sup>-1</sup>).

### 4.3 RESULTADOS

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el reactor ASBR a diferentes temperaturas de operación, presentando un análisis comparativo de los perfiles de degradación en el momento que el reactor alcanzó un estado estacionario a cada condición de temperatura estudiada (37, 31, 25 y 20°C).

Los resultados se irán presentando según los parámetros de degradación medidos directamente en el reactor, durante los tiempos de desarrollo de las cinéticas a cada temperatura, como concentración de materia orgánica, ácidos grasos volátiles, pH y producción de biogás.

Además se incluirán los resultados obtenidos del estudio de las comunidades microbianas de acuerdo al efecto generado por la disminución gradual de temperatura.

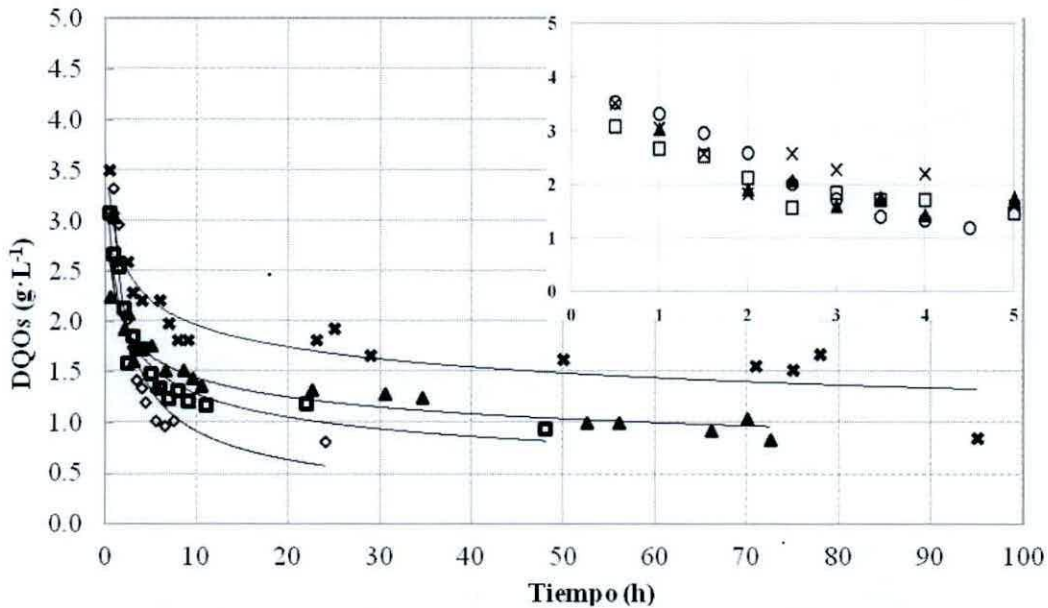
Finalmente con los datos obtenidos, se presentarán los resultados de simulaciones utilizando el modelo propuesto por Bernard *et al.* (2001), implementado en el software MATLAB.

#### 4.3.1 Consumo de materia orgánica (DQOs)

Para cada ciclo de operación, la etapa de reacción fue prolongada hasta obtener al menos un 65-70% de eliminación de materia orgánica medida como DQOs. En la Figura 4.4, se puede observar que el tiempo de la etapa de reacción va aumentando a medida que disminuye la temperatura, desde 24 h a 37°C, a 48 h, 72 h y 96 h a 31, 25 y 20°C respectivamente. El tiempo del ciclo va incrementando debido a la baja actividad metabólica, especialmente la baja actividad metanogénica, que promueve una acumulación de AGVs, generando una inhibición de la materia orgánica, por la alta concentración de ácidos (Enright *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2001). La tasa específica de eliminación inicial de DQOs disminuye desde 1.18 g DQOs·g SSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> a 37°C y 0.77, 0.54 y 0.50 g DQOs·g SSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> a 31, 25 y 20°C respectivamente.

Como se observa además en la Figura 4.4, la mayor tasa de degradación (lineal) fue observada durante las primeras 4-5 h de operación a las cuatro temperaturas estudiadas. En ese momento la velocidad de consumo de materia orgánica comienza

a disminuir muy lentamente lo que podría ser producto de la disminución de la velocidad de consumo de los AGVs presentes en el medio.



**Figura 4.4:** Cinética de consumo de materia orgánica operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37°C (O) 31°C (□), 25°C (▲), 20°C (×)). El gráfico superior representa un zoom de las primeras 5 horas del ciclo.

Otras investigaciones realizadas en reactores ASBR en las cuales se aplicó una concentración de materia orgánica (5 g DQO·L<sup>-1</sup>) en la alimentación, pero en este caso la fuente de carbono provenía de una agua residual de un matadero, operando a temperaturas de 30 y 25°C, a medida que disminuyeron la temperatura debieron aumentar el TRH, para mantener porcentajes de eliminación (Massé *et al.*, 2001), debido a la reducción de la velocidad de degradación al disminuir la temperatura.

Un parámetro de operación que se puede obtener de acuerdo al procedimiento experimental que fue desarrollado corresponde a la velocidad de carga orgánica (VCO) aplicada al reactor que es equivalente a la productividad, de acuerdo a la ecuación 4.1:

$$VCO = \frac{C_{mo} \cdot Va}{Vr \cdot TRH_e} \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde:

$C_{mo}$ : Concentración de materia orgánica alimentada (kg DQOs·m<sup>-3</sup>).

$V_a$ : Volumen alimentado por ciclo (m<sup>3</sup>).

$V_r$ : Volumen de reacción (m<sup>3</sup>).

La VCO aplicada para las cuatro temperaturas de estudio se muestra en la Tabla 4.3, donde se puede observar el aumento con la disminución de la temperatura.

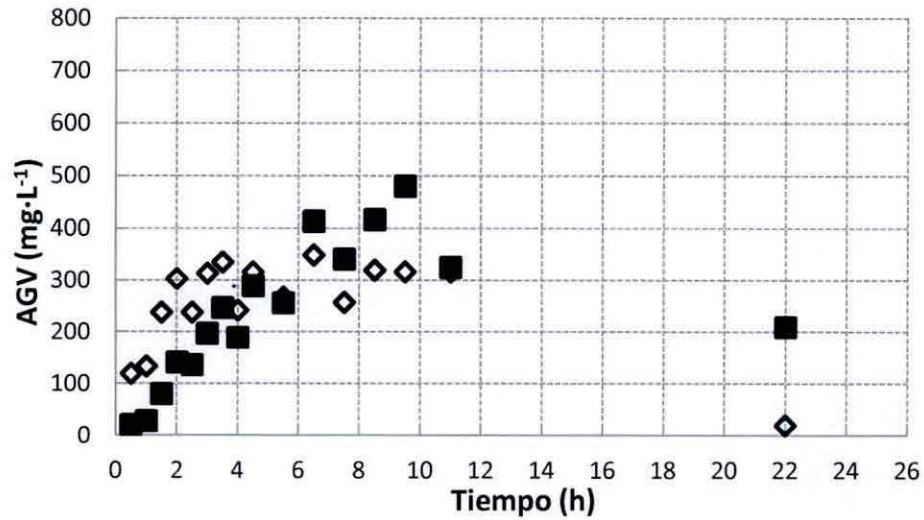
**Tabla 4.3:** VCO aplicada a reactor ASBR a diferentes temperaturas de operación.

Temperatura (°C)	VCO aplicada (kg DQOs·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup> )
37	3.0
31	1.5
25	1.0
20	0.75

#### 4.3.2 Ácidos Grasos Volátiles

Se realizaron mediciones de concentración de ácidos grasos volátiles durante los ciclos de operación a las cuatro condiciones de temperatura, donde se pudo detectar en todos los ciclos la presencia de ácido propiónico y acético, y solamente en el último ciclo a 20°C se detectó ácido valérico pero en concentraciones muy inferiores si son comparadas con la de los otros ácidos presentes.

La Figura 4.5 presenta la evolución de la concentración de AGVs para la temperatura de 37°C.



**Figura 4.5:** Concentración de AGVs operando en estado estacionario a 37°C (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■)).

Las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8 muestran el perfil de AGVs para 31, 25 y 20°C respectivamente, donde la concentración de ácido propiónico es superior a la de ácido acético durante todo el tiempo de reacción y la concentración de acético en las últimas horas es muy próxima a cero. En la Figura 4.8 también se observa la aparición de ácido valérico e iso-butírico. Esta diferencia con respecto al resto de temperaturas puede deberse a una modificación en la ruta metabólica de los microorganismos al estar operando en condiciones próximas a la psicrófilas.

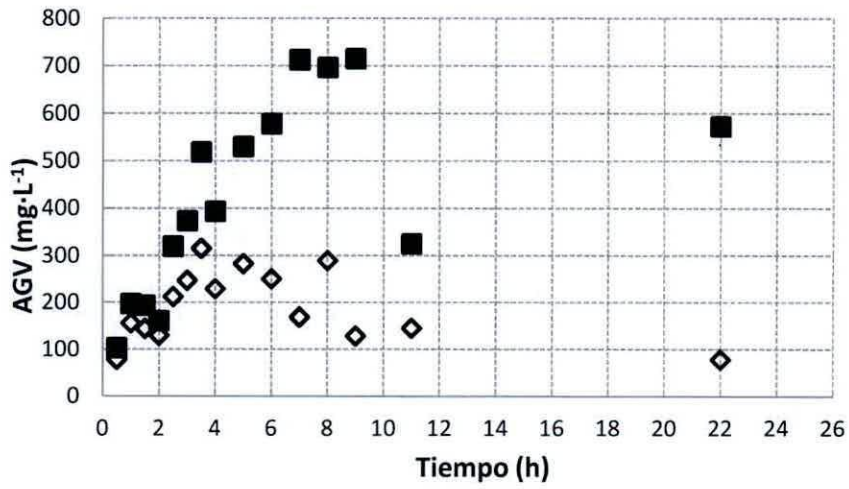


Figura 4.6: Concentración de AGVs operando en estado estacionario a 31°C (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■)).

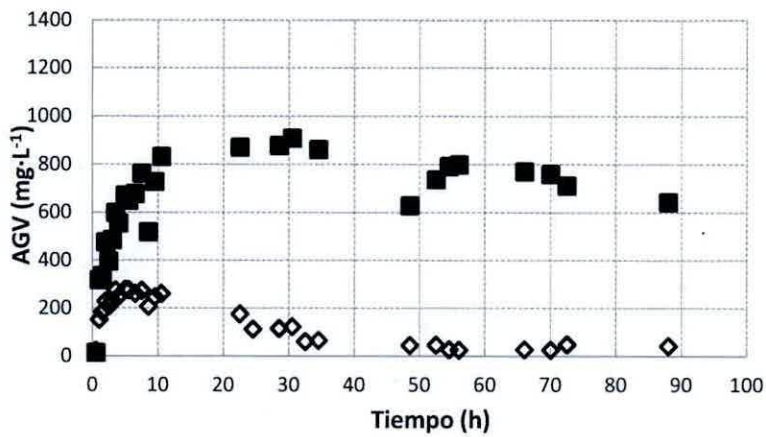
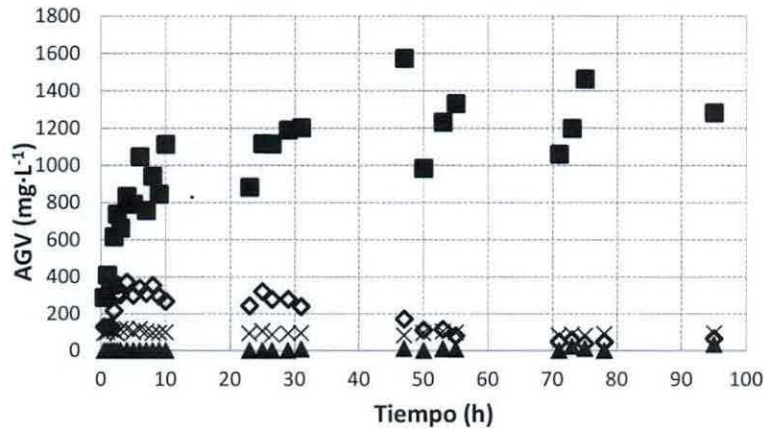


Figura 4.7: Concentración de AGVs operando en estado estacionario a 25°C, (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■)).



**Figura 4.8:** Concentración de AGV operando en estado estacionario a 20°C (Ácido acético (◇), ácido propiónico (■), i-butírico (▲) y de ácido valérico (×)).

Bajo las cuatro temperaturas ensayadas, la concentración de ácido propiónico fue significativamente mayor que la concentración de ácido acético. La concentración de ácido acético aumentó al comienzo de la etapa de reacción hasta alcanzar un máximo aproximado de  $370 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  alrededor de 5 horas, y luego disminuyó hasta el final. El valor de la concentración de ácido acético máxima y el momento en que se alcanzó la máxima no cambió significativamente con la temperatura entre 20 y 37°C. La concentración de ácido propiónico también aumentó a un máximo en el inicio de la etapa de reacción. Sin embargo, el valor de la concentración máxima de ácido propiónico aumentó con la disminución de la temperatura, a partir de  $480 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a 37°C a  $1580 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a 20°C. Para las temperaturas más altas (31-37°C), la concentración de ácido propiónico disminuyó con el tiempo hasta el final de la fase de reacción. Sin embargo, para las temperaturas más bajas (20-25°C), la concentración de ácido propiónico no disminuyó significativamente y se mantuvo alrededor de su valor máximo hasta el final de la etapa de reacción, lo que sugiere que por debajo de un umbral de temperatura dado, el ácido propiónico tendía a acumularse en el reactor.

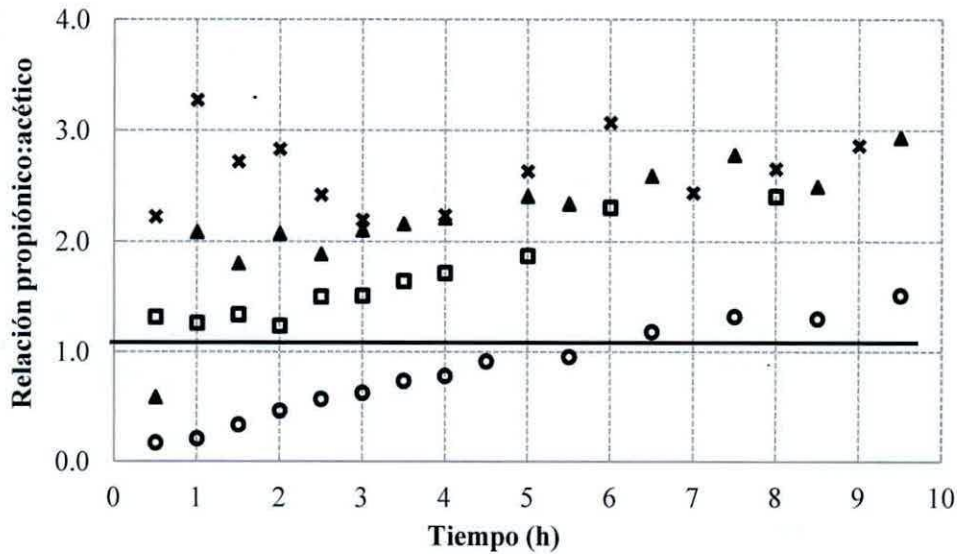
A partir de los resultados obtenidos, se puede calcular, durante las primeras horas del ciclo de operación del reactor, la velocidad de acumulación de ácido acético y propiónico, como se muestra en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4:** Velocidades específicas de acumulación de ácido acético y propiónico a 37, 31, 25 y 20°C

Temperatura (°C)	Velocidad de acumulación (g Ac.Acético·g SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Velocidad de acumulación (g Ac. Propiónico·g SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )
37	0.06	0.12
31	0.06	0.18
25	0.05	0.13
20	0.09	0.25

Como se puede observar en la Tabla 4.4, a medida que disminuye la temperatura aumenta la velocidad específica de acumulación de ácido propiónico, efecto que se destaca más, al operar el reactor a 20°C, cuando prácticamente se duplica referido a la temperatura óptima, lo que genera la acumulación de este ácido. La velocidad de acumulación de acético no presenta una tendencia clara, si bien parece verse afectada a la temperatura más baja.

Una forma de ver reflejado el efecto de la temperatura en el comportamiento de la concentración de AGVs la puede otorgar la relación de concentración propiónico:acético (Marchaim *et al.*, 1993). Para cada punto de muestreo durante un periodo de 11 horas de operación (intervalo en el cuál se apreciaron valores más bajos de pH) de los distintos ciclos a las diferentes temperaturas, se muestra en la Figura 4.9.



**Figura 4.9:** Relación concentración propiónico: acético operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37°C (O), 31°C (□), 25°C (▲), y 20°C (×)). La línea indica el valor límite de 1.

Con respecto al valor del ratio en el tiempo, éste se encontró por encima de 1.0 a medida que disminuyó la temperatura, destacando una mayor acumulación de propiónico en comparación con el ácido acético durante la operación del reactor ASBR, especialmente a bajas temperaturas. Esta relación se mantuvo por encima de 1 hasta el final del ciclo para todas las temperaturas ensayadas. Esto se debe a que las comunidades microbianas presentes no asimilan el ácido propiónico tan eficientemente como el ácido acético, lo que se encuentra reportado en estudios anteriores (Marchaim *et al.*, 1993; Gerardi, 2003; Collins *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008).

Otros estudios han informado de que los cambios en el nivel de AGVs supone un buen parámetro para detectar una inestabilidad del proceso en respuesta a los cambios en la carga hidráulica, carga orgánica o la temperatura (Ahring *et al.*, 1995). Las concentraciones de AGV individuales son un indicador eficaz para la vigilancia del proceso de digestión anaerobia y permite determinar el grado de desequilibrio en

respuesta a las perturbaciones, reflejado en las concentraciones de propionato persistentes durante más tiempo después de la introducción de la perturbación (Boe *et al.*, 2010). Por lo tanto, cuando la temperatura disminuye, se produce una mayor acumulación de propiónico que puede ser interpretado como un indicador de cambio en la actividad, generando una reducción de la etapa metanogénica, acumulando más propionato comparación con otros ácidos grasos presentes. Adicionalmente, mediante un tratamiento termodinámico, se puede analizar este proceso de acumulación con más detalle, ya que las reacciones endergónicas (en condiciones estándar) de descomposición de propionato en acetato,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , son energéticamente más favorables a mayor temperatura (Appels *et al.*, 2008).

En trabajos previos, se ha reportado ensayos de inhibición por AGVs (Siegert *et al.*, 2005), observándose que la fermentación de glucosa fue ligeramente inhibida a concentraciones de AGVs superiores a  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . El efecto inhibitor sobre la producción de biogás y también en la relación de metano a dióxido de carbono fue evidente por encima de  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , valores muy superiores a los alcanzados en nuestra investigación. Sin embargo, otros estudios sobre la co-digestión de purines con residuos de pescado y biodiesel informó que concentraciones de 1 a  $2 \text{ g AGV}\cdot\text{L}^{-1}$  produjeron inhibición de los microorganismos metanogénicos presentes, disminuyendo la producción de biogás (Regueiro *et al.*, 2012).

### 4.3.3 Evolución del pH

A continuación se muestran los valores obtenidos de pH medidos de manera online a las diferentes temperaturas de estudio.

En la Figura 4.10, el valor del pH desciende al comienzo del ciclo de reacción a un valor mínimo (6.7-6.8) después de las 5 h aproximadamente, en cada una de las temperaturas estudiadas. Que el valor de pH disminuya al inicio de la etapa de reacción indicaría una mayor concentración de  $\text{CO}_2$  en el biogás, lo cual fue confirmado mediante cromatografía gaseosa, obteniéndose 50% de  $\text{CO}_2$  en el biogás a  $37^\circ\text{C}$  después de las 5 h.

El pH en el reactor fue controlado y tamponado, por lo que no existe una correlación entre el tiempo del valor mínimo de pH y el tiempo de mayor concentración de AGVs. A pesar de esto, el pH incrementa y tiende a estabilizarse alrededor de 7.1 concordando con una alta proporción de  $\text{CH}_4$  en el biogás (60-70%, a  $37^\circ\text{C}$  después de 10 h).

Moletta *et al.* (1994) dispusieron de un sistema de control automático de pH en un reactor anaerobio de lecho fluidizado con el fin de evaluar que ocurre con pequeños cambios en el pH. En uno de los test inyectaron HCl para disminuir el pH desde 6.8 a 6.6 y se obtuvo una respuesta inmediata, aumentando la producción de gas a la par que un incremento en la concentración de  $\text{CO}_2$  en el biogás. Al probar con adición de NaOH para elevar el pH hasta 7.4 observaron un aumento en la producción de biogás pero la concentración de  $\text{CO}_2$  disminuyó sustancialmente, lo que sugiere que las variaciones en la composición fase gaseosa son una consecuencia del cambio de solubilidad del  $\text{CO}_2$  con el pH.

La variación de pH durante la operación del reactor ASBR fue correlacionada con la producción y composición de biogás. Se pudo observar que bajo todas las temperaturas estudiadas, el valor de pH siempre permaneció bajo el umbral de inhibición de la metanogénesis, el cual corresponde a 8.0 (Chen *et al.*, 2008).

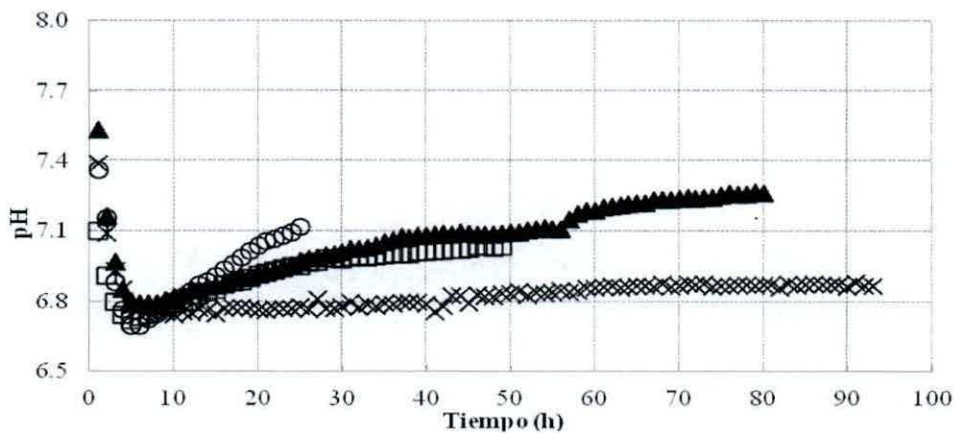
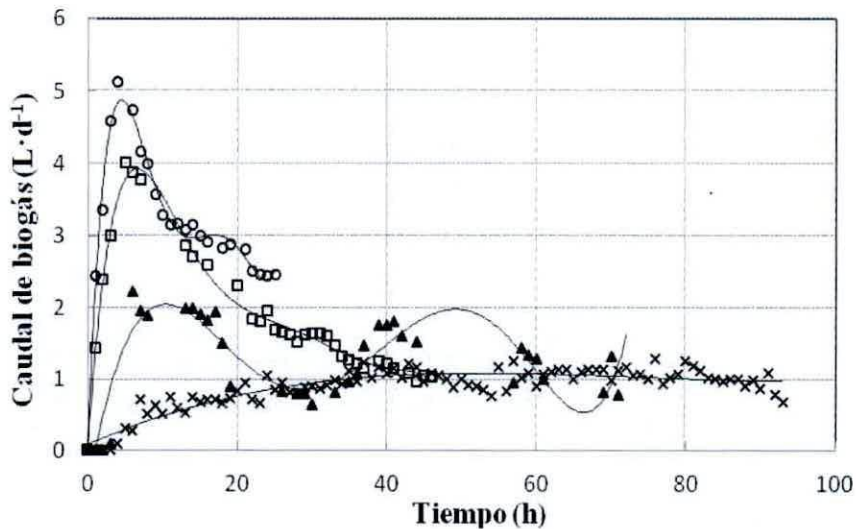


Figura 4.10: pH operando en estado estacionario a diferentes temperaturas ( $37^\circ\text{C}$  (○),  $31^\circ\text{C}$  (□),  $25^\circ\text{C}$  (▲),  $20^\circ\text{C}$  (×)).

Según Borja *et al.*, (1995), un shock de cambio de temperatura puede producir disminución inmediata del pH en el reactor, el cual podría estabilizarse en un valor significativamente próximo al previo estado estacionario. Esta disminución del pH es debida al incremento de la concentración de AGVs que tendió a acercarse a un nuevo nivel durante la operación al disminuir la temperatura (desde 35°C a 20°C por 12 h). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el incremento del valor de la DQO en el influente, es debido al incremento de la concentración de AGVs y sólidos suspendidos (SS), como así también por la presencia de compuestos en el influente difíciles de ser convertidos (Sanchez *et al.*, 2001; Leitão *et al.*, 2006).

#### **4.3.4 Producción de biogás**

En el reactor ASBR operado en un rango de temperatura entre 25 y 37°C, la tasa de producción de biogás presenta un máximo al inicio del ciclo a las 5 h. La tasa máxima de producción de biogás se incrementa con la temperatura, registrando valores de 5.2, 4.0 y 2.2 L·d<sup>-1</sup>, a 37, 31 y 25°C, respectivamente. Posteriormente, la tasa de producción de biogás disminuye y se estabiliza al final del ciclo en 2.5±0.04, 1.2±0.05 and 0.9±0.2 L·d<sup>-1</sup>, a 37, 31 t 25°C respectivamente (Figura 4.11). A 20°C no fue detectado éste máximo, sino que incrementa lentamente para posteriormente permanecer constante en el tiempo (0.8±0.1 L·d<sup>-1</sup>), indicando que la actividad metanogénica se ve reducida a esta temperatura.



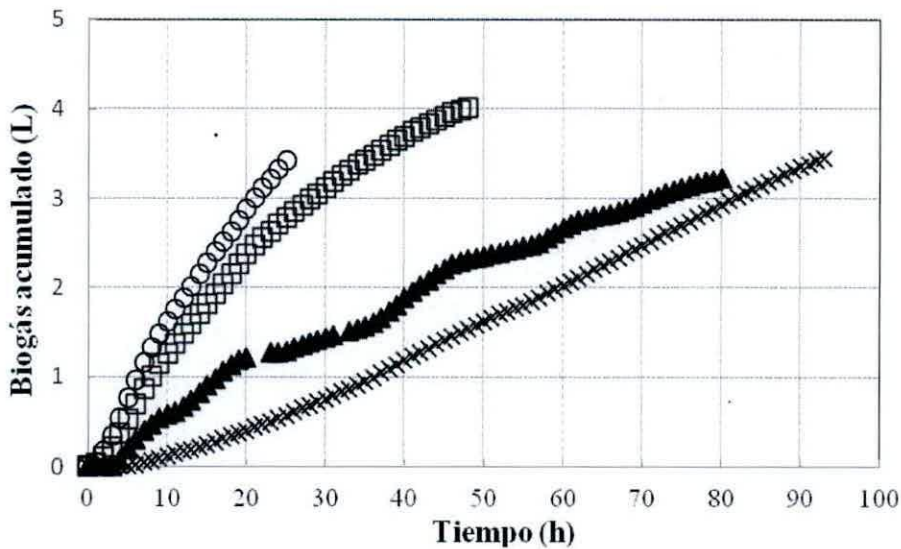
**Figura 4.11:** Caudal de biogás operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37°C (○); 31°C (□), 25°C (▲), 20°C (×)).

En la Figura 4.12, se observa la influencia de la temperatura de operación sobre la producción de biogás. A partir de la pendiente de las curvas, se calculó la tasa de producción de biogás disminuyendo desde  $0.17 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  a 37°C, y a 0.13, 0.07 y 0.04 a 31, 25 y 20°C, respectivamente, mostrando que la etapa metanogénica fue muy sensible a los cambios de temperatura, y que afectan en gran medida a la tasa de producción de biogás.

Estos resultados resultan acorde con los obtenidos por Chae *et al.* (2008), durante la digestión anaerobia de estiércol de cerdo a diferentes temperaturas en rango mesófilo (25-35°C). La producción de biogás fue influenciada por la temperatura en una tendencia no lineal, siendo el rendimiento de metano a 25°C sólo el 82.6% del obtenido a 35°C. Sin embargo, el rendimiento en el rango de temperaturas mesófilas, 25-35°C, a mayor temperatura, mayor fue el rendimiento en metano. Los rendimientos a 30 y 35°C no fueron tan diferentes.

El efecto de la temperatura en la tasa de producción de biogás puede ser correlacionada con la relación propiónico: ácido acético (Figura 4.9). A temperaturas

más bajas, siempre se obtuvo una mayor proporción de propiónico: ácido acético, entre 1 y 3, que se mantuvo casi constante a lo largo de la longitud de cada ciclo.



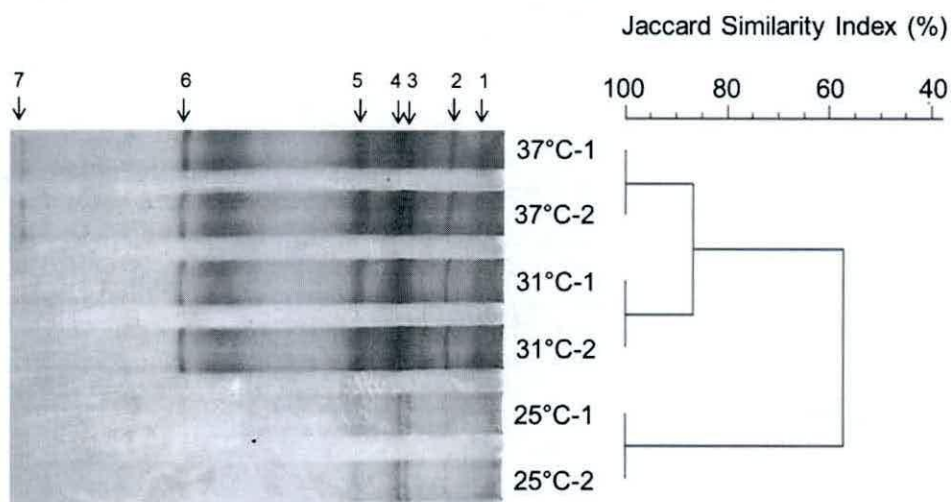
**Figura 4.12:** Biogás acumulado a las diferentes temperaturas (37°C (O), 31°C (□), 25°C (▲), 20°C (×)).

Por otra parte, es importante destacar que, por ciclo, se alimentan con 15 g DQOs, por lo que el valor teórico de producción de biogás corresponde a 7.5 L. Considerando una composición de biogás de 60% CH<sub>4</sub> y 40% CO<sub>2</sub>, entre el 10-15% de la fuente de carbono estaría siendo utilizada para mantención celular.

#### 4.3.5 Cambio de la estructura de la diversidad de archaeas

En este estudio se consideran a las archaeas, que son las responsables de la etapa metanogénica en la digestión anaerobia. Como se muestra en la Figura 4.13, aparecen siete diferentes bandas en el perfil obtenido mediante DGGE, a partir de las muestras del reactor ASBR operando a 37°C, lo que refleja una alta diversidad microbiana con un índice de Shannon de  $2.96 \pm 0.02$ . Al disminuir la temperatura a 31°C, desapareció la banda número 7 y en consecuencia la diversidad de archaeas disminuyó ligeramente ( $H=2.56 \pm 0.01$ ). Sin embargo, las bandas restantes mantienen una intensidad similar, lo cual resulta comparable con la tasa de producción de

metano ligeramente inferior a la de la temperatura óptima (37°C). Estos resultados concuerdan con el análisis de dendograma de la estructura final de archaeas a 37 y 31°C, que muestra una similitud en más de un 87%.



**Figura 4.13:** Perfiles de DGGE de la población archaeas operando en estado estacionario a diferentes temperaturas (37, 31 y 25° C). Las muestras duplicadas se distinguen por el número 1 o 2 junto a la temperatura en el nombre de la muestra. Las muestras son ordenadas de acuerdo a su similitud pairwise (coeficiente de Jaccard) y el orden está representado por dendograma UPGMA.

Cuando la temperatura descendió hasta 25°C, las bandas 1 y 6 desaparecieron por completo, lo que implica un menor índice de Shannon ( $2.30 \pm 0.01$ ). En cambio las comunidades de arqueas correspondientes a las bandas 2-5 se mantuvieron a 25°C. Su intensidad menor explica la menor actividad metanogénica del cultivo. En consecuencia, la similitud de la comunidad de 25°C es sólo el 57% de la correspondiente a 37°C.

La reducción de la temperatura de 31-25°C induce cambios más pronunciados en la comunidad que la reducción de la temperatura de 37-31°C, como respuesta a la acumulación de AGVs en el biorreactor (Connaughton *et al.*, 2006).

Se ha reportado que las poblaciones de archaeas se ven afectadas al ser sometidas a fluctuaciones de temperatura (Apple *et al.*, 2008). Mientras que bajo condiciones mesofílicas la contribución a la producción de metano se atribuye principalmente a los microorganismos metanogénicos acetoclásticos, varios estudios (Conrad *et al.*, 1990; Connaughton *et al.*, 2006; Enright *et al.*, 2007) indicaron que existe una mayor contribución de metanógenos hidrogenotróficos a temperaturas bajas (alrededor de 10°C), que puede corresponder a la mayor solubilidad de H<sub>2</sub> a bajas temperatura (Lettinga *et al.*, 2001; Kotsyurbenko *et al.*, 2005; McKeown *et al.*, 2009).

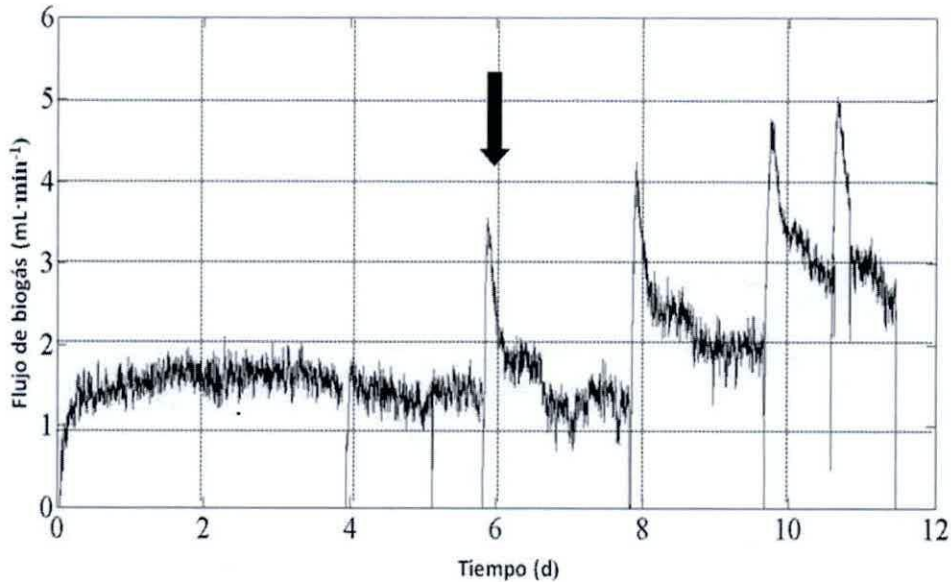
Ahora bien, a 25°C, existe una actividad reducida de los microorganismos hidrogenotróficos al no ser equilibrado el balance hacia una mayor disponibilidad de H<sub>2</sub> debido a la condición de temperatura estudiada. Como consecuencia de esto, los microorganismos metanogénicos acetoclásticos parecen ser predominantes en el sistema de cultivo.

#### **4.3.6 Retorno a la temperatura óptima de digestión anaerobia de 37° C**

Una vez completado el estudio de valores de temperaturas sub-óptimas de operación, se volvió a operar a la temperatura de 37°C. El volumen acumulado de biogás generado después del tercer ciclo de operación a 37°C fue de 3.25 L, lo que indica una notable recuperación de la producción de biogás alcanzada después de diez ciclos durante la primera operación a 37°C.

A pesar de que el ASBR se hizo funcionar en condiciones sub-óptimas para la digestión anaeróbica (van Lier *et al.*, 1997), el sistema fue capaz de recuperar rápidamente su rendimiento inicial de producción de biogás. Además, el tiempo requerido para alcanzar la eficiencia de producción de biogás alta y estable era más corto que para la primera operación a 37°C, revelando así una adaptación de la comunidad ASBR a variaciones de temperatura.

La Figura 4.14 muestra la evolución de la producción de biogás a diferentes ciclos al cambiar la temperatura de 20°C a 37 °C. El primer ciclo se corresponde con el último perfil de biogás a la temperatura de 20°C; el siguiente representa al primer ciclo de operación a 37°C, donde todavía se continúa observando el efecto de la disminución de la temperatura sobre los microorganismos metanogénicos.



**Figura 4.14:** Producción de biogás a diferentes ciclos al cambiar la temperatura de 20 a 37°C (indicada por la flecha).

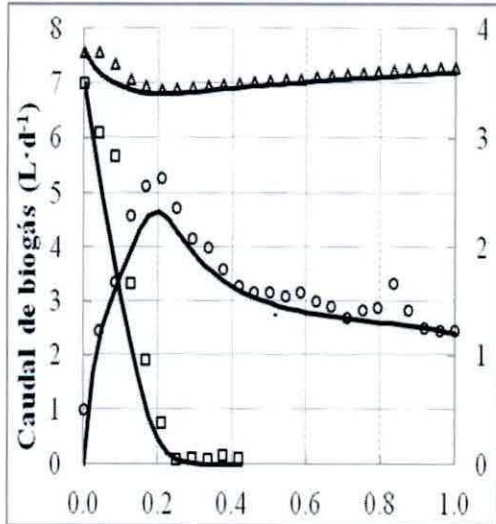
A medida que van transcurriendo el número de ciclos de operación a 37°C el perfil se va asemejando cada vez más al obtenido cuando se comenzó el estudio a esta misma temperatura, donde en condiciones de estado estacionario se alcanzaron porcentajes de eliminación cercanos al 65-70%.

#### 4.3.7 Determinación de parámetros cinéticos

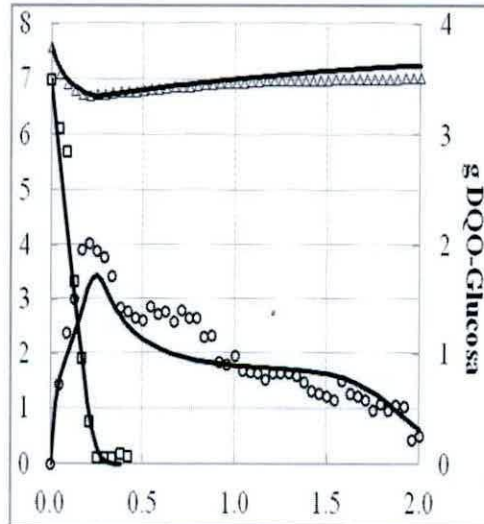
Con el fin de obtener una mejor comprensión de la influencia de la temperatura sobre la cinética de degradación de proceso, los datos obtenidos a las cuatro temperaturas, fueron ajustados al modelo descrito previamente por Bernard *et al.* (2001). Como se observa en la Figura 4.15, a temperaturas de 37, 31 y 25°C, el modelo describe correctamente el perfil de las variables más relevantes (concentración de sustrato, producción de biogás y pH). Sin embargo a 20°C, el modelo no fue capaz de reproducir la producción de biogás. A esa temperatura, el

flujo de biogás producido era muy bajo y probablemente la exactitud del medidor de flujo no era suficiente.

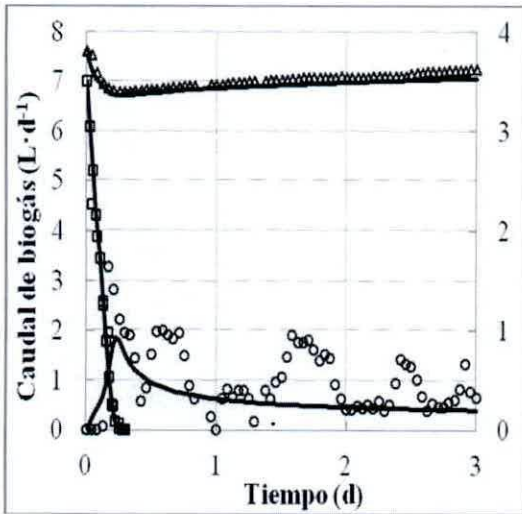
A)



B)



C)



D)

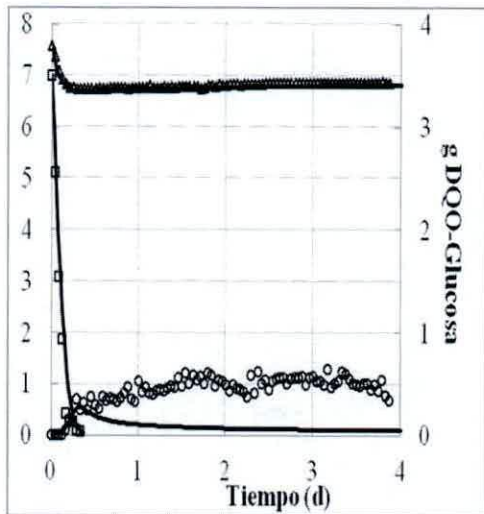


Figura 4.15: Ajuste de datos de producción de biogás (O), glucosa (□) y pH (Δ) a 37°C (A), 31°C (B), 25°C (C) y 20°C (D).

El modelo requirió asumir parámetros iniciales de concentración la biomasa acidogénica ( $X_1$ ) y metanogénica ( $X_2$ ). En todos los casos, los mejores resultados fueron obtenidos con valores de  $0.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para la actividad acidogénica y  $7.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para la actividad de la biomasa metanogénica. Las diferencias entre estos dos valores pueden atribuirse a la diferente actividad específica de cada uno de éstos.

En la Tabla 4.5 se muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la simulación. Como se podía esperar, la actividad específica máxima de los microorganismos acidogénicos fue casi dos órdenes de magnitud mayor que la correspondiente a los metanogénicos, ya que estos microorganismos parecen ser más sensibles a la temperatura que los acidogénicos. La concentración de sustrato máxima requerida para los microorganismos acidogénicos para una transformación eficiente, indicada por el valor de  $K_s$ , es notablemente inferior a la de los metanógenos. Los diferentes efectos de la temperatura sobre el valor de  $K_s$  de los microorganismos metanogénicos pueden explicarse considerando que a partir de  $31^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$  se produce un cambio de la presencia relativa de los diferentes grupos. Como se indicó en el apartado anterior, la estructura de la comunidad de archaeas resultó severamente afectada por los cambios de temperatura y de hecho, algunas archaeas, probablemente con una mayor afinidad por el sustrato y con baja velocidad específica de crecimiento, desaparecen del cultivo. Los valores de la constante de inhibición,  $K_{i2}$ , no fueron significativas.

**Tabla 4.5:** Parámetros cinéticos aplicados a la simulación a 37, 31 and  $25^\circ\text{C}$

Parámetros	$37^\circ\text{C}$	$31^\circ\text{C}$	$25^\circ\text{C}$
$\mu_{M1}$ ( $\text{d}^{-1}$ ).	0.84	0.53	0.59
$\mu_{M2}$ ( $\text{d}^{-1}$ ).	0.01	0.006	0.003
$K_{s1}$ ( $\text{g DQO-gluc}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.73	0.42	0.35
$K_{s2}$ ( $\text{mg DQO-Ac}\cdot\text{L}^{-1}$ )	3.15	1.64	11.99

\* No se mostraron los parámetros cinéticos a  $20^\circ\text{C}$ , ya que no presentaron un buen ajuste.

Banik *et al.* (1997) estudiaron el comportamiento de un reactor ASBR trabajando a temperaturas entre 5 y  $25^\circ\text{C}$ , a 24, 16, 8, 6 horas de tiempo de residencia hidráulico (TRH) durante un período de dos años y encontraron que la tasa máxima de

crecimiento específico ( $\mu_x$ ) disminuyó con la disminución de la temperatura en un rango de 0.22 a 0.15 d<sup>-1</sup> entre 25 y 15°C respectivamente. Como estos autores consideran un modelo de un solo paso, el valor de las constantes cinéticas no son comparables con los nuestros.

La estructura de las comunidades de archaeas parece verse afectada no sólo por los cambios de temperatura, sino también en el periodo de funcionamiento y en la hidráulica del reactor. McKeown *et al.* (2009) encontraron que después de un período muy largo de tiempo de 1200 d trabajando en un reactor híbrido, las comunidades de archaeas se adaptaron bien a las condiciones psicrófilas (4°C), siendo el SMA (actividad metanogénica específica) de los lodos (medido a 37°C) más alto que el correspondiente al inóculo inicial. Las discrepancias aparentes entre esta conclusión y la obtenida a partir de nuestro trabajo se puede atribuir a varios efectos: i) La temperatura. Además del efecto de la temperatura sobre la cinética, los microorganismos hidrogenotróficos son favorecidos contra los metanogénicos acetoclásticos a temperatura más bajas debido al importante incremento en la solubilidad del H<sub>2</sub> a temperaturas inferiores a 4°C. ii) Tiempo de reacción. En nuestro trabajo, la menor temperatura de operación, el largo ciclo de operación aplicado (96 h vs 2 h como es el caso de McKeown *et al.* (2009)). Esta estrategia podría haber favorecido a los microorganismos metanogénicos acetoclásticos, los cuales presentan tasas de crecimiento más bajas. De hecho, los valores obtenidos de  $\mu_x$  de acuerdo al modelo que utilizamos son bastante similares a los reportados para *Methanosarcina* o *Methanosaeta* (Pavlostathis *et al.*, 1991; De Vrieze *et al.*, 2012). iii) La concentración del sustrato en el reactor es mayor en nuestro caso (aproximadamente 1.5 g DQO·L<sup>-1</sup>) que en el de McKeown *et al.* (2009) (aproximadamente 0.5 g DQO·L<sup>-1</sup>), lo que favorece también el rápido desarrollo de los microorganismos metanogénicos acetoclásticos.

#### 4.4 CONCLUSIÓN

La duración de la etapa de reacción en ASBR tuvo que ampliarse cuando la temperatura se redujo, desde 24 horas a 37°C, a 48 h, 72 h y 96 h a 31°C, 25°C y 20°C, respectivamente para mantener una eliminación similar de DQOs. La disminución de temperatura en periodos cortos de operación disminuye la tasa de producción de biogás, aumenta la acumulación de ácido propiónico y reduce la eficiencia de eliminación de materia orgánica.

A temperaturas de 37, 31 y 25°C, el modelo propuesto describe correctamente el perfil de las variables más relevantes (concentración de sustrato, producción de biogás y pH). Sin embargo a 20°C, el modelo no fue capaz de reproducir la producción de biogás. A esa temperatura, el flujo de biogás producido era muy bajo y probablemente la exactitud del medidor de flujo no era suficiente.

La estructura de las comunidades de archaeas se ve muy afectada por las bajas temperaturas de operación en periodos cortos de tiempo en el rango de 37°C a 20°C, siendo los microorganismos hidrogenotróficos más afectados que los acetoclásticos. Este resultado parece contradictorio con otros obtenidos en el estudio de operaciones a temperaturas significativamente más bajas. Esta discrepancia puede atribuirse a tres efectos: i) La solubilidad de H<sub>2</sub> a 25°C es mucho más baja que a 4°C. ii) Altos tiempos de reacción favorecen a los microorganismos acetoclásticos frente a los hidrogenotróficos y iii) Mayor concentración de AGVs también favorece la actividad acetoclástica.

#### 4.5 REFERENCIAS

- Alonso, J. Identificación de poblaciones microbianas mediante metodologías de biología molecular. 2009. JNTecnologías Avanzadas para el Tratamiento de Aguas Residuales NOVEDAR. Consolider. Volumen II. Editora: Anuska Mosquera Corral.
- Alvarez, R. and Lidén, G. 2009. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass and Bioenergy*, 33(3), 527–533.
- APHA, 1995. Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Appels, L.; Baeyens, J.; Degrève, J.; Dewil, R. 2008. Principles and potencial of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Process in Energy and Combustion Science* 34: 755-781.
- Banik, G. C; Viraraghavan, T.; Dague, R. 1997. Low Temperature Effects on Anaerobic Microbial Kinetic Parameters. *Environmental Technology*, 19: 5, 503 — 512.
- Bergamo, C. M., Di Monaco, R., Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A. D., Zaiat, M., Foresti, E. 2009. Effects of temperature at different organic loading levels on the performance of a fluidized-bed anaerobic sequencing batch bioreactor. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(3), 789–796.
- Bernard, O.; Hadj-Sadok, Z.; Dochain, D.; Genovesi, A.; Steyer, J. 2001. Dynamical model development and parameter identification for an anaerobic wastewater treatment process. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(4): 424-438.
- Boe, K.; Batstone, D.; Steyer, J.P.; Angelidaki, I. 2010. State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water Research* Volume 44, Issue 20. Pages 5973-5970.
- Borja, R., Banks, C.J. 1995. Response of an anaerobic fluidized bed reactor treating ice-cream wastewater to organic, hydraulic, temperature and pH shocks. *Journal of Biotechnology* 39 (3), 251–259.
- Borja, R., Martín, a, Banks, C. J., Alonso, V., Chica, A. 1995. A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 88(1), 13–8.

- Cha, G.C., Noike, T., 1997. Effect of rapid temperature change and HRT on anaerobic acidogenesis. *Water Science and Technology* 36(6–7): 247–253.
- Chae, K. J., Jang, A., Yim, S. K., & Kim, I. S. 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource technology*, 99(1), 1–6.
- Chamy, R.; Carrera, J.; Jeison, D.; Ruiz, G. 2003. *Avances en Biotecnología ambiental: Tratamiento de Residuos Líquidos y Sólidos. Volumen 2. Ediciones Universitarias, Valparaíso, Chile.*
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044–64.
- Chong, S. C., Yitai, L., Cummins, M., Valentine, D. L., Boone, D. R. (n.d.). *Methanogenium marinum* sp. nov., a H<sub>2</sub>-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H<sub>2</sub> utilization. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 263–270.
- Collins, G.; Foy, C.; McHugh, S.; Mahony, T.; O’Flaherty, V. 2005. Anaerobic biological treatment of phenolic wastewater at 15-18 °C. *Water Research* 39: 1614-1620.
- Connaughton, S., Collins, G., & O’Flaherty, V. 2006. Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18 degrees C. *Water research*, 40(5), 1009–17.
- Conrad, R., Wetter, B. 1990. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria, 94–98.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., Verstraete, W., 2012. *Methanosarcina*: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource technology* 112, 1–9.
- Donoso-Bravo, A., Rosenkranz, F., Ruiz-Filippi, G., and Chamy, R. 2009(a). "Development and validation of a simplified model for the anaerobic degradation of phenol.". *Water Science & Technology—WST* | 60.5 |
- Donoso-Bravo, A.; Carballa, M.; Ruiz-Filippi, G.; Chamy, R. 2009(b). Treatment of low strength sewage with high suspended organic matter content in an anaerobic sequencing batch reactor and modeling application. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458.
- Donoso-Bravo, A; Rosenkranz, F.; Valdivia V.; Ruiz-Filippi, G.; Chamy, R. (2009)(c); Anaerobic sequencing batch reactor as an alternative for the biological treatment of wine distillery effluents. *Water Science & Technology—WST* | 60.5 | 2009.

- Dague, R. R.; Banik, G. C. and Ellis, T. G. 1998. Anaerobic sequencing batch reactor treatment of dilute wastewater at psychrophilic temperatures. *Water Environment Research* 70(2): 155-160.
- Enright, A.-M., McGrath, V., Gill, D., Collins, G., & O'Flaherty, V. 2009. Effect of seed sludge and operation conditions on performance and archaeal community structure of low-temperature anaerobic solvent-degrading bioreactors. *Systematic and applied microbiology*, 32(1), 65-79.
- Enright, A.-M., Collins, G., & O'Flaherty, V. 2007. Temporal microbial diversity changes in solvent-degrading anaerobic granular sludge from low-temperature (15 degrees C) wastewater treatment bioreactors. *Systematic and applied microbiology*, 30(6), 471-82.
- Gerardi, Michael H. 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digester*. Wastewater Microbiology Series. 1ª edición. pp 51-58, 89-92.
- Grosskopf, R., Janssen, P. A. & Liesack, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol*; 64, 960-969.
- Kotsyurbenko OR. (2005) Trophic interactions in the methanogenic microbial community of lowtemperature terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 53: 3-13.
- Kim, S.H.; Han, S.K.; Shin, H.S. 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem* 41 (1): 199-207.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Le Marc, Y.; Huchet, V.; Bourgeois, C.M.; Guyonnet, J.P.; Mafart, P; Thuault, D. 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73: 219-237.
- Leitao, R.C.; Van Haandel, A.C.; Ziemann, G.; Lettinga, G. 2006. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. *Bioresource Technology* 97: 1105-1118.
- Lettinga, G., Rebac, S., & Zeeman, G. 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in biotechnology*, 19(9), 363-70.

- Lettinga G.; van Velsen, A.F.M.; Hobma, S.W.; de Zeeuw, W., Klapwijk, A. 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 22: 699-734.
- Lettinga, G.; Rebac, S.; Parshina, S.; Nozhevnikova, A.; Van Lier, J.B. and Stams, A.J.M. 1999. High rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1696-1702.
- Maharaj, I., & Elefsiniotis, P. 2001. The role of HRT and low temperature on the acid-phase anaerobic digestion of municipal and industrial wastewaters. *Bioresource Technology*, 76(3), 191-7.
- Marchaim, U.; Krause, C. 1993. Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 43: 195-203.
- Massé, D.; Masse, L. 2001. The effect of temperature on slaughterhouse wastewater treatment in anaerobic sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 76: 91-98.
- Massé, D. 2003. The effect of temperature fluctuations on psychrophilic anaerobic sequencing batch reactors treating swine manure. *Bioresource Technology*, 89(1), 57-62.
- Metcalf and Eddy. 1995. *Procesos biológicos unitarios*. En: *Ingeniería de aguas residuales Tratamiento, vertido y reutilización*. 3ª edición. pp 480-485; 95. España: Mcgraw Hill.
- McKeown RM, Scully C, Mahony T, Collins G, O'Flaherty V. 2009. Long-term (1243 days), low temperature (4-15 °C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: bioprocess performance and physiological characteristics. *Water Research* 43: 1611-1620
- Moletta, R.; Escoffier, Y.; Ehlinger, F.; Coudert, J.; Leyris, J. 1994. Online automatic control system for monitoring an anaerobic fluidized bed reactor: response to organic overload. *Water Science and Technology* 30: 11-20.
- Morgan-Sagastume, F., Allen, D.G. 2003. Effects of temperature transient conditions on aerobic biological treatment of wastewater. *Water Research* 37, 3590-3601.
- Morgan-Sagastume, F.; Allen, D.G. 2005. Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45°C. *Water Research* 39, 1061-1074.
- Muyzer, G.; E C de Waal, Uitterlinden, A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59(3): 695-700.

- Nadarajaha, N.; Allen, D.G.; Fulthorpe, R. 2007. Effects of transient temperature conditions on the divergence of activated sludge bacterial community structure and function. *Water Research* 41, 2563 – 2571.
- Ndegwa, P. M., Hamilton, D. W., Lalman, J. a, & Cumba, H. J. 2008. Effects of cycle-frequency and temperature on the performance of anaerobic sequencing batch reactors (ASBRs) treating swine waste. *Bioresource technology*, 99(6), 1972–80.
- Ndon, U. J.; Daque, R.R. 1997. Effects of temperature a hydraulic retention time on anaerobic sequencing batch reactor of low-strength wastewater. *Water research* 31: 2455-2466.
- O'Flaherty V. and Collins Mahony T. 2006. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 5: 39-55.
- Pavlostathis and Giraldo-Gomez.E.1991. Kinetics of Anaerobic Treatment *Water Science & Technology* Vol 24 No 8 pp 35–59
- Regueiro, L.; Carballa, M.; Alvarez, J.; Lema, J.M. 2012. Enhanced methane production from pig manure anaerobic digestion using fish and biodiesel wastes as co-substrates. *Bioresource Technology* 123 507–513
- Ruiz,C.; Torrijos, M.; Sousbie, P.; Martinez, J.; Moletta, R. 2001. The anaerobic SBR process: basic principles for design and automation. *Water Science and Technology* Vol 43 (3): 201–208.
- Sanchez, E.; Borja, R., Weiland, P.; Travieso, L.; Martin, A. 2001. Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. *Process Biochemistry* 37: 483-489.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, and Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919
- Sanz, J. L.; Köchling, T. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42: 119-133.
- Siegert, I.; Banks,C. 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* 40: 3412–8.
- I, M. W. P., Skilton, J. M., I, F. R. H., & Hawkes, D. L. (1986). Effects of temperature shock treatments, 20(4), 453–462.

- Simankova, M. V., Parshina, S. N., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Zehnder, a J., & Nozhevnikova, a N. (2001). *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *Systematic and applied microbiology*, 24(3), 362–7.
- Speece, R.E. 1996. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Watewaters*. Archae Press, Nashville, TN.
- Stamper, D.; Walch, M.; Jacobs, R. 2003. Bcterial populationa changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 852-860.
- Stams, A.J.M. 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antoine van Leeuwenhoek* 66: 271-294.
- Urra, J.E. 2009. Evaluación del comportamiento estructural y molecular de la biomasa presente en digestores anaerobios de lodos de mezcla completa. Tesis Doctoral, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Van Lier J. B.; Rebac S. and Lettinga G. 1997. High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions. *Water Science and Technology*, 35 (10): 199-206.
- Wiegel, J. 1990. Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, 155–170
- Xiaoqi, Z.; Yanfen, W.; Ying, C.; Xiangzhong, H.; Yanbin, H.; Jianqing, T.; Tuanyao, C. 2007. PCR-DGGE detection of the bacterial community structure in the Inner Mongolia steppe with two different DNA extraction methods. *Ecologica Sinica*, 27(5): 1684–1689.

**CAPITULO 5: INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE FENOL EN EL  
FUNCIONAMIENTO DE UN REACTOR ASBR**

## 5.1 ANTECEDENTES

### 5.1.1 Compuestos inhibitorios para el proceso de digestión anaerobia

Los compuestos aromáticos son los segundos más abundantes en la naturaleza. Su principal estructura química corresponde a un anillo de benceno, representando el 25% de la biomasa en la tierra (Hernández *et al.*, 2008).

Los estudios desarrollados sobre compuestos que presentan algún tipo de inhibición sobre la biomasa encargada del tratamiento de efluentes industriales, han sido enfocados a un cierto grupo por estar presente en efluentes industriales de distintas áreas, por ejemplo: ácido 2,4 diclorofenoxiacético, pentaclorofenol y fenol, entre otros. Para los dos primeros compuestos mencionados, se realizaron trabajos en reactores de tipo ASBR por Chin *et al.* (2005), que investigaron sobre la influencia del pH y temperatura al tratar 2,4 ácido diclorofenoxiacético, obteniendo un 65% de eliminación del compuesto a partir de una concentración inicial de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  trabajando a temperatura ambiente. Ribarova *et al.* (2002), investigaron la relación entre la concentración de lodos anaerobios y el porcentaje de eliminación de materia orgánica tratando un efluente con pentaclorofenol, obteniendo valores de eliminación del tóxico de  $0.17\text{-}0.44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , pero sólo como estudio de la puesta en marcha del reactor.

Uno de los compuestos aromáticos más influyentes en la industria química es el fenol, que puede estar presente en aguas residuales industriales como aquellas que provienen de refinerías petroquímicas, producción de coke y de compuestos como herbicidas, pesticidas, insecticidas, antioxidantes, aditivos de papel, entre otros (Busca *et al.*, 2008). La generación estimada de fenol puede alcanzar una producción global de 6 millones de toneladas por año, con una tendencia clara a seguir incrementando (Jordán *et al.*, 2002).

### 5.1.2 Fenol

Este compuesto presenta características tóxicas, cancerígenas y mutagénicas, frente a los seres vivos. Una concentración de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  puede afectar notablemente la vida

acuática y por ello en la mayoría de los casos, los límites de descarga de este compuesto deben ser menores a  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chang *et al.*, 1995; Tay *et al.*, 2001).

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales puede tener efectos inhibitorios frente a los microorganismos encargados del tratamiento biológico y como consecuencia, una disminución en la eficaz eliminación de ésta o bien un largo tiempo de tratamiento (Hernández *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Donoso-Bravo *et al.*, 2009).

### 5.1.3 Propiedades químicas y físicas

El fenol, a temperatura y presión ambiental, es un sólido cristalino higroscópico. Al encontrarse puro el sólido es más bien blanco, pero se colorea con presencia de impurezas. Es muy soluble en alcohol etílico, éter y varios solventes polares, como también en hidrocarburos (benceno). En agua tiene limitada solubilidad y se comporta como un ácido débil (Busca *et al.*, 2008).

Las propiedades físico-químicas de fenol se presentan en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1:** Propiedades físicas y químicas de fenol (Busca *et al.*, 2008)

Propiedad	Valor
Peso molecular ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	94.1
Temperatura de fusión ( $^{\circ}\text{C}$ )	40.9
Temperatura de ebullición ( $^{\circ}\text{C}$ )	181.75
Solubilidad en agua	$9.3 \text{ g fenol} \cdot 100 \text{ mL de agua}^{-1}$
pKa	9.89
Límites de inflamabilidad en el aire (%vol)	1.7 (mínima)
	8.6 (alta)
Punto de Inflamación ( $^{\circ}\text{C}$ )	79 (closed up)
Temperatura de auto ignición ( $^{\circ}\text{C}$ )	715

### 5.1.4 Presencia en aguas residuales industriales y sistemas de eliminación

El fenol es utilizado en la producción de una gran variedad de resinas aplicadas en la construcción de automóviles, electrodomésticos, composición de adhesivos, entre otros. Se encuentra contenido en aguas residuales de diferentes industrias, como por ejemplo, refinerías petroquímicas y de obtención de carbón coque, productoras

de compuestos químicos que se utilizan como herbicidas, pesticidas, plaguicidas, antioxidantes y aditivos para la industria papelera entre otras (Khardenavis *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2009; Muftah *et al.*, 2010; Levén *et al.*, 2010). La concentración en la que se pueda encontrar en las aguas residuales, depende de la actividad industrial de donde provenga, por ejemplo en las de refinerías se encuentra en un rango de (6-500 mg·L<sup>-1</sup>), coque (28-3900 mg·L<sup>-1</sup>), petroquímicas (2.8-1220 mg·L<sup>-1</sup>). Otras actividades que presentan este compuesto en sus residuos corresponde a la farmacéutica, papelera, maderera y pinturas, que pueden presentar una concentración de fenol entre (0.1-1600 mg·L<sup>-1</sup>) (Busca *et al.*, 2008). En general, la concentración de materia orgánica medida como DQO, aportada por estos tipos de efluentes por compuestos fenólicos, suele estar en un rango de 40% a 80% (Veeresh *et al.*, 2005).

En la Tabla 5.2 (a y b) se presentan las características de diferentes tipos de aguas residuales que poseen fenol en su composición.

**Tabla 5.2 (a):** Características de diferentes tipos de aguas residuales que poseen fenol (Veeresh *et al.*, 2005).

Tipo de agua	Concentración componentes fenólicos (mg·L <sup>-1</sup> )	Fenol (mg DQO·L <sup>-1</sup> )	Referencia
Gasificación de carbón (10% dilución)	Fenol = 207 Cresol=57 m- y p-cresol=139 2,4-Dimetilfenol=22 3,5 y 2,3- Dimetilfenol=29 3,4-Dimetilfenol=9 Total=463	1102	Suidan <i>et al.</i> , (1983)
Gasificación de lignito	5500–7260	13,090– 17,279	Hung <i>et al.</i> , (1982)
Licuefacción H- carbón	800–1500	1904–3570	Tsai and Folsom (1985)
Licuefacción H- carbón	17,745.3		Fedorak and Hrudey (1986)

**Tabla 5.2 (b):** Características de diferentes tipos de aguas residuales que poseen fenol (Veeresh et al., 2005).

Tipo de agua	Concentración componentes fenólicos (mg·L <sup>-1</sup> )	Fenol DQ0 (mg·L <sup>-1</sup> )	Autores
Licuefacción de lignato	3290–11,700	7830–27,846	Hung (1982)
Carbonización a bajas temperaturas	Total fenol=9250–17500	22,015–41,650	Kumaran <i>et al.</i> , (1983)
Planta de coque con amonio en el efluente	620–1150	1476–2737	Luthy (1980)
Escoria lecho fijo	5500	13,090	Luthy <i>et al.</i> (1983)
Refinería de petróleo	6.42–88.03	15.3–210	Tyagi <i>et al.</i> , (1993)
Refinería de aceites (aguas residuales en general)	10–100		Patterson (1975)
Petroquímicas en general	50–600		
Mantenimiento de aviones	200–400		
Herbicidas		210	
Fábrica de Plásticos	600–2000		
Fabrica de fibra vulcanizada	150		
Producción de resinas fenólicas	1600		
Fibra de vidrio		40–400	

La eliminación de fenol desde aguas residuales, puede ser realizada por procesos físicos, químicos y biológicos. Los métodos que más se han reportado, corresponden a descomposición térmica, adsorción y biodegradación (Jiang *et al.*, 2003).

La descomposición térmica puede ser implementada para la eliminación de fenol desde aguas residuales con alta concentración (15000 mg·L<sup>-1</sup> aproximadamente), sin

embargo para su desarrollo se requieren altos costos energéticos y solo se ha aplicado a pequeña escala. La oxidación por aire, un método típico de la descomposición térmica, por lo general se realiza a temperaturas que van desde 200 hasta 330°C y presiones que van desde 2-20 Mpa, por lo tanto, el tratamiento térmico no es un medio económico rentable para la degradación del fenol.

La absorción es un método eficaz de tratamiento de aguas residuales fenólicas diluidas. Sin embargo, por el costo relativamente alto de carbón activado u otros absorbentes, la adsorción no se puede utilizar para el tratamiento de aguas residuales de alta concentración de fenol (Jiang *et al.*, 2003).

La recuperación de fenol a altas concentraciones es económica mediante procesos físicos como (extracción por solvente). A concentraciones intermedias, es decir desde 5 a 500 mg·L<sup>-1</sup> de fenol es factible la oxidación biológica (Veeresh *et al.*, 2005).

Los sistemas biológicos han tomado amplio protagonismo, debido a que existen una gran variedad de microorganismos que son capaces de utilizar fenol como fuente de carbono y energía (Fang *et al.*, 2007). Hasta antes de los años 90, los procesos aerobios generaban gran atención para el tratamiento de este compuesto, pero posteriormente, esta situación cambió a favor de los procesos anaerobios (Veeresh *et al.*, 2005).

Debido a la toxicidad que presenta el fenol, es importante señalar que los compuestos fenólicos a ciertas concentraciones, pueden presentar inhibición en los microorganismos encargados del proceso de degradación, incluyendo aquellos que producen biogás (Hernández *et al.*, 2008). Se ha postulado que los compuestos fenólicos inhiben el gradiente de protones electroquímicos que ocurre a través de la membrana, generándose una disminución en el transporte y una menor producción de energía (Escher *et al.*, 1996).

La toxicidad de este compuesto, se cree que es debida al tamaño molecular (Connor *et al.*, 1989), a la sustitución del anillo aromático y a la apolaridad de la molécula (Sierra-Álvarez *et al.*, 1991).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, los compuestos fenólicos alterarían la cadena trófica establecida entre los microorganismos, afectando así en el caso de la

digestión anaerobia, la producción de ácidos grasos, hidrógeno y como consecuencia la de metano.

### 5.1.5 Mecanismos de degradación de fenol mediante microorganismos

Existen diferentes mecanismos propuestos de degradación, dependiendo del tipo de microorganismos que lo desarrolle, en ausencia o no de oxígeno.

Las vías de degradación de compuestos aromáticos por medio de un metabolismo aeróbico, se basa en la bioquímica de oxígeno. Sin embargo, las vías anaeróbicas utilizan una bioquímica reductiva, incluyendo otro tipo de reacciones tales como carboxilaciones, dehidroxilaciones reductivas, entre otros, los cuales se encuentran ausentes en el metabolismo aeróbico (Fuchs *et al.*, 1997).

El intermediario y enzima centrales más comunes en el metabolismo aromático anaerobio es benzoil-CoA y benzoil-CoA reductasa, la cual es clave en la reducción del anillo en estas rutas metabólicas. Los microorganismos mejor estudiados que emplean esta vía son *Rhodopseudomonas palustris*, *Thauera aromatica* y *Azorcus Evansii* (Fuchs *et al.*, 1997).

- **Degradación anaerobia de fenol**

La degradación anaerobia de fenol es un proceso complejo, por lo que requiere un consorcio conformado por diferentes tipos de microorganismos. Se han reportado dos posibles vías de degradación de fenol (Fezzani *et al.*, 2009):

1. Temperaturas mesofílicas: Vía benzoato en bezoyl-CoA.
2. Temperaturas termofílicas: Vía Caproato.

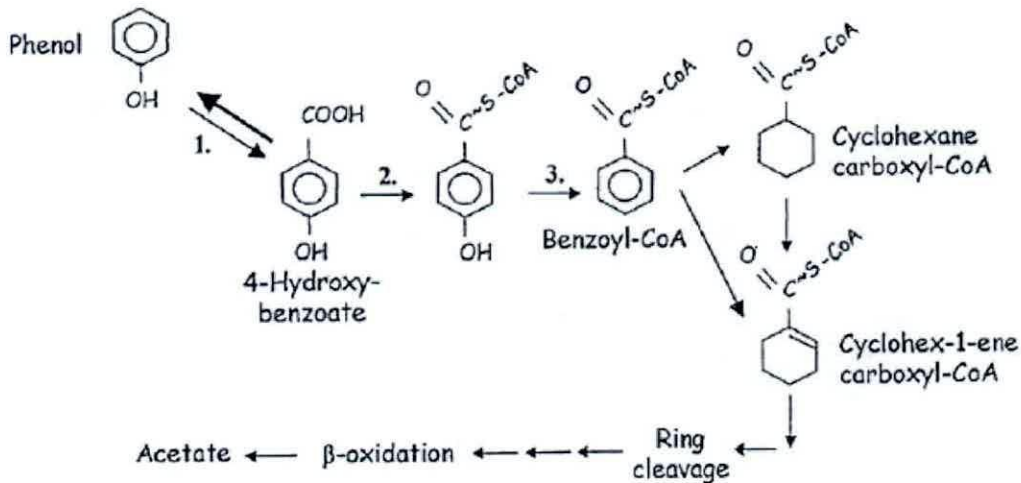
- **Mesofílicas**

A temperaturas mesofílicas, algunos autores han sugerido que el fenol es reducido en presencia de nitrato a ciclohexanona y este a n-caproato, y es posteriormente sometido a una beta-oxidación para formar bajos AGVs (Knoll *et al.*, 1987).

Otros autores, han sugerido que durante la degradación anaerobia de fenol, este es convertido primero a benzoato. El benzoato es fuertemente desaromatizado a ácido carboxílico ciclohexanona, el cual sería convertido supuestamente a heptanoato

(Kobayasi *et al.*, 1989). Posteriormente, este es degradado a través de una beta-oxidación a valérico, propiónico y acético (Keith *et al.*, 1978), o es directamente degradado para formar propionato y acetato (Fina *et al.*, 1978).

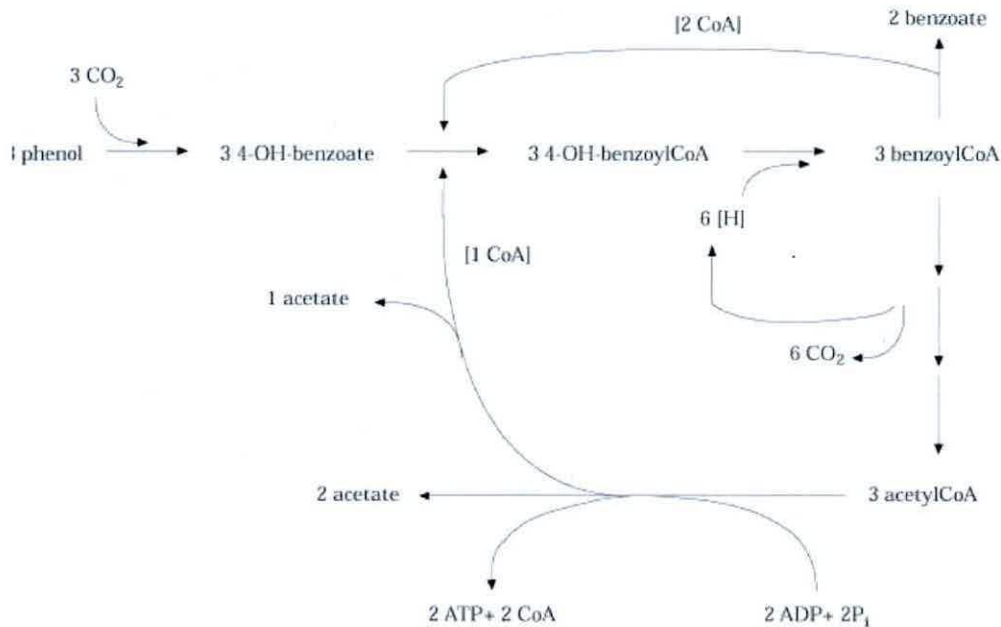
Más recientemente ha sido confirmado por varios autores, que durante la degradación mesofílica de fenol, éste es primero degradado a través de la vía del benzoato o más precisamente por la vía 4-hidroxybenzoate, el cual es transformado a través de benzoyl-CoA, vía ciclohexano carboxilato, que es convertido a acetato e hidrógeno, usando bacterias *Syntropus* degradadoras de benzoato (Fezzani *et al.*, 2009). La vía de degradación se presenta en la Figura 5.1.



**Figura 5.1:** Vía de degradación de fenol a temperaturas mesofílicas (Fezzani *et al.*, 2009)

La reducción de 4-hidroxi-benzoil-CoA a benzoil-CoA por 4-Hidroxibenzoil-CoA reductasa, ha sido detectado en extractos de cultivos celulares de *T. aromatica*, *A. evansii* y *R. palustris*. 4-Hidroxibenzoil-CoA reductasa, es una enzima citoplasmática que consta de tres subunidades diferentes de 75 kDa, 35 kDa y 17 kDa.

Estudios preliminares aplicando 10 mM de fenol con presencia de BES (Karlsson *et al.*, 1999), los llevó a formular una vía de degradación de fenol, como se muestra en la Figura 5.2.

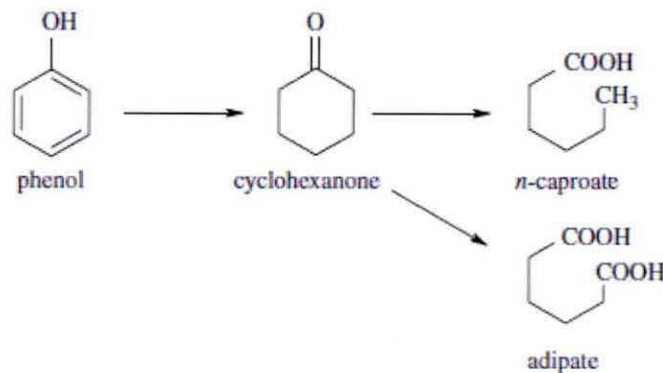


**Figura 5.2:** Propuesta de vía de degradación de fenol, basado en resultados preliminares de transformación de fenol a benzoato y acetato en botellas-modificadas con BES. El fenol es inicialmente reducido, formando benzoyl CoA, desde 4-Hidroxybenzoil-CoA. En la etapa de reducción son consumidos 6 [H]. Un tercio de 4 hidroxybenzoyl CoA es oxidado a acetato durante la formación de 6 [H]. El 4-Hidroxybenzoil-CoA remanente es convertido a benzoato (Karlsson *et al.*, 1999).

- **Termofílicas**

Bajo condiciones termofílicas de temperatura se han propuesto dos posibles vías de degradación de fenol, una plantea que el fenol es transformado a benzoato por medio de una carboxilación, posteriormente el anillo aromático se rompería para obtener ciclohexanocarboxilato, y éste último sería transformado en heptanoato. El heptanoato sería convertido en valeriato mediante una  $\beta$ -oxidación, y luego a acetato y propionato o directamente a propionato y butirato. Todas estas reacciones sugieren que los microorganismos involucrados en la degradación anaerobia del fenol poseen la actividad enzimática específica para catalizar estas reacciones. La segunda alternativa de degradación sugiere que el fenol es reducido en presencia de

nitrato y ciclohexanona a n-caproato (como se muestra en la Figura 5.3) para ser llevados posteriormente a ácidos grasos volátiles mediante b-oxidación. Sin embargo, la utilización de una u otra vía, e incluso ambas, no se encuentra dilucidado (Fang *et al.*, 2006).



**Figura 5.3:** Degradación de fenol vía ciclohexanona (Fang *et al.*, 2006).

Los estudios realizados bajo condiciones termofílicas, entregan resultados similares con respecto al comportamiento general de un reactor anaerobio tratando un efluente con fenol en condiciones mesofílicas; con respecto a la disminución del porcentaje de eliminación de fenol en el efluente, éste ocurre a medida que aumenta la velocidad de carga orgánica, ya que se produce la acumulación del compuesto en el interior del reactor. Una diferencia observada entre la condición mesofílica y termofílica es la estratificación de las comunidades bacterianas en los gránulos del lodo, identificándose una distribución diferente de las comunidades microbianas en la estructura granular.

Resultados de la medición de intermediarios de la vía anaerobia señalan que bajo condiciones termofílicas, la vía degradativa del fenol no se llevaría a cabo a través de la transformación de éste a benzoato a metano, sino que serían el propionato y el butirato los intermediarios del fenol que son factibles de ser llevados a metano, en contraposición a lo demostrado en ensayos mesofílicos (Fang *et al.*, 2006), donde el benzoato es convertido a metano con una velocidad similar que la del paso de fenol en bajas concentraciones a benzoato.

Se han realizado estudios en batch con la finalidad de estudiar los pasos involucrados en la degradación del fenol en un sistema anaerobio, los experimentos demuestran que a concentraciones cercanas a  $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, el traspaso de éste a benzoato ocurre con una baja producción de metano. Cuando la concentración de fenol baja a  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , aumenta considerablemente la producción de metano y la concentración de benzoato alcanza un valor máximo que disminuye rápidamente. Estos experimentos muestran dos fenómenos importantes del proceso de degradación del fenol, primero, que el benzoato es un intermediario clave en el proceso y segundo, que a concentraciones mayores a  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, la conversión benzoato a metano se ve disminuida, mientras que para concentraciones cercanas a  $340 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, la conversión a metano desde el intermediario aumenta drásticamente (Fang *et al.*, 2006).

- **Degradación aerobia de fenol**

En el caso de la degradación aerobia, para el rompimiento del anillo aromático, existen dos maneras que dependen de la posición del grupo fenilo. El primer caso, es la escisión del orto o la ruta del B-cetoadipato, que tiene lugar en los carbonos que tienen el grupo OH (intradiol), en la posición 1-2 en el caso de catecol y en la posición 3-4 en el caso del ácido protocatequico. Se producen diferentes reacciones oxigenolíticas, tanto para el catecol como para el ácido protocatequico, hasta obtener un intermediario común llamado  $\gamma$ -cetodipatoenollactona, que es transformado a B-cetodipato. Finalmente se genera como productos succinato y acetyl-CoA, los productos formados posteriormente ingresan al ciclo de Krebs (Barrios *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2008).

El segundo mecanismo corresponde a la escisión meta, esta ruptura se lleva a cabo en el carbono portador del OH y el carbono adyacente (estradiol) para el catecol, la escisión se realiza en los carbonos 2-3 y para el ácido los carbonos 4-5 (Ying *et al.*, 2007). Las rutas de catecol y ácido procatequico, se desarrollan independientemente y no convergen en ningún intermediario. Los productos de la escisión meta son acetaldehído y piruvato, donde el último compuesto es un precursor clave en el ciclo de los ácido tricarbónicos. Esta vía se encuentra en la Figura 5.4 (Barrios *et al.*, 2006).

Existe otra ruta, la del ácido gentísico o ácido hidroxibenzoico, que se forma a partir de varios compuestos como flavonones, B-naptol, entre otros (Suárez, 1993).

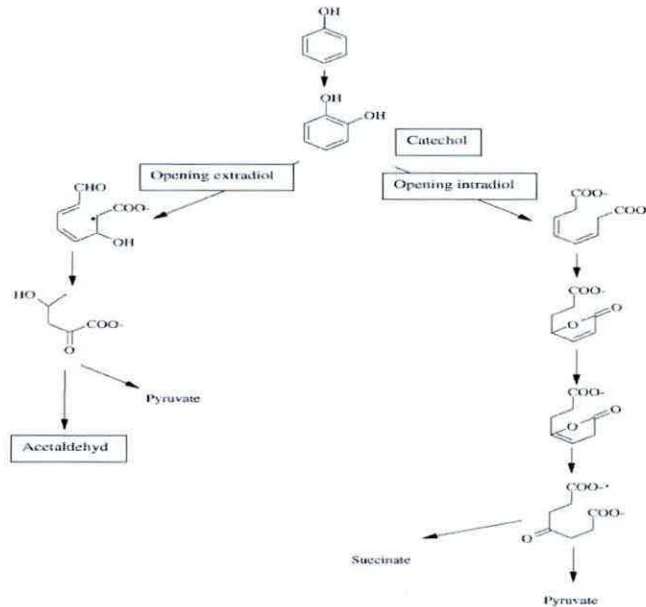


Figura 5.4: Vía de degradación de fenol (Barrios *et al.*, 2006).

El intermediario más frecuente en la degradación del fenol corresponde al catecol, el cual sufre reacciones de dihidroxilación generando la ruptura del anillo aromático, permitiendo de esta manera que sea degradado por alguno de los dos mecanismos que fueron mencionados anteriormente. Previo a la ruptura del anillo hay una etapa de activación que involucra la incorporación de oxígeno molecular al anillo, lo que es precisamente la etapa de dihidroxilación del núcleo aromático. Este paso es llevado a cabo por enzimas conocidas como oxigenasas.

La degradación de fenol a nivel biótico está mediado por organismos que son capaces de utilizar este compuesto como fuente de carbono y energía. Las bacterias pueden llevar a cabo la biodegradación de fenol, en especial las gram negativas, siendo el más reportado el género *Pseudomonas sp.* (Saravanann *et al.*, 2008). Sin embargo, otros géneros de bacterias gram negativas han sido reportados para la degradación de fenol, como *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, entre otros; no obstante

existen bacterias gram positivas que también tiene la capacidad de degradar fenol, como *Rhodococcus*. Sin embargo, independiente del tipo de bacteria, éstas poseen gran actividad de monooxigenasas y dioxigenasas que permiten degradar el compuesto (Pradhanet *et al.*, 2007).

Además de bacterias se han reportado algunos hongos que poseen la capacidad de degradación de fenol como *Aspergillus awamori* (Stoilova *et al.*, 2006). Las enzimas encargadas de la hidroxilación del núcleo aromático, conocidas como oxigenasas, se denominan monooxigenasas, características de los hongos y algunas eucariotas canalizan la incorporación de un solo átomo de oxígeno para formar un epóxido que puede hidratarse para formar un transhidradiol; las dioxigenasas características de las bacterias, canalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular en un sólo paso para formar un dihidradiol. Los hidrodioles después se oxidan a derivados hidroxilados, como los catecoles que son los precursores del rompimiento del anillo. El catecol posteriormente puede ser oxidado por la vía meta u orto como se mencionó anteriormente.

### 5.1.6 Antecedentes de degradación anaerobia de fenol

Hernández *et al.*, (2008), realizaron estudios de biodegradabilidad y de inhibición de la producción de biogás por presencia de compuestos fenólicos. Para los ensayos de biodegradabilidad, se utilizó fenol como única fuente de carbono, con concentraciones de 100, 200, 400, 800 y 1600 mg C·L<sup>-1</sup>. Para los ensayos de toxicidad, se utilizó además de fenol, glucosa como co-sustrato, en una concentración de 2 g·L<sup>-1</sup>. Las concentraciones del compuesto tóxico aplicadas fueron de 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 mg C·L<sup>-1</sup>, registrándose inhibición a concentraciones desde 800-1600 mg·L<sup>-1</sup> de fenol.

El mayor número de tratamientos anaerobios aplicado a aguas residuales con fenol, se encuentra reportado en reactores de tipo UASB. De 1330 plantas, por lo menos 80 plantas son a gran escala para el tratamiento de aguas residuales de la industria química y petroquímica. Entre estos, cerca del 30% son plantas que poseen reactores UASB (Veeresh *et al.*, 2005). Distintos estudios se presentan en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3 (a):** Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh *et al.*, 2005).

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
Aguas que contienen 500 mg·L <sup>-1</sup> de fenol (1200 mg DQO·L <sup>-1</sup> como única fuente de carbono)	El reactor UASB contó con una capacidad de 6 L, manteniendo una tasa de recirculación alimentación de 5:4:1. El reactor fue mantenido a un TRH de 6 días al inicio, durante un periodo de puestas en marcha de 20 d, seguido de un TRH de 3 d, correspondiendo a una carga orgánica de (VCO) de 0.4 g DQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> y una baja carga de lodos de 30 mg DQO·g SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> .	La biomasa demoró 46 días en alcanzar el 100% de su capacidad	Duff <i>et al.</i> , (1995)

**Tabla 5.3 (b):** Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh *et al.*, 2005).

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
<p>Estudio de las características de lodo metanogénico granular, en un medio sintético con fenol, en un reactor UASB a pequeña escala de 0.66 L.</p>	<p>Como inóculo se utilizó lodos provenientes de tratamiento de aguas residuales de una planta petroquímica. El reactor fue alimentado con aguas residuales sintéticas que contienen <math>150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}</math> de fenol como única fuente de carbono y energía, en una velocidad de espacio inicial (SV) (caudal volumétrico/trabajando volumen de reactor) de 0.27 d sin recirculación del agua. La concentración de SV y el fenol se incrementan hasta 4.4 d y <math>500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>, respectivamente, cuando fenol se degrada por completo.</p>	<p>El funcionamiento fue continuo por 300 d. Los gránulos formados llevaron a un aumento de la altura de la cama 2 a 18 cm, que corresponde al 60% de la altura del reactor. La producción de metano fue cercana al 100%. Gránulos cultivados en agua residual sintética fenol después de 10 meses de operación, fueron del tamaño que van desde 0.67 a 0.77 mm. Análisis microscópico electron mostró <i>Methanothrix spp.</i> como metanógenos dominante en la superficie del gránulo, así como dentro de él.</p>	<p>Chang <i>et al.</i>, (1995)</p>
<p>Estudio dilución óptima y la recirculación en el tratamiento de aguas residual con fenol</p>	<p>La investigación se llevó a cabo en un reactor UASB de 0.66 L. La concentración de fenol en aguas residuales de una fábrica de acero fue de <math>400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}</math> y <math>9300 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}</math>.</p>	<p>Se obtuvo que con una doble dilución de aguas residuales y una recirculación del efluente de 7.3 d, se pudo alcanzar una eficiencia de eliminación óptima de 90 y 80% para el fenol y el DQO, respectivamente.</p>	<p>Chang <i>et al.</i>, (1995)</p>

**Tabla 5.3 (c):** Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh *et al.*, 2005).

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
Tratamiento de agua residual sintética con fenol como única fuente de carbono	Operación de un reactor UASB de 2.8 L. El agua residual contenía una concentración de 2.000 mg DQO·L <sup>-1</sup> y 12 h TRH (Tasa de carga correspondiente a 4 g DQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ).	La eficiencia de eliminación de DQO se mantuvo en 81%. Con una relación de recirculación 1:01, la eficiencia de remoción de DQO mejoró constantemente a un promedio de 92.5% a la misma carga. Se pudo mejorar aún más la carga de hasta 6 g DQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> con un porcentaje de eliminación promedio del 97.7% de la DQO soluble.	Fang <i>et al.</i> , (1996)
Tratamiento de fenol utilizando lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales.	Se utilizó un reactor UASB de 2 L. Se trató aguas residuales con una composición de 2/3 industrial y 1/3 domestica.  La concentración de fenol fue incrementando paso a paso desde 105 a 1260 mg·L <sup>-1</sup> , durante un periodo de 260 d.	Se reportó que la granulación comenzó 3 meses después de comenzar a operar el reactor y desarrollándose más rápido después de 6 meses, donde maduraron completamente. El diámetro medio de los gránulos al final del periodo de operación (320 d) fue de 1.8 mm (que por lo general van entre 1 y 4 mm). Gránulos presentaron buena sedimentación con un índice de volumen del lodo de 14 mL·g <sup>-1</sup> .	Tay <i>et al.</i> , (2000)

**Tabla 5.3 (d):** Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh *et al.*, 2005).

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
Estudio del efecto de la velocidad de carga sobre el tratamiento de aguas residuales que contienen fenol concentrado y p-cresol.	Se trabajó en dos reactores de tipo UASB. Se varió (i) el TRH 12 a 2 h en un reactor y (ii) la concentración de fenoles en el TRH de 24 h en el otro reactor.	Encontraron que el 95% de fenol, el 65% de p-cresol y 85% del DQO podría ser eliminado de las aguas residuales que contienen $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol y $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de p-cresol a un TRH de 8 a 12 h y una relación de 1:1 de recirculación y efluente.  Del mismo modo, en un TRH constante de 24 h, el segundo reactor fue capaz de eliminar 75-80% de DQO de un agua residual que contiene una concentración constante p-cresol de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y el fenol en el rango de 1200-1500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .	Fang <i>et al.</i> , (2000)

**Tabla 5.3 (e):** Estudios de degradación de fenol en reactores UASB (Veeresh *et al.*, 2005).

Investigaciones	Metodología	Resultados	Referencia
Tratamiento de fenol utilizando glucosa como co-sustrato.	Los ensayos fueron llevados a cabo en un reactor UASB. Se aplicaron 1000 mg·L <sup>-1</sup> de glucosa como suplemento para promover una mayor eliminación de fenol y aclimatación del lodo.	Bajo estado estacionario de operación y 6 g fenol·L <sup>-1</sup> , la eliminación de fenol fue de 98% con glucosa y 88% sin glucosa. Aplicando shock de carga orgánica se obtuvo que un shock de fenol desde 1260 hasta 1680 mg·L <sup>-1</sup> da lugar a una acumulación inmediata de productos intermedios. La concentración de acetato en el efluente de 33 a 332 y 150 a 787 mg·L <sup>-1</sup> en los reactores con y sin glucosa, respectivamente. Un aumento de la concentración de benzoato (22 y 76 mg·L <sup>-1</sup> en el efluente del reactor con y sin glucosa) también fue observado. Se obtuvo que el suplemento de glucosa generó una biodegradación de fenol más completa.	Tay <i>et al.</i> , (2001)
Tratamiento de aguas petroquímicas.	Se desarrolló el tratamiento de aguas residuales de producción de petróleo en un reactor UASB.	Demostraron que el óptimo TRH para un reactor UASB (4 L capacidad) fue de 15 h, que corresponde a una carga orgánica de 2 kg DQO·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup> , donde tanto la eficiencia de eliminación de DQO y porcentaje de metano fueron más del 80%. La eliminación de fenoles totales fue de alrededor de 60%. Para un el tiempo de retención de 10 h, se observó una inhibición de la bacterias metanogénicas.	Rincón <i>et al.</i> , (2002)

Como podemos observar, diferentes tecnologías anaerobias se han implementado para hacer frente a la presencia de fenol debido principalmente a las ventajas que presenta con respecto a otras tecnologías biológicas como por ejemplo, poder operar a altas cargas orgánicas con una baja producción de lodo y generación de energía.

Una de las tecnologías anaerobias disponibles corresponde a los reactores de tipo ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor), el cual, dado a sus ventajas de tipo cinéticas, podría contrarrestar los efectos inhibitorios del fenol a favor a su degradación. Se han reportado estudios de tratamiento de aguas residuales sintéticas con fenol en reactores ASBR. Donoso-Bravo *et al.*, (2009) evaluaron el efecto de implementar diferentes modalidades de operación (lote y lote alimentado). El reactor fue alimentado con una concentración variable de fenol (10, 25 y 40%) utilizando glucosa como co-sustrato. Los resultados en modalidad de alimentación por lote, indicaron que la glucosa no afecta de manera positiva la degradación anaerobia de fenol, por lo tanto al implementar la modalidad por lote alimentado, sólo utilizaron fenol como fuente de carbono. Al operar con ésta última configuración a una concentración de  $210 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , se obtuvo una completa eliminación de fenol en 10 días.

De acuerdo a lo anterior, importantes factores podrían influenciar la degradación anaerobia de fenol: el origen de la biomasa, la presencia de un co-sustrato, la adaptación de la biomasa y la concentración de sustrato aplicada. Como cualquier reactor biológico, variaciones en los parámetros de operación podrían inducir cambios en la estructura de las comunidades microbianas (densidad, diversidad, actividad) que a su vez resultan que el comportamiento funcional sea diferente.

En este estudio se evaluó la eficiencia de un reactor ASBR al incrementar la concentración de fenol desde 120 a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se presenta la metodología empleada para el desarrollo de los ensayos de la degradación anaerobia de fenol.

La primera etapa de la metodología aplicada, consta de ensayos desarrollados en botellas donde se evaluó los siguientes efectos:

- 1- Origen del inóculo.
- 2- Presencia de glucosa como co-sustrato.
- 3- Adiciones sucesivas de fenol (adaptación).

La segunda etapa consta de ensayos en un reactor ASBR a diferentes concentraciones de fenol.

El diagrama del procedimiento experimental se presenta en la Figura 5.5.

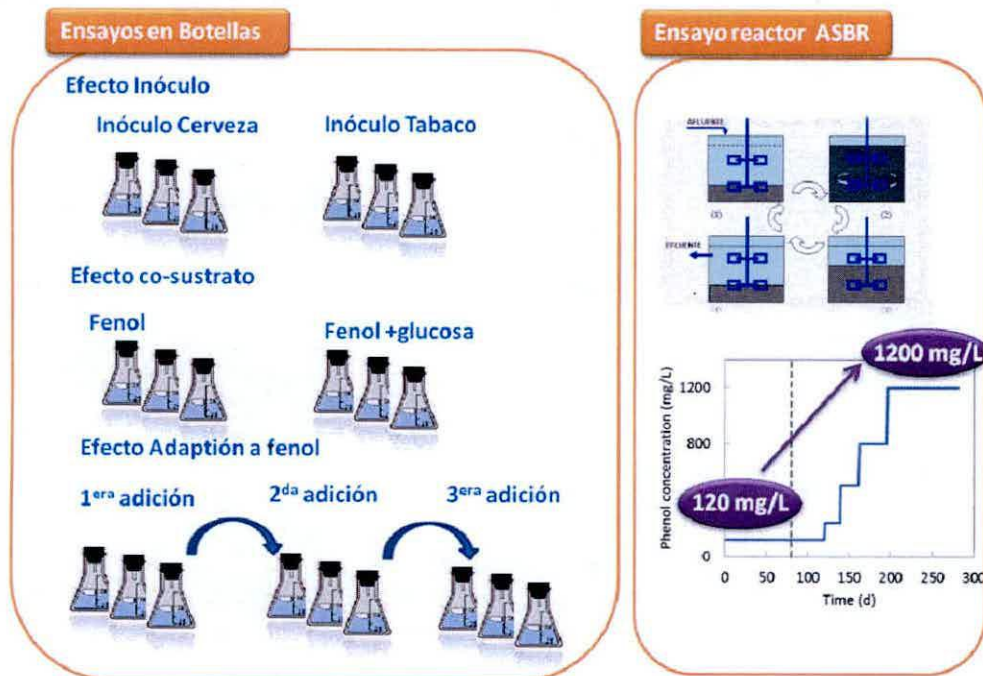


Figura 5.5: Esquema general de ensayos de degradación anaerobia de fenol.

Como se puede observar en la Figura 5.5, se desarrollaron distintos ensayos tanto en botellas como en un reactor de tipo ASBR.

En los ensayos en botellas se evaluaron diferentes efectos en la degradación anaerobia de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol.

Se evaluó el efecto del origen del inóculo. Un inóculo provenía de una planta de tratamiento de una industria de cerveza y otro de una planta de tratamiento de una industria de tabaco.

Además se evaluó el efecto de la presencia de un compuesto de fácil degradación como glucosa como co-sustrato y finalmente, la adaptación de los microorganismos encargados de la degradación de fenol, al aplicar adiciones sucesivas del compuesto.

Una vez obtenido los resultados en botellas, se evaluó el comportamiento de un reactor de tipo ASBR ante la presencia del compuesto en estudio, a diferentes concentraciones ( $120, 240, 500, 800$  y  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), con el inóculo de la planta procesadora de tabaco.

### 5.2.1 Ensayos de biodegradabilidad anaerobia de fenol en botellas

#### *Montaje Experimental*

En los distintos experimentos, se utilizaron botellas de 500 mL de volumen total y 400 mL de volumen útil. Una vez preparadas, con el medio de cultivo y sustrato, se gaseó la fase líquida y sólida con  $\text{N}_2$  gas, se cerraron y se incubaron en un shaker (120 rpm) a  $37^\circ\text{C}$ , como se muestra en la Figura 5.6.

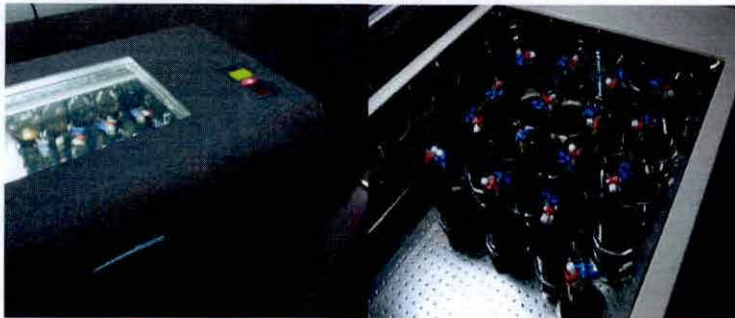


Figura 5.6: Fotografía de ensayo en botellas de degradación anaerobia de fenol.

Todas las botellas fueron tratadas con el mismo procedimiento durante el montaje, diferenciándose sólo en el sustrato añadido y el inóculo utilizado. El medio de cultivo correspondió al empleado en una actividad metanogénica, descrito por Soto *et al.* (1993).

Para los ensayos de degradación, se preparó una solución patrón de  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol y una solución patrón de glucosa de  $150 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Para el ensayo de actividad metanogénica, el sustrato añadido fue de una mezcla de AGV (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, en relación porcentual en DQO de 50:25:25) en una concentración de  $1.5 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$  por botella, con el fin de mantener una relación  $\text{g DQO sustrato}\cdot\text{g biomasa}^{-1}$  de 1:1. El volumen utilizado de solución patrón fue acorde a la concentración requerida para el ensayo.

Al momento de la utilización de los diferentes sustratos, el volumen adicionado de cada solución patrón fue acorde a la concentración requerida para cada ensayo.

La frecuencia de muestreo en los ensayos en botella fue diaria en la medición de la fase gaseosa por lo menos en los primeros 6 días de ensayo. En el caso del muestreo de la fase líquida, este sólo se llevó a cabo con una frecuencia de muestreo de aproximadamente dos días. Los parámetros medidos a la fase líquida correspondieron a concentración de materia orgánica (DQOs), concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) y fenol.

Además al inicio y término del montaje de las botellas, se realizó de muestra de biomasa para la determinación sólidos suspendidos volátiles (SSV).

A continuación se presenta el detalle de los ensayos para la evaluación de los distintos efectos:

### ***Efecto Inóculo***

En este tipo de ensayos, se utilizó biomasa de diferente origen. El primer inóculo correspondió al de una planta de tratamiento de una industria cervecera (Estrella de Galicia) que tenía una concentración de biomasa entre  $18\text{-}20 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ . Al momento del desarrollo del ensayo presentó una actividad metanogénica entre  $0.2\text{-}0.3 \text{ g DQO}\cdot\text{CH}_4\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ .

El segundo inóculo provenía de una planta de tratamiento de una procesadora de tabaco (Chile Tabacos). Este inóculo tenía una concentración de 20 g SSV·L<sup>-1</sup>. Presentaba una actividad de 0.15-0.2 g DQO-CH<sub>4</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> al momento del desarrollo de los ensayos, y se encontraba almacenado en el reactor de mantención del laboratorio de Biotecnología Ambiental, por un tiempo aproximado de 6 meses.

La concentración de inóculo añadido a las botellas en todos los ensayos fue de 1.5 g SSV·L<sup>-1</sup>.

#### ***Efecto de la presencia de glucosa como co-sustrato***

Se evaluó el efecto que ejerce la presencia de glucosa en la degradación anaerobia de fenol. Se montaron botellas con solo fenol y fenol más glucosa como sustrato, utilizando los inóculos descritos en el punto anterior.

El montaje experimental se describe en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4:** Características de las botellas preparadas para el estudio de la degradación anaerobia de fenol, ante la presencia de glucosa.

Ensayo	Concentración Fenol (mg·L <sup>-1</sup> )	Concentración de Glucosa (mg·L <sup>-1</sup> )	Cantidad de Botellas
Blanco (biomasa sin sustrato)	-	-	6
Sustrato: Solo Fenol	200	-	6
Sustrato: Fenol y Glucosa	200	1500	6

#### ***Efecto de adiciones sucesivas de fenol (adaptación)***

Se prepararon botellas por triplicado de actividad metanogénica, para conocer el estado de la biomasa, blancos (sin presencia de fenol) y ensayos de degradación anaerobia de 200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol con distinto inóculo. En estos últimos ensayos, se adicionó pulsos consecutivos de fenol a la misma concentración (200 mg·L<sup>-1</sup>) al momento que cada uno fuera consumido por la biomasa completamente.

Las botellas con inóculo proveniente de la industria cervecera, se le realizaron dos pulsos consecutivos, mientras que a las botellas con inóculo proveniente de la planta de tratamiento de la industria de tabaco, se le adicionaron tres pulsos consecutivos.

El detalle de los experimentos de adiciones sucesivas de fenol, se presenta en la Tabla 5.5.

**Tabla 5.5:** Características de las botellas preparadas para el estudio adaptación de fenol (adiciones sucesivas).

Ensayo	Características	Concentración Fenol ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Cantidad de Botellas
Actividad metanógena	Inóculo de planta de tratamiento de tabaco y cerveza	-	6
Blanco (biomasa sin sustrato)	Blanco (solo inóculos, sin sustratos)	-	6
Degradación anaerobia de fenol	Degradación anaerobia de fenol. Se aplicaron dos pulsos consecutivos de fenol ( $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a botellas con inóculo de industria cervecera y tres adiciones a las botellas con inóculo de la industria de tabaco	200	6

La duración de cada ensayo fue acorde al tiempo requerido por los microorganismos para degradar el fenol.

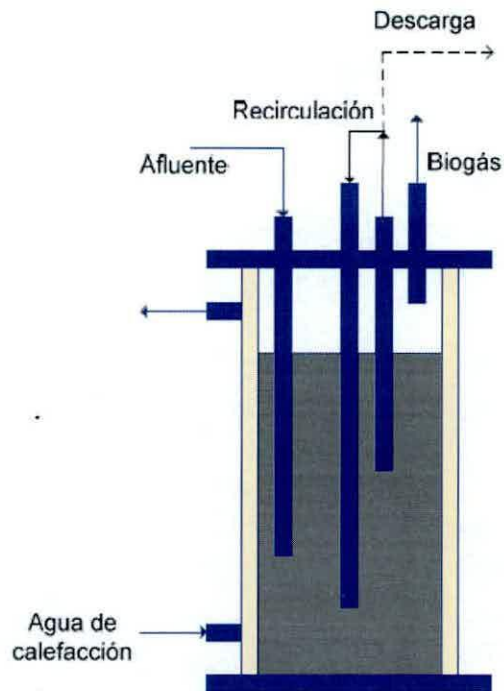
### 5.2.2 Ensayos en reactor ASBR de degradación anaerobia de fenol

Se implementó un reactor ASBR de 6 L con 5 L de volumen útil. El reactor cilíndrico tiene un diámetro de 17 cm y una altura de 34 cm, al igual que el utilizado en los ensayos presentados en el Capítulo 4, para el estudio a diferentes temperaturas.

El digester se encontró equipado con una chaqueta de agua caliente externa, que permite el funcionamiento a temperatura constante durante cada experimento (37°C).

El reactor de tipo ASBR, fue alimentado mediante la modalidad de lote, incluyendo cuatro etapas en su ciclo de operación, alimentación (20 min), reacción (dependiente de la eliminación de fenol, mayor al 90%), sedimentación (1h) y descarga (20 min), con un volumen de intercambio del 60%. El sistema de agitación del reactor fue mediante recirculación de líquido, con un caudal de  $0.43 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  como una forma de mantener un adecuado contacto de la biomasa con el líquido durante la etapa de reacción. Los caudales de alimentación, recirculación y descarga del reactor fueron controlados mediante bombas peristálticas.

En la Figura 5.7 se presenta se presenta la configuración del reactor ASBR.



**Figura 5.7:** Configuración de reactores ASBR, para la degradación anaerobia de diferentes concentraciones de fenol.

La alimentación estaba constituida por dihidrógeno fosfato de potasio y cloruro de amonio en concentraciones  $21.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $4.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente (Donoso-Bravo *et al.*, 2009).

En el caso de fenol, se preparó una solución patrón de  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . El volumen utilizado fue acorde a la concentración requerida para cada ensayo.

El inóculo suministrado por la planta procesadora de tabaco (Chile Tabacos), se encontraba con una concentración de  $20 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ . En el interior del reactor ASBR se dispuso de una concentración de inóculo de  $12 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Durante la operación del reactor se consideraron tres fases: a) puesta en marcha; b) aclimatación a fenol; c) Periodos de prueba donde se incrementó la concentración de fenol. En la fase de puesta en marcha y activación de biomasa la biomasa fue alimentada con glucosa ( $5 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ ) por un tiempo aproximado de 21 días.

En la fase de aclimatación con fenol, el reactor fue alimentado con una concentración de  $120\text{-}240 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , durante 80 días aproximadamente, hasta alcanzar una degradación constante.

Posterior a la aclimatación se desarrollaron 5 periodos de operación donde la concentración de fenol fue aumentando progresivamente hasta alcanzar una concentración a la que se haya reportado inhibición de los microorganismos ( $120, 240, 500, 800, 1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y cada concentración fue mantenida en un rango de 18 a 85 días.

En la Tabla 5.6, se presentan las diferentes fases y periodos de operación del reactor.

**Tabla 5.6:** Fases y periodos de operación de reactor ASBR en ensayos de degradación anaerobia de fenol.

Periodo	Tiempo de operación (d)	Número de ciclos
Puesta en marcha (Glucosa 5 g COD·L <sup>-1</sup> )	0-21 (21 días)	15-20
Aclimatación (Fenol 120±240 mg·L <sup>-1</sup> )	0-80 (80 días)	20
I (Fenol 120±60 mg·L <sup>-1</sup> )	81-120 (39 días)	22
II (Fenol 240 ±4 mg·L <sup>-1</sup> )	121-139 (18 días)	7
III (Fenol 500 ± 50 mg·L <sup>-1</sup> )	140-161 (21 días)	6
IV (Fenol 800 ± 7 mg·L <sup>-1</sup> )	162-195 (33 días)	7
V (Fenol 1200 ± 43 mg·L <sup>-1</sup> )	196-281 (85 días)	4

Se realizaron muestreos diarios durante la fase de reacción de todos los ciclos a las diferentes concentraciones, presentándose los resultados en detalle de los perfiles de degradación desarrollados en el último ciclo de operación a las distintas concentraciones de fenol, para la medición de parámetros de operación como: concentración de materia orgánica soluble, concentración de ácidos grasos volátiles, pH, alcalinidad y fenol.

Se realizaron además toma de muestra de biomasa desde el interior del reactor para el análisis de biología molecular y concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV).

### 5.2.3 Metodología Analítica

#### *Ensayos en botella y reactor*

El pH fue medido online por un sensor de pH (OAKTON, WD-35801-00). Las concentraciones de demanda química de oxígeno (DQOs) y alcalinidad (CaCO<sub>3</sub>) fueron medidas de acuerdo a Standard Methods (APHA, 1995). Los ácidos grasos

volátiles (AGVs) y fenol fueron detectados y cuantificados mediante cromatografía gaseosa GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado con 30" x 4mm ID columna empacada GP 60/80 Carbowax C/0.3% Carbowax 20M/0.1% H3PO4 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, US). El análisis fue llevado a cabo a 120°C, con nitrógeno como carrier gas (50 mL.min<sup>-1</sup>) y detector FID (200°C).

El metano fue medido igualmente por cromatografía gaseosa, usando un cromatógrafo de gas Clarus 500 (Perkin Elmer, Waltham, MA, US) equipado con columna de teflón Hayesep-Q, Supelco; 4 m x 1/8" OD.

#### 5.2.4 Ajuste de datos a modelo matemático

Los resultados obtenidos del último ciclo de degradación a las diferentes concentraciones de fenol estudiadas en un reactor ASBR (120, 240, 500, 800 y 1200 mg·L<sup>-1</sup>), fueron utilizados para ajustarlos al modelo propuesto por Chong *et al.*, (2009). Este modelo fue desarrollado para simular la degradación de compuestos xenobióticos, considerando el tiempo de retardo (lag) y la formación de la biomasa encargada de la degradación, mediante una función de tipo sigmoideal. El modelo predice los periodos de aclimatación y degradación de un compuesto xenobiótico mediante lodos activados.

La aplicación de este modelo, nos induce a la necesidad de una representación racional de aclimatación microbiana, el cual podría ser aplicado para la simulación de la degradación de compuestos complejos como fenol, enfocada fundamentalmente a la etapa de hidrólisis.

La ecuación considerada para el ajuste de los datos de degradación de fenol corresponde a la siguiente:

$$u(t) \longrightarrow \frac{u_{\max}}{1 + e^{-\alpha(t-\theta)}} \quad (5.1)$$

donde:

u: Velocidad específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>).

$u_{mzx}$ : Velocidad específica máxima de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

$\alpha$ : constante ( $h^{-1}$ ).

$t$ : tiempo (h).

$\sigma$ : tiempo al cual ocurre la máxima conversión o tiempo de retardo (h).

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Degradación anaerobia de fenol en botellas

En esta sección se presentan ensayos realizados en botellas de degradación anaerobia de fenol, los cuales se encuentran divididos de acuerdo al efecto del origen del inóculo utilizados (planta de tratamiento de la industria cervecera y procesadora de tabaco respectivamente), el efecto de glucosa como co sustrato y el efecto de adiciones sucesivas de fenol, para determinar una posible adaptación de los microorganismos encargados de la degradación al fenol.

Además se presenta un apartado con los resultados obtenidos en los blancos de cada experimento (sin adición de sustrato).

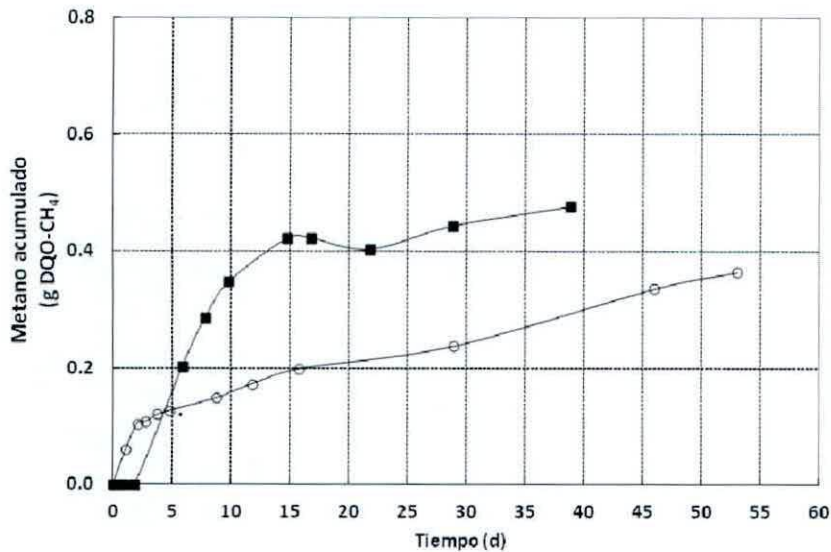
#### 5.3.1.1 Blancos de diferentes inóculos

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de los blancos donde no se aplicó ningún tipo de sustrato, correspondiendo a las botellas que presentaban solo inóculo en su interior.

La clasificación de presentación de estos resultados es de acuerdo a los distintos inóculos utilizados en los montajes experimentales, los cuales fueron utilizados para los ensayos donde se evaluó el efecto de inóculo, presencia de glucosa y adiciones sucesivas de fenol.

#### ***Inóculo de una planta de tratamiento de una industria cervecera***

Los resultados obtenidos en los ensayos donde no se adicionó sustrato, se presentan en la Figura 5.8. En esta figura se pueden observar dos curvas, que representan el momento de las adiciones consecutivas de fenol (primera y segunda adición).



**Figura 5.8:** Metano acumulado en ensayos sin adición de sustrato (blanco) de degradación anaerobia de fenol utilizando biomasa de planta de tratamiento de una industria cervecera. Blanco de ensayo de primera adición de fenol (■); segunda adición de fenol (○).

Ambas curvas representan el promedio de los ensayos desarrollados en triplicado. En estos ensayos se pudo observar producción de biogás, por lo que se realizó la cuantificación metano para ser descontado en la producción de los experimentos de degradación de fenol con efecto de inóculo, co-sustrato y adiciones consecutivas de fenol. La producción de metano en el blanco, alcanzó un valor promedio cercano a 0.4 y 0.2 g DQO-CH<sub>4</sub>, para el primer y segundo ensayo respectivamente. En el primer caso, el resultado obtenido corresponde a un valor muy alto considerando que en este ensayo no hay adición de sustrato. Esto puede deberse a que en la biomasa quedaran restos de algún sustrato que haya estado tratando previamente, a pesar de que fue lavado reiteradamente antes al montaje del ensayo de degradación de fenol.

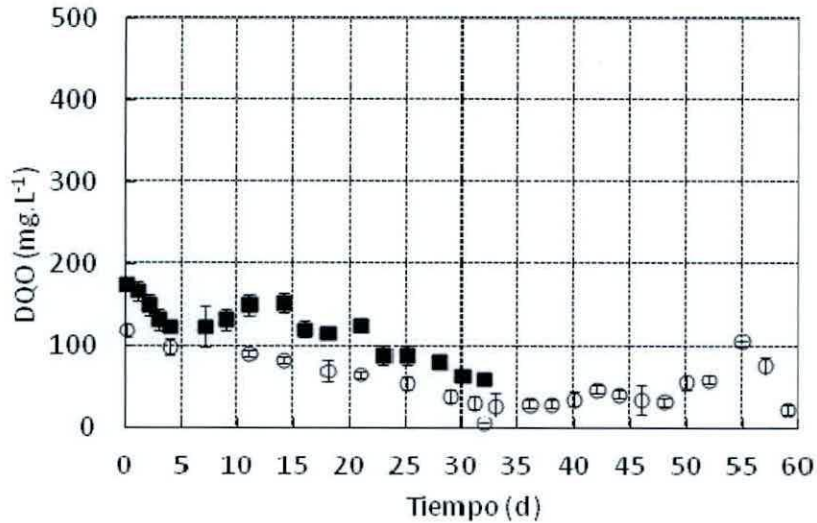
En el caso del blanco del segundo ensayo, el valor de metano acumulado puede estar influenciado por el largo tiempo en que la biomasa estuvo en el ensayo previo de degradación de fenol, por lo que podría haberse encontrado en una fase endógena.

En ningunas de las botellas se observó producción de AGVs. Esto pudo ser producto de la mayor actividad metanogénica de la biomasa, consumiendo rápidamente estos compuestos intermediarios.

### ***Inóculo de planta de tratamiento de industria de tabaco***

En la Figura 5.9, se presenta la concentración de materia orgánica presente en los ensayos de los blancos de degradación anaerobia de fenol al utilizar inóculo proveniente de la planta de tratamiento de la industria de tabaco. En la Figura 5.9 se pueden observar dos curvas, que representan el momento de las adiciones consecutivas de fenol (primera y segunda adición).

En la curva del primer ensayo, se pudo observar la presencia de una concentración de materia orgánica soluble cercana a  $120 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$  al inicio del experimento, la cual fue disminuyendo en el tiempo. Sin embargo, aproximadamente al día 50 de ensayo, se observó un nuevo aumento, probablemente generado por la presencia de ácidos grasos provenientes del lodo, debido largo tiempo de transcurrido el ensayo. Este comportamiento fue observado en triplicado de acuerdo a las botellas de ensayo.



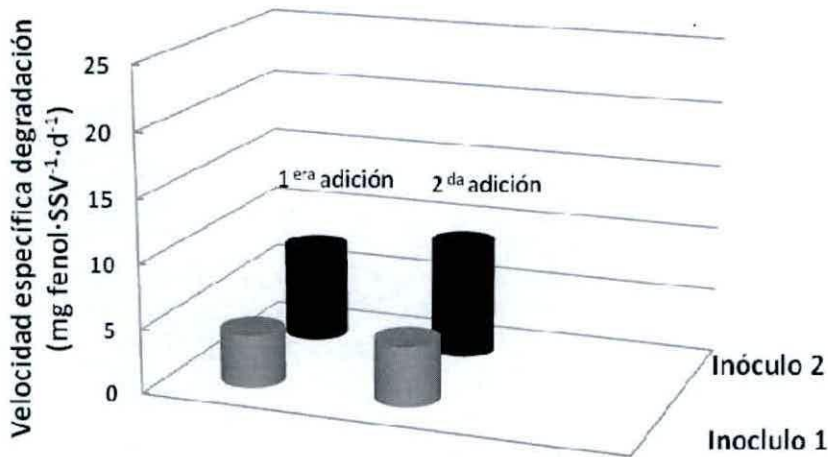
**Figura 5.9:** Concentración de materia orgánica en el blanco en de ensayo de degradación anaerobia de fenol utilizando biomasa proveniente de planta de tratamiento de tratamiento de una industria procesadora de tabaco. Blanco de ensayo de primera adición de fenol (○); segunda adición de fenol (■).

Con respecto al blanco de la segunda adición, al igual que en el ensayo anterior, se detectó una leve producción de biogás en el tiempo, lo que en total, alcanzó una producción de metano acumulado promedio de 0.25 g DQO-CH<sub>4</sub> (datos no mostrados), curva de valores que fue restada a la producción de metano alcanzada en los ensayos de degradación de fenol, considerando el efecto inóculo, presencia de glucosa y adiciones consecutivas de fenol, como una forma de contrarrestar el efecto de producción de metano no proveniente de la degradación directa de fenol, sino que producto de la presencia de algún compuesto indeseado, o la degradación misma de lodo utilizado.

Con respecto a la medición de concentración de materia orgánica soluble en el segundo ensayo, se pudo observar la presencia de una concentración cercana a 200 mg DQO·L<sup>-1</sup> al inicio del ensayo, la cual fue disminuyendo en el tiempo (Figura 5.9).

### 5.3.1.2 Efecto Inóculo

En la Figura 5.10 se presentan los resultados obtenidos de velocidad específica de degradación anaerobia de fenol al utilizar inóculos de diferentes orígenes.



**Figura 5.10:** Velocidad específica de degradación de fenol, utilizando inóculos de diferente origen, al aplicar adiciones sucesivas de fenol. Inoculo 1: industria cervecera; Inoculo 2: industria de tabaco.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar que existe una diferencia en la capacidad de degradación de fenol de acuerdo a la procedencia de los microorganismos encargados del tratamiento anaerobio ( $p$ -value 0.04), ya que las velocidades específicas de degradación son mayores a partir de un inóculo proveniente de una planta de tratamiento de la industria de tabaco que de uno proveniente de la industria cervecera. Esto puede explicarse a que quizás la biomasa del inóculo de tabaco presenta una estructura microbiana mejor adaptada a compuestos aromáticos, producto de la actividad que registraba previamente a la degradación de fenol.

El aumento de velocidad específica producto de adiciones sucesivas de fenol, muestra una adaptación a la degradación del compuesto, que se ve más reflejado en el inóculo de la industria de tabaco.

De acuerdo a estos resultados, es que los ensayos posteriores desarrollados en un reactor ASBR, se llevaron a cabo utilizando el inóculo con mayor actividad a la degradación de fenol, correspondiente al proveniente de la planta de tratamiento de la industria de tabaco.

### 5.3.1.3 Efecto de la presencia de glucosa como co-sustrato

En la Figura 5.11 se presentan los resultados obtenidos de velocidad específica de degradación anaerobia de fenol al adicionar glucosa como co-sustrato.

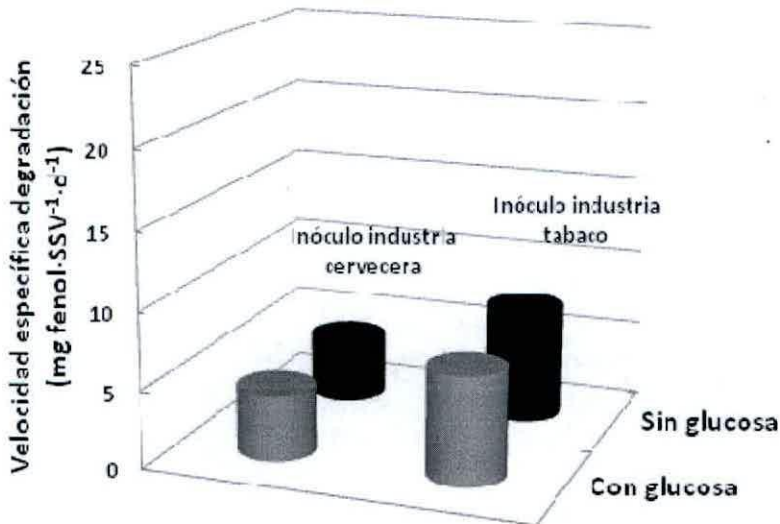


Figura 5.11: Velocidad específica de degradación de fenol de distintos tipos de inóculos, utilizando glucosa como co-sustrato.

Como se observa en la Figura 5.11, no se registran mayores diferencias en la velocidad específica de degradación de fenol al adicionar glucosa como co-sustrato en ambos tipos de inóculos estudiados ( $p$ -value 0.96). Las velocidades específicas de degradación correspondieron a 4.3 y 4.1  $\text{mg fenol} \cdot \text{SSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  para el inóculo proveniente de la industria cervecera con y sin glucosa respectivamente y de 7.0 y 7.4  $\text{mg fenol} \cdot \text{SSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  para el inóculo proveniente de la industria de tabaco con y sin glucosa respectivamente.

La producción de metano, desaparición de fenol y DQOs, se registraron cerca de los días 25-30 de ensayo, levemente más tarde que en los ensayos sin presencia de glucosa. En este caso la producción de biogás obtenida finalmente corresponde al valor teórico esperado cercano a 0.79 g DQO-CH<sub>4</sub>, valor producto de la presencia de glucosa además de fenol (datos no mostrados).

En este ensayo tampoco se registró la presencia de AGVs en ningún tiempo de muestreo.

En este caso la glucosa no ejerció un efecto de co-sustrato que se degradara en conjunto con el compuesto en estudio, sino que los microorganismos consumían primero la glucosa (compuesto de fácil degradación) y posteriormente el fenol (datos no mostrados), no cumpliéndose el objetivo.

De acuerdo a estos resultados, es que para los ensayos desarrollados en el reactor ASBR, no se utilizó glucosa como co-sustrato.

#### **5.3.1.4 Efecto de adiciones sucesivas de fenol (adaptación)**

A continuación se presentan los resultados obtenidos al aplicar adiciones sucesivas de 200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol en botellas de ensayos de degradación anaerobia del compuesto utilizando inóculo de plantas de tratamiento de una industria cervecera y una industria de tabaco.

En la Figura 5.12 se presentan las gráficas de los resultados obtenidos de las adiciones sucesivas de fenol utilizando inóculo de la planta de tratamiento de la industria cervecera.

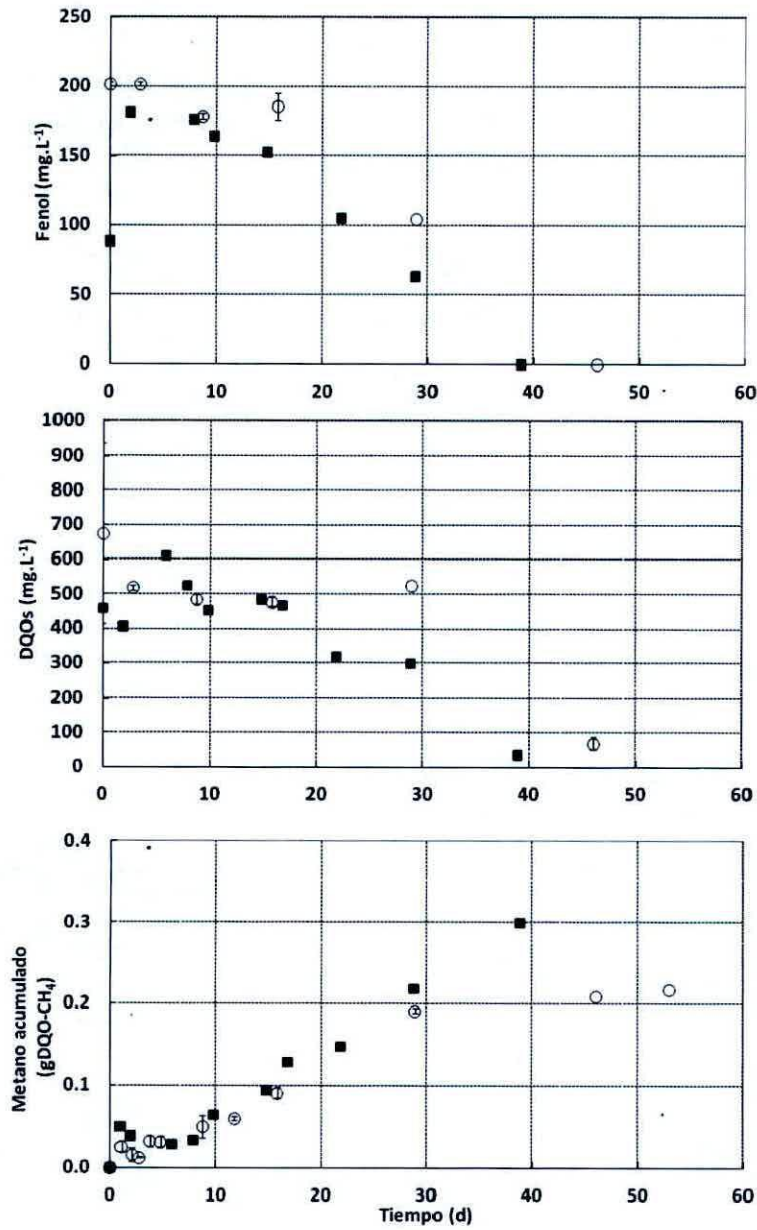


Figura 5.12: Metano acumulado, concentración de fenol y DQOs en ensayo de adiciones sucesivas de 200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol. Inóculo planta de tratamiento de cerveza.

Como se puede apreciar en las gráficas de adiciones sucesivas de fenol utilizando inóculo proveniente de la planta de tratamiento de la industria de cerveza, Figura 5.12, se aplicaron dos adiciones consecutivas de fenol, una vez que se había consumido completamente el sustrato.

Con este tipo de inóculo el ensayo de la primera y segunda adición tuvo una duración de aproximadamente 45 y 38 días respectivamente (Figura 5.12).

Se puede observar además, un periodo de latencia de aproximadamente 20 y 10 días para la primera y segunda adición. Estos últimos resultados nos muestran que el periodo de latencia fue reducido aproximadamente a la mitad durante la segunda adición, quizás debido a que los microorganismos que poseen la capacidad de degradación de fenol presentaban una maquinaria más activa respecto a la primera exposición al compuesto.

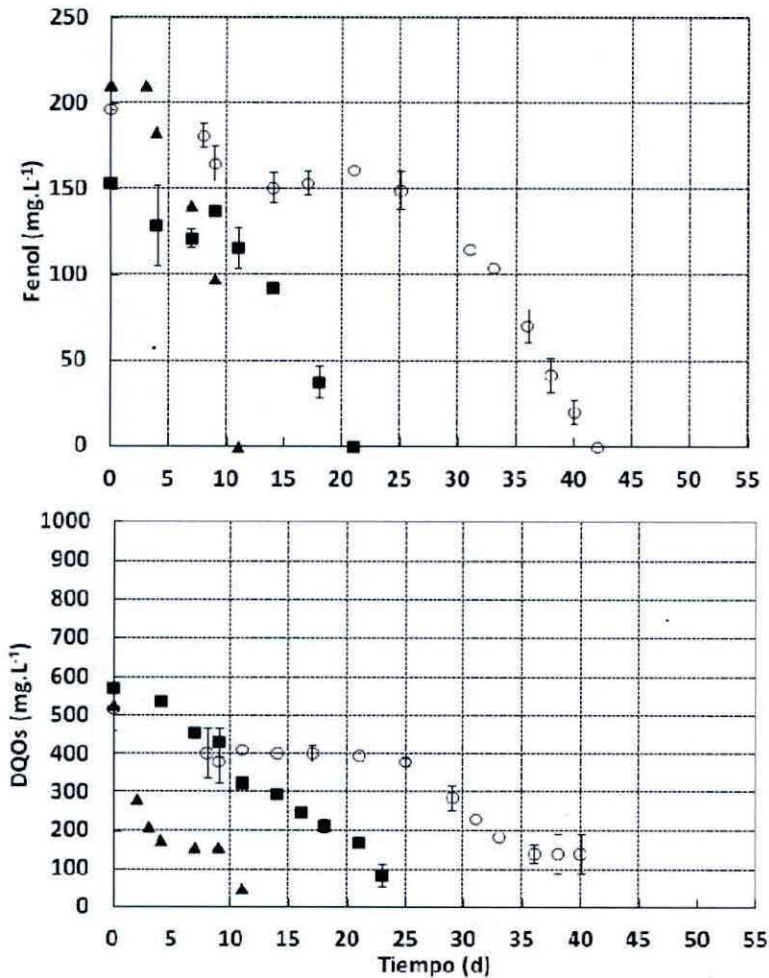
Como se presenta en la Figura 5.12, la producción de metano comienza a partir de los primeros días de ensayo, registrándose un aumento más significativo en los días próximos al 20 y 10 durante la primera y segunda adición respectivamente, concordando con el comienzo de disminución de la concentración de fenol. Que la producción de metano haya comenzado antes de que se observara una disminución importante de la concentración de fenol, puede deberse a factores que no son muy claros, por ejemplo que previamente iniciado el ensayo haya habido presencia de algún compuesto que no haya sido identificado y fuera de más rápida o fácil degradación que el fenol, o simplemente que haya existido una degradación de fenol desde el comienzo en cantidades muy pequeñas que no haya sido detectada por el método de medición de fenol. Sin embargo, la cantidad de metano obtenida, representada en forma de g DQO, prácticamente concuerda con el valor teórico esperado, el cual corresponde a  $0.19 \text{ g DQO-CH}_4$ , lo que indicaría, al considerar este parámetro, que el metano provendría sólo producto de la degradación de fenol, por lo que la hipótesis de que existiera la presencia de otro compuesto es difícil de corroborar por éstos resultados.

Otro parámetro medido correspondió a la concentración de materia orgánica medida como DQOs (Figura 5.12), como una forma de corroborar los valores

medidos como concentración de fenol, al ser la única fuente de carbono suministrada. Los resultados obtenidos se correlacionan con la desaparición de fenol y la mayor producción de biogás.

En este ensayo no se observó presencia de AGVs en ningún tiempo de muestreo, lo que puede ser debido a una rápida desaparición de estos compuestos intermediarios por una mayor actividad metanogénica de la biomasa.

En la Figura 5.13 se presentan las gráficas de los resultados obtenidos de las adiciones sucesivas de fenol utilizando inóculo de la planta de tratamiento de la industria de tabaco.



**Figura 5.13:** Concentración de fenol y DQOs en ensayo de adiciones sucesivas de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, utilizando un inóculo de una planta de tratamiento de una industria de tabaco.

En los ensayos donde se utilizó inóculo proveniente de la planta de tratamiento de la industria de tabaco, se adicionaron tres pulsos de fenol consecutivos.

Como se puede observar en la Figura 5.13, el tiempo de duración de los ensayos correspondió a 40-45, 20 y 11 días para la primera, segunda y tercera adición de

fenol respectivamente, momento en el cual ya no se detecta la presencia del compuesto en estudio.

Durante los ensayos desarrollados con éste tipo de inóculo, se pueden observar una degradación de fenol (Figura 5.13), registrándose un periodo de latencia de 25, 10 y 4 para la primera, segunda y tercera adición respectivamente. El periodo de latencia obtenido durante la primera adición fue similar al registrado al utilizar biomasa proveniente de la industria cervecera, al momento de adicionar por primera vez fenol, cuyo periodo de tiempo para iniciar la degradación fue aproximadamente 25 días en una primera adición de sustrato.

La producción de metano más significativa comienza a partir del día 25, 10 y 4 para cada adición de fenol, respectivamente, concordando con el comienzo de disminución de la concentración de fenol. La cantidad de metano obtenido, representado en forma de g DQO, es mayor que el valor teórico esperado, el cual corresponde a 0.19 g DQO-CH<sub>4</sub>, lo que puede deberse a un problema de medición (datos no mostrados).

Otro parámetro medido correspondió a DQOs (Figura 5.13), como una forma de corroborar los valores medidos como concentración de fenol, al ser la única fuente de carbono suministrada. Los resultados obtenidos se correlacionan con la desaparición de fenol.

En este ensayo no se registró presencia de AGVs.

### **5.3.1.2 Comparación y análisis de los resultados obtenidos de la degradación anaerobia de fenol en botellas**

La concentración escogida para el estudio de biodegradabilidad de fenol (200 mg·L<sup>-1</sup>), fue establecida para asegurar que a esa concentración no existía un efecto inhibitorio para los microorganismos encargados de la degradación (Hernández *et al.*, 2008), y así poder estimar las condiciones para el diseño experimental aplicado posteriormente en el reactor ASBR.

En la Tabla 5.7, se presenta un detalle de las características promedios de las botellas utilizadas para cada ensayo, de manera de poder establecer una

comparación de las velocidades de degradación a las diferentes adiciones del fenol añadidas utilizando dos tipos de inóculos.

**Tabla: 5.7:** Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de degradación anaerobia de fenol en botellas con biomasa de planta de tratamiento de industria cervecera y tabaco.

	Tiempo retardo (d)			Máxima velocidad de degradación (mg fenol·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )			Velocidad específica de degradación (mg fenol·SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )		
	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>era</sup>	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>era</sup>	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>era</sup>
Cerveza (Fenol)	20-25	10	ND	6.1	7.1	ND	4.1	4.7	ND
Cerveza (Fenol+glucosa)	25-30	10	ND	6.5	8.0	ND	4.3	5.3	ND
Tabaco (Fenol)	25	10	4	11.1	13.3	35.2	7.4	8.9	23.5
Tabaco (Fenol+glucosa)	25	10	4	10.5	13.8	36.0	7.0	9.2	24.0

Para ambos tipos de inóculo, el tiempo de inicio de degradación fue de 20-25 días después de la primera adición de fenol, y la degradación se completó después de 40-45 días. Después de la segunda adición de fenol, el intervalo de tiempo se redujo a 8-10 días y la degradación se completó en 20-25 días, revelando de esta manera, que la biomasa presentaría algún tipo de adaptación al fenol, al reducirse el tiempo requerido para la degradación total del compuesto. En el caso del ensayo con inóculo de la industria de tabaco, en la tercera adición, el tiempo de inicio y total de degradación fenol correspondió a 4 y 11 días respectivamente, aún menor que en los ensayos anteriores, corroborándose la hipótesis.

Los resultados obtenidos de los ensayos de biodegradabilidad anaerobia de fenol, nos muestran que no existen grandes diferencias en el tiempo necesario para una degradación completa de 200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol, al utilizar distintos tipos de inóculos,

presentado los microorganismos un proceso de adaptación que es independiente del origen del inóculo o del tipo de sustrato que hayan degradado originalmente.

Ambos inóculos pudieron alcanzar la degradación máxima fenol (100%). Sin embargo, lo realizaron a diferentes velocidades máximas de degradación (Tabla 5.8). Esto se puede haber debido a diferentes causas. Las concentraciones de fenol añadidas presentan cierta desviación con respecto a la concentración teórica, por lo que al momento del cálculo de velocidad, este factor presenta alguna incidencia.

Por lo tanto a partir de los resultados obtenidos podemos destacar ciertos aspectos que son relevantes en esta parte de la investigación:

- El origen de la biomasa no afecta el proceso de adaptación de los microorganismos encargados de la degradación, pero sí afectan el valor absoluto de la velocidad máxima de degradación.
- La presencia de un compuesto fácilmente degradable como glucosa, no afecta la degradación anaerobia de fenol.
- El número de adiciones de fenol incrementa la adaptación y la velocidad de degradación, pero disminuye el tiempo lag o el tiempo de retardo desde que comienza la degradación.

Si comparamos con otros autores, (Fang *et al.*, 2006) desarrolló estudios en batch de degradación anaerobia de fenol, con concentraciones iniciales en un rango de 50 a 1000 mg·L<sup>-1</sup> a una temperatura de 55°C, utilizando biomasa desde un reactor de tipo UASB que se encontraba tratando fenol a una concentración de 630 mg·L<sup>-1</sup> por un tiempo aproximado de 177 días como única fuente de sustrato. Ellos obtuvieron que después de un período de aclimatación (hasta 20 días para 1000 mg·L<sup>-1</sup>), el fenol era completamente degradado. A la concentración de 200 mg·L<sup>-1</sup> (similar a nuestros ensayos), ellos obtuvieron una máxima velocidad de degradación de 2.6 mg fenol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, con un fase de tiempo lag de 5 días. Los resultados obtenidos por estos autores, confirman las hipótesis que pudimos desprender de nuestra investigación. Primero, que el inóculo utilizado no afecta el proceso de adaptación, ya que los tiempos de inicio y término de degradación son muy similares a los que obtuvimos durante la tercera adición de fenol, cuando la biomasa presentaba características de

adaptación a fenol. En el caso de Fang *et al.* (2006), la biomasa también se encontraba relativamente adaptada a la presencia de fenol, ya que en su investigación provenía de un reactor que previamente se encontraba tratando fenol. En segundo lugar, confirmamos que la procedencia del inóculo afecta el valor absoluto de la velocidad de degradación, ya que en el caso de nuestra investigación, los valores son mucho más altos.

Otro caso donde los tiempos de degradación de fenol fueron menores por utilizar biomasa adaptada ya que previamente trataba compuestos inhibitorios, es lo reportado por Guiot *et al.* (2000) donde reactores UASB bioaumentado con un consorcio enriquecimiento metanogénico (capaces de degradar una mezcla de compuestos fenólicos, es decir, fenol, o-cresol y p-) mejoró la puesta en marcha de los reactores en comparación con un reactor inoculado solamente con gránulos anaerobios.

Guieysse *et al.* (2001) en un trabajo previo trabajando en reactor alimentado en la modalidad fed-batch de un volumen de 4.5 L, se le aplicaron tres adiciones de fenol de una concentración de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , añadiendo además nitrato como aceptor de electrones. La duración de la fase lag disminuyó significativamente después de cada adición de fenol, siendo 12, 2 y 1 día para la primera, segunda y tercera adición de fenol respectivamente. Del mismo modo, la velocidad de degradación de fenol aumentó de 1.9, 4.7 y  $6.6 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  después para las tres adiciones respectivamente. Tendencia similar a la obtenida en nuestro estudio, con reducción del tiempo de retardo de inicio de la degradación, aunque con velocidades de degradación menores.

Con respecto a la presencia de glucosa como co-sustrato, queda demostrado por los resultados obtenidos, que no tiene una influencia significativa en la degradación anaerobia de fenol. Esto es contradictorio a lo planteado por otros autores, los cuales sugieren que sustratos que son difíciles de degradar pueden ser efectivamente degradados en presencia de sustratos fácilmente degradables (co-metabolismo), siendo el co-sustrato requerido cuando un sustrato no es capaz de servir como fuente de energía para el crecimiento bacteriano (Veeresh *et al.*, 2005). La biotransformación anaeróbica de compuestos orgánicos a metano ocurre a través

de precursores de metano. Co-sustratos (glucosa, sacarosa, VFA, metanol, etc.), en presencia de fenoles, podrían mantener la fase metanógena activa y la biomasa aclimatada para llevar a cabo la hidrogenación, la fisión y la fragmentación del anillo fenólico (Veeresh *et al.*, 2005). Tay *et al.*, (2001), quienes utilizaron glucosa como suplemento para promover una mayor eliminación de fenol ( $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y aclimatación del lodo en un reactor de tipo UASB. Obtuvieron una eliminación de fenol de 98% con glucosa y 88% sin glucosa, aunque los resultados expresados como actividad metanogénica específica en presencia y ausencia de glucosa  $0.38$  y  $0.31 \text{ g DQO}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , respectivamente, no consideramos que sean muy significativos.

Otros estudios trabajando con aguas residuales sintéticas preparadas con fenol y diluidas con melazas ( $2800:1200 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con un TRH de 12 h y VCO de  $8 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , obtuvieron un porcentaje promedio de eliminación de DQO y eficiencia de eliminación de fenol de 81.8% y 87.2%, respectivamente (Mehrotra *et al.*, 2003). Kennes *et al.*, (1997) reportaron una degradación completa de DQO de p-cresol a una concentración de  $650 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en presencia de fuente de carbono auxiliar (p-cresol: AGV= 2:1 en base DQO). En ausencia de VFA, sólo el 80% de p-cresol fue eliminado.

En este estudio se consideró, a pesar de las investigaciones reportadas, donde si se aprecia un efecto positivo por la presencia de un co-sustrato, estos numéricamente no son altamente significativos, por lo que quizás en nuestro caso, por menor que haya sido la diferencia esta no fue detectada. Si efectivamente existiera algún co-factor producto de la degradación de glucosa, que favorezca la degradación de fenol, los tiempos de degradación son tan diferentes (menos de 1 día para glucosa, y no menor de 20 días para el inicio de degradación de fenol) que este efecto positivo puede llegar a ser prácticamente insignificante. Es por esto que para los ensayos posteriores a la primera adición de fenol en botellas, y luego en reactores, la presencia de co-sustrato como glucosa fue descartada.

### 5.3.2 Degradación anaerobia de fenol en reactor ASBR

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de ciclos por lotes consecutivos y perfiles de degradación de fenol realizados ( $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $240 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), como parte del proceso de adaptación de la biomasa a diferentes concentraciones de fenol.

#### 5.3.2.1 Puesta en marcha y aclimatación de la biomasa a presencia de fenol

Como parte del periodo de puesta en marcha, el reactor fue alimentado con glucosa para la activación de la biomasa ( $5 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Durante un tiempo de 21 días, la biomasa fue capaz de consumir completamente el sustrato en un periodo menor a 24 horas (datos no mostrados).

Posteriormente, el periodo de aclimatación ( $120\text{-}240 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol) se llevó a cabo durante 20 ciclos de operación del reactor, en un tiempo de 80 días. En los últimos ciclos de este periodo, la biomasa fue capaz de alcanzar un porcentaje de eliminación de fenol mayor al 90% en un tiempo de reacción menor a 24 horas. Esto indicó la alta capacidad de la biomasa para degradar fenol.

Durante la aclimatación, la alcalinidad total fue mantenida en  $2.5\text{-}3 \text{ g CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  y el pH alrededor de 7.5-8.0.

En éste periodo no se registró la presencia de AGVs.

En la Figura 5.14 se presentan las gráficas de los ciclos o lotes consecutivos de degradación anaerobia de fenol, pH y alcalinidad durante el periodo de aclimatación.

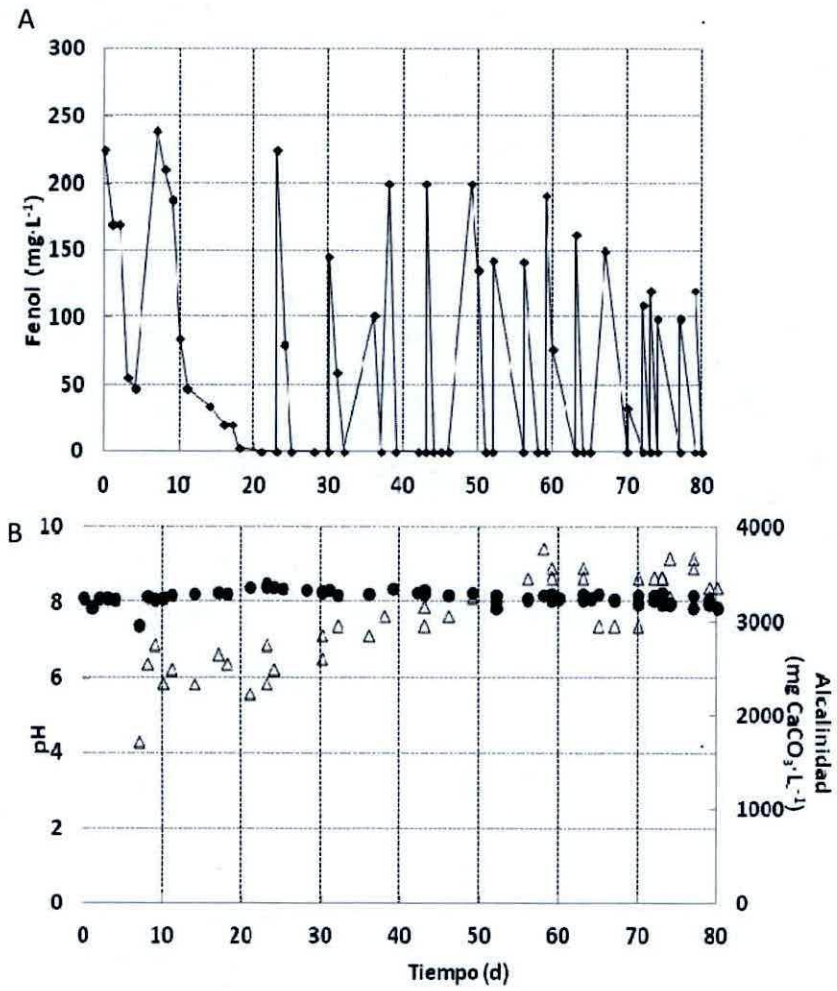
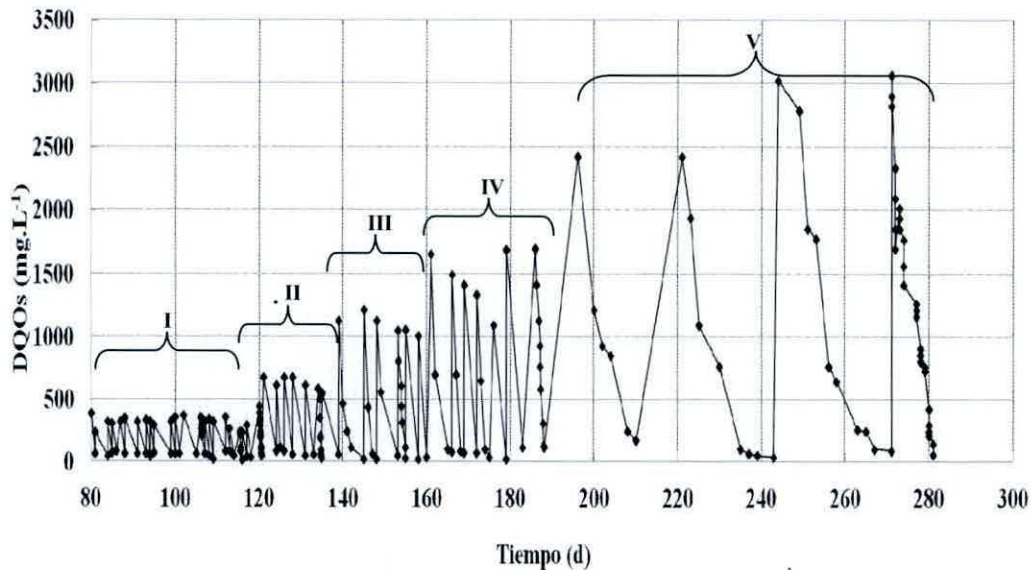


Figura 5.14: Concentración de fenol (A) pH (•) y alcalinidad (Δ) (B) en periodo de aclimatación de la biomasa (120-240 mg·L<sup>-1</sup> de fenol) en reactor ASBR.

### 5.3.2.2 Operación de ciclos consecutivos con aumento de concentraciones de fenol

Una vez adaptada la biomasa a la presencia de fenol, se procedió a aumentar la concentración gradualmente, operando en un tiempo tal, que la operación se estabilizara en cada condición, alcanzando un porcentaje eliminación constante.

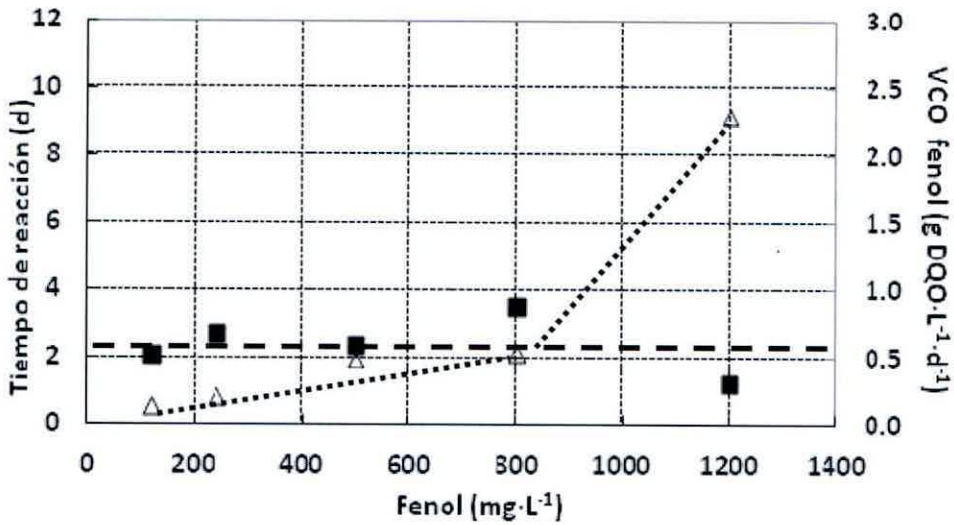
Como se mencionó anteriormente, en la sección de Materiales y Métodos de este capítulo, las concentraciones se fueron prácticamente duplicando en el interior del reactor comenzando en 120, 240, 500, 800 y 1200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Una visualización general de la operación, considerando los aumentos de concentración en el tiempo, posterior al periodo de aclimatación (posterior al día 80 de operación), se presentan en la Figura 5.15.



**Figura 5.15:** Concentración de fenol durante los diferentes ciclos de operación a diferentes concentraciones iniciales (120, 240, 500, 800 y 1200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Como se puede observar en la Figura 5.15, claramente se distinguen los picos de aumento de concentración de fenol correspondientes a 120, 240, 500, 800 y 1200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , expresados como concentración de materia orgánica. La biomasa anaerobia a

medida que se aumenta la concentración de materia orgánica, requiere aproximadamente entre 4-6 ciclos de operación, para adaptarse a cada concentración. Es importante destacar que con los cambios de condición de operación, producen un alargue del tiempo de duración de los ciclos de operación del reactor (proporcionales al aumento de la concentración de fenol) para que la biomasa sea capaz de eliminar un porcentaje mayor al 90% de fenol (Figura 5.16). A partir de una concentración de  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , la velocidad de degradación disminuye (probablemente debido a un efecto inhibitorio por la alta concentración de fenol), lo que favorece el aumento del tiempo de reacción, causando que a una concentración de  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , la VCO (velocidad de carga orgánica) sea menor.



**Figura 5.16:** VCO (■) y tiempo de reacción (Δ) en el último ciclo de operación a diferentes concentraciones de fenol ( $120, 240, 500, 800$  and  $1200 \text{ mg phenol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en reactor ASBR. La línea punteada representa la VCO promedio.

A continuación se presentan un perfil detallado de degradación de fenol en el reactor ASBR a cada concentración estudiada, para esto, se consideró el último ciclo a cada concentración, de manera que se encontrara estable en su operación.

***Perfiles de degradación anaerobia de fenol en reactor ASBR***

En este punto se presenta un perfil de degradación de 120, 240, 500, 800 y 1200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol en el reactor ASBR.

Como de muestra en la Figura 5.17, existe una correlación entre las concentraciones de fenol y sus correspondientes en concentraciones en DQOs, considerando 2.38 g DQO: g fenol, de acuerdo a los balances estequiométricos.

Se puede apreciar, que a una concentración de 120  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, en la hora 7 de operación ya se comienza a apreciar una disminución en la concentración de fenol, para posteriormente ser más significativa a partir de la hora 8, llegando a una degradación total cercana a la hora 13 de operación.

Para una concentración de 240  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, el tiempo de degradación total se llevó a cabo entre las horas 20-22 del ciclo de operación, aumentando en aproximadamente 5 horas, con respecto a la concentración anteriormente aplicada. La disminución de la concentración de fenol, es más significativa a partir de la hora 10 de operación. En este caso, los valores de concentración de materia orgánica, presentan la misma tendencia en la curva de degradación.

Como se puede apreciar a una concentración de 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, el tiempo de degradación total de fenol, se llevó a cabo entre las horas 40-45 del ciclo de operación, aumentando con respecto a la concentración de 240  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, correlacionándose con la diferencia de concentración en que fue aumentada. La disminución de la concentración de fenol, es más significativa a partir de la hora 15 de operación, similar que en el caso anterior.

La Figura 5.17 muestra además que a una concentración de 800  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol, el tiempo de degradación total de fenol se llevó a cabo entre las horas 50-55 del ciclo de operación. La disminución de la concentración de fenol, es más significativa a la hora 20.

Finalmente a una concentración de 1200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol el tiempo de degradación total de fenol se llevó a cabo cerca de la hora 200 del ciclo de operación,

correlacionándose con la diferencia de concentración en que fue aumentada. La disminución de la concentración de fenol, es más significativa a la hora 25.

Con respecto a los valores de pH y alcalinidad, estos se mantuvieron estables durante el ciclo de operación a las diferentes concentraciones estudiadas. El pH se mantuvo en un rango cercano a 7.0-8.0 y la alcalinidad entre 1.5 y 2.0 g  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ .

Cabe destacar además que no se observó concentraciones de AGV mayores a 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , valores cercanos al error del método de medición, por lo que para efectos de resultados no se consideraron significativos.

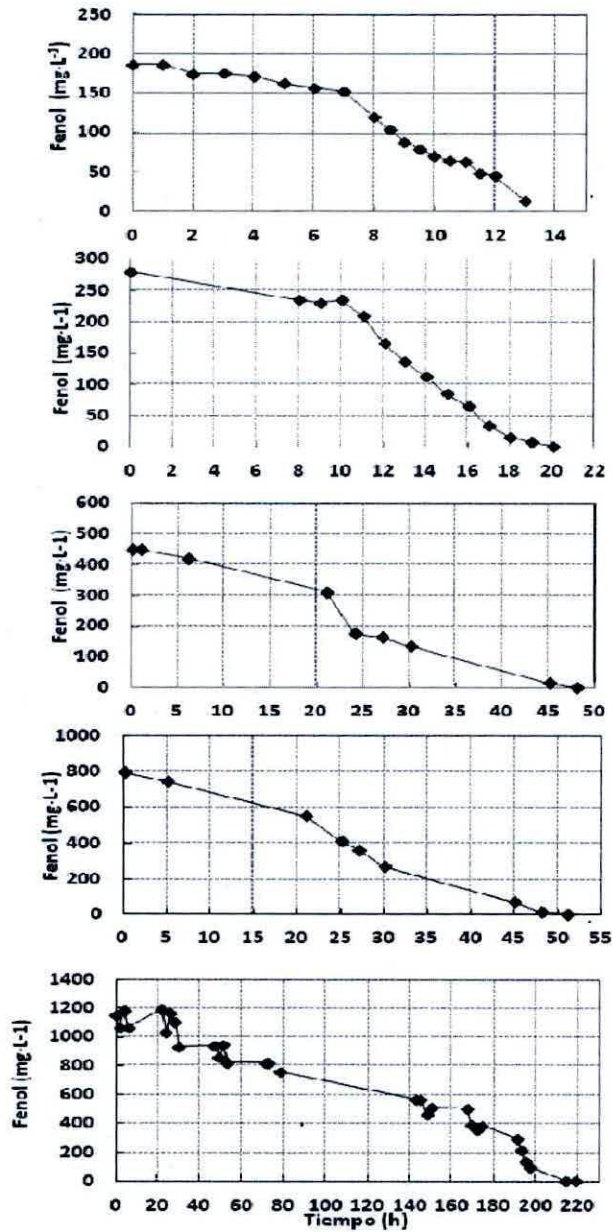


Figura 5.17: Concentración de fenol durante el último ciclo de operación, en ensayo de degradación anaerobia de 120, 240, 500, 800 y 1200 mg·L<sup>-1</sup> de fenol.

### 5.3.2.3 Análisis de los resultados parámetros fisicoquímicos obtenidos a las diferentes concentraciones de fenol aplicadas en reactor

Considerando la operación global del reactor ASBR, teniendo en cuenta los diferentes lotes consecutivos desarrollados a todas las concentraciones aplicadas de fenol, se puede mencionar que existe una cierta adaptación de la biomasa a la degradación de fenol, lo cual genera que éste sea capaz de consumirlo totalmente.

Las diferentes velocidades de degradación de fenol obtenidas a las distintas concentraciones de fenol se presentan en la Tabla 5.8.

**Tabla 5.8:** Velocidades de degradación de fenol a diferentes concentraciones aplicadas en el reactor ASBR.

Concentraciones	120 mg·L <sup>-1</sup>	240 mg·L <sup>-1</sup>	500 mg·L <sup>-1</sup>	800 mg·L <sup>-1</sup>	1200 mg·L <sup>-1</sup>
Velocidad inicial de degradación (mg fenol·SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	10.0	11.0	13.2	15.0	12.8
Capacidad de eliminación (mg fenol·SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	26.4	27.8	18.7	31.1	10.7
Tiempo de reacción (h)	13	20	45	50	215

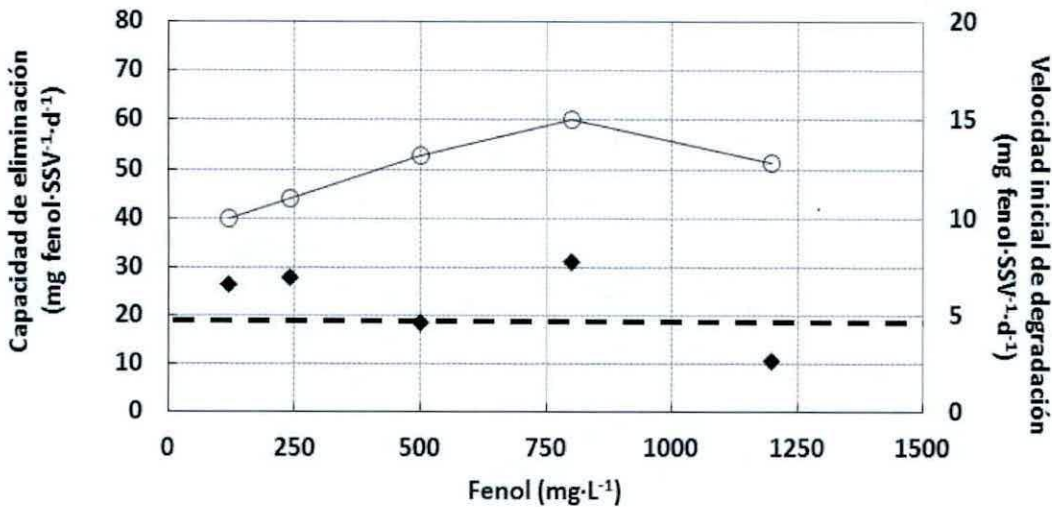
De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 5.8, podemos obtener dos velocidades, una registrada al inicio de la degradación (velocidad inicial) y una promedio, que incluye la el periodo donde se registra una mayor degradación de fenol.

A medida que se va aumentando la concentración de fenol, la velocidad promedio de degradación fue disminuyendo de acuerdo a rangos de concentración, siendo similar entre 120 y 240 mg·L<sup>-1</sup>, luego disminuye en el rango de 500 y 800 mg·L<sup>-1</sup> y ya notándose un efecto más pronunciado a una concentración de 1200 mg·L<sup>-1</sup>, donde probablemente ya está siendo más notorio un efecto de inhibición, producto de la alta concentración aplicada. En esta investigación, se alcanzó esta concentración, para sobrepasar en solo

un 20% una concentración que se ha reportado inhibitoria para los microorganismos (Hernández *et al.*, 2008), y así determinar el comportamiento de este tipo de reactores. Sin embargo, a la última concentración, si bien disminuye la velocidad de degradación, el reactor presenta un buen comportamiento, eliminando más del 90% del fenol alimentado.

Con respecto a la velocidad inicial de degradación de fenol, en un rango de concentración de 120 a 800  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  se puede observar un aumento paulatino a medida que se aumentó la concentración, lo que nos podría indicar que existe una especie de adaptación de la biomasa a la presencia de fenol. Sin embargo, la más alta concentración estudiada, hay una disminución de ésta, quizás debido a las causas antes mencionadas producto de inhibición.

En la Figura 5.18 se presenta una gráfica del efecto de la concentración sobre la velocidad inicial y promedio de degradación de fenol.



**Figura 5.18:** Efecto del aumento de la concentración de fenol en la velocidad inicial y promedio de degradación en un reactor ASBR. Velocidad inicial de degradación (○); velocidad promedio de degradación (■). La línea punteada representa el promedio de las velocidades.

A pesar de que la biomasa presente una adaptación a las diferentes concentraciones estudiadas, se observó una fase lag para todas las concentraciones de fenol, lo que podría explicarse por las siguientes hipótesis: i) Si el fenol no es el sustrato preferencial, la biomasa puede adoptar una estrategia de respuesta al estrés: almacenamiento de fuentes de carbono/energía durante la degradación de fenol de ciclo  $n$  y consumir estas reservas almacenadas durante la fase de latencia del ciclo  $n+1$ ; comenzando la degradación de fenol con mayor velocidad una vez que las reservas almacenadas se agotaran. ii) Si las enzimas responsables de la hidrólisis de fenol son extracelulares, éstas podrían eliminarse del sistema durante la etapa de descarga del reactor entre cada ciclo, lo que implica que tienen que ser sintetizada de nuevo al comienzo de cada ciclo, ocurriendo esto en la fase lag de cada ciclo.

Como se mencionó en la sección de Antecedentes de éste capítulo (Tabla 5.3), la mayoría de las investigaciones de degradación anaerobia de fenol, han sido desarrolladas en reactores continuos de tipo UASB. En este tipo de reactores convencionales, se han registrados periodos de puesta en marcha para el tratamiento de compuestos como fenol que van desde semanas hasta 6 meses, dependiendo de la naturaleza del inóculo y la extensión de la aclimatación que es requerido (Veeresh *et al.*, 2005), que comparado con el tiempo de aclimatación que fue necesario en el reactor de tipo ASBR, considerando los lotes consecutivos (80 días), este último se encuentra en un rango intermedio al reportado por reactores de tipo UASB, a pesar de las diferencias operacionales que se puedan implementar.

Fang y Zhou (2000) estudiaron el efecto de velocidades de carga en el tratamiento de aguas residuales que contenían fenol y p-cresol concentrado en dos reactores UASB mediante la variación de (i) TRH 12 a 2 h en un reactor y (ii) la concentración de fenol en 24 h de TRH en el otro reactor. Se encontró que el 95% de fenol, 65% de p-cresol y 85% de DQO podría ser eliminados de aguas residuales que contienen  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol y  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de p-cresol en 8 a 12 h de TRH. Igualmente, a un TRH constante de 24 h, el segundo reactor fue capaz de eliminar 75-80% de la DQO de las aguas residuales que contiene una concentración constante de p-cresol  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y de fenol en un intervalo de  $1200\text{-}1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , concluyendo que el efecto de la tasa de carga en la eficiencia de eliminación de DQO fue más drástica en un reactor con aumento de

concentraciones de fenol/p-cresol que en un reactor que tenía una concentración constante de fenol/p-cresol. Rincón *et al.*, (2002) demostraron que el TRH óptimo para el tratamiento de aguas residuales de petroquímicas que contenían compuestos fenólicos en un reactor UASB de 4 L de capacidad, fue de 15 h, correspondiente a una velocidad de carga orgánica de  $2 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , donde tanto la eficiencia de eliminación de DQO y porcentaje de metano fueron más de 80%. La eliminación de fenoles totales fue de alrededor de 60%. Para un tiempo de retención de 10 h, se observó una inhibición de los microorganismos metanogénicos.

Estas dos últimas investigaciones reportadas en reactores de tipo UASB, nos muestran que esta tecnología presenta buenos resultados para el tratamiento de compuestos fenólicos. Al igual que en esta investigación, se presentan altos porcentajes de eliminación, cercanos al 90% en el caso de Fang y Zhou (2000), con tiempos de residencia hidráulicos similares al tiempo de duración de la etapa de reacción en el reactor ASBR por ejemplo a una concentración de  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . En el segundo caso, la investigación desarrollada por Rincón *et al.*, (2002), presenta una carga orgánica mucho más alta que nuestra investigación, presentando buenos resultados a un TRH de 15 horas, sin embargo, no podemos ejercer claramente una comparación debido a la presencia de otros compuestos que lógicamente ejercen algún efecto en la degradación de fenol propiamente tal.

Con respecto a tecnologías aerobias de degradación de fenol, González *et al.* (2001) estudiaron el proceso de biodegradación de fenol mediante un cultivo puro de *Pseudomonas putida* ATCC 17484. El trabajo experimental se llevó a cabo en dos sistemas un tanque agitado (CSTB) mediante cultivo suspendido y un reactor de lecho fluidizado (FBB) donde las células se inmovilizaron en perlas de gel de alginato de calcio, con concentraciones iniciales de fenol de  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Valores experimentales indican que ambos bioreactores mostraron alta capacidad de degradación de fenol, superior al 90%. La máxima velocidad de degradación alcanzada fue de  $3200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  para CSTB y  $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  para FBB. Estos resultados están de acuerdo a otros estudios reportados en literatura de sistemas similares en cuanto a la capacidad de eliminación de fenol;  $3120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en un biofiltro (Zilli *et al.*, 1993.),  $355\text{-}4300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en un bioreactor con perlas de alginato (Lakhwala *et al.*, 1992.). Una excepción fue el caso de un

bioreactor de membranas de células inmovilizadas (Loh *et al.*, 2000.) con  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . En los primeros sistemas mencionados, en cuanto a la velocidad de degradación, los resultados obtenidos en el reactor ASBR difieren, ya que son sistemas aerobios y en algunos casos trabajando con cultivos puros en alguno de ellos, con microorganismos del tipo *Pseudomonas* que se ha demostrado ser degradadores de fenol (Fang *et al.*, 2007). Sin embargo en el resto de los sistemas, las velocidades de degradación son comparables e incluso superiores. A pesar de esto, como pudimos corroborar en los ensayos en batch (botellas), presentados en la primera sección de éste capítulo, el tipo de inóculo afectaría el valor absoluto de la velocidad de degradación.

Tecnologías aerobias como reactores de tipo SBR (sequencing batch reactor), también han sido utilizadas para el estudio de degradación de fenol. Chan *et al.*, (2007), evaluó la degradación utilizando dos reactores SBR, en el cual a uno le aplicaron aireación en la etapa de llenado. Las concentraciones de fenol fueron desde  $100$  hasta  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , con un tiempo de duración de ciclos de 12 h. Ellos obtuvieron eliminaciones de fenol cercanas al 99%, reduciendo el tiempo de reacción por efecto de la aireación en la etapa de llenado desde 100 min a 20 min, no aireado y aireado respectivamente, a una concentración de  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Como se puede observar, tiempos de reacción no son comparables a los obtenidos en nuestro estudio, pero cabe destacar que existen una serie de diferencias en el montaje experimental y costos asociados, que nos pueden sugerir una mayor factibilidad de operación con un reactor ASBR (mencionadas también en el Capítulo 2: Antecedentes), sobre todo pensando en tratamiento de este tipo de aguas a mayor escala.

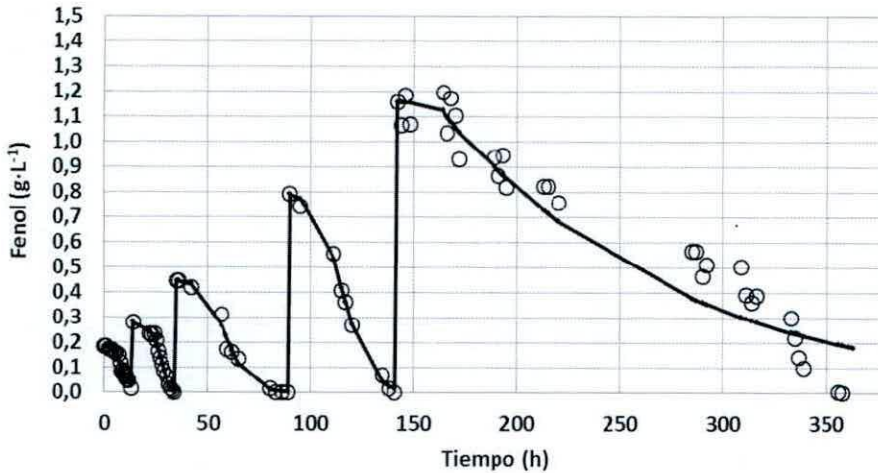
Otros autores han evaluado también la tecnología aerobia SBR (Muftah *et al.*, 2010) donde utilizaron *Pseudomonas putida* inmovilizada en partículas gel polivinil alcohol (PVA), con un volumen de reactor de 1.1 L y flujo de aireación desde  $0.001$ - $0.005 \text{ m}^3\cdot\text{min}$ . Las concentraciones iniciales de fenol aplicadas en este trabajo correspondieron a  $40$ ,  $100$  y  $190 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , obteniendo velocidades de degradación de  $1152$ ,  $2059$  y  $1800 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  respectivamente, a cada concentración. Comparando con las velocidades de degradación obtenidas en nuestra investigación mediante tecnología anaerobia, podemos observar que las velocidades obtenidas por Muftah *et al.* (2010), son mucho mayores a las obtenidas en nuestro reactor. Esto debe ser

fundamentalmente porque se trabajó en un cultivo puro y a concentraciones mucho menores a las aplicadas en el reactor ASBR, donde no hay efecto inhibitorio. Sin embargo Muftah *et al.* (2010) registraron una fuerte disminución de la velocidad de degradación a una concentración de  $190 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , similar a la utilizada en nuestra investigación al inicio del ensayo. Esto nos indica que existe una alta eficiencia a la degradación de fenol, pero a la vez una baja tolerancia del cultivo puro.

Con respecto los rendimientos de eliminación registrados en diferentes tipos de reactores, difieren dependiendo de una serie de factores, como la adaptación de la biomasa, si ésta previamente ha tratado compuestos similares, tasa de recirculación, temperatura de operación, entre otros, por lo que comparar parámetros específicos puede no es muy exacto en la mayoría de los casos. Sin embargo, los resultados que hemos ido analizando con otras investigaciones nos sugieren que la degradación de compuestos de difícil degradación como fenol, en un reactor de tipo ASBR, puede ser una alternativa de tratamiento en un rango desde  $120\text{-}1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , con respecto a reactores anaerobios convencionales o sistemas de tratamiento aerobios, pero teniendo en cuenta una serie de aspectos de tipo operacionales, como por ejemplo, la presencia de algún otro sustrato, tiempos y concentraciones de adaptación de la biomasa.

### 5.3.2 Ajuste de datos a modelo matemático

En la Figura 5.19 se presentan los resultados del ajuste de datos obtenidos de manera experimental al modelo propuesto por Chong *et al.*, (2009), a partir de los datos obtenidos durante el último ciclo de operación de las distintas concentraciones de fenol estudiadas en un reactor ASBR.



**Figura 5.19:** Ajuste de datos de degradación anaerobia de fenol. Simulación (—); datos experimentales (○), a 120, 240 500, 800 y 1200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol.

El modelo requirió asumir parámetros iniciales de concentración la biomasa fundamentalmente encargada de la etapa de hidrólisis y las concentraciones iniciales de fenol a cada condición estudiada. En todos los casos, los mejores resultados fueron obtenidos con valores de  $10 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor que representa adecuadamente las condiciones reales de operación, ya que el reactor se mantuvo a una concentración de biomasa de  $12 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ . Sin embargo la pequeña diferencia puede atribuirse a la distinta actividad específica de las comunidades encargadas de la digestión anaerobia.

En la Tabla 5.9 se muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la simulación. Como se puede observar, la velocidad máxima de degradación de los microorganismos fundamentalmente encargados de la fase limitante de la degradación anaerobia de fenol (hidrolítica), aumentó a las concentraciones más bajas de fenol aplicadas, lo que podría indicarnos una cierta adaptación de los microorganismos. Sin embargo, a las concentraciones intermedias y más altas de fenol, este valor se ve drásticamente disminuido, lo que concuerda no solo con los valores obtenidos a partir de la operación del reactor, sino que también, con los resultados obtenidos a partir de los estudios de la ecología microbiana presente, concordando con la disminución de la diversidad encargada de la degradación, especialmente a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Con respecto a los otros parámetros obtenidos, podemos observar que el modelo predice satisfactoriamente, el alargue de los ciclos de operación a medida que aumenta la concentración de fenol, reflejado en el tiempo de retardo del inicio de la degradación, siendo más precisa a las concentraciones más bajas de fenol, donde se pudo observar en los ensayos experimentales, una pendiente más pronunciada de inicio de degradación.

**Tabla 5.9:** Parámetros cinéticos de la simulación de degradación anaerobia de diferentes concentraciones de fenol

Parámetros	120±60 (mg·L <sup>-1</sup> )	240±4 (mg·L <sup>-1</sup> )	500±50 (mg·L <sup>-1</sup> )	800±7 (mg·L <sup>-1</sup> )	1200±43 (mg·L <sup>-1</sup> )
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0.036	0.130	0.015	0.014	0.009
$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	0.557	0.331	0.200	0.1454	0.614
$\sigma$ (h)	7.775	32.141	56.837	115.280	160.105

Chong *et al.*, (2009) estudiaron la degradación de xenobióticos a partir de lodos activos, por lo que los parámetros cinéticos obtenidos en esa investigación, no son comparables a los obtenidos en éste estudio de degradación anaerobia de fenol, sin embargo, podemos establecer que un ajuste de tipo sigmoideal predice adecuadamente la fase limitante para compuestos de difícil degradación independiente de la vía metabólica por la cual sean degradados, especialmente asociado a un proceso de aclimatación donde toma relevancia la fase lag o inicio de la degradación.

## 5.4 CONCLUSION

Ensayos en batch mostraron principalmente tres aspectos importantes i) el origen de biomasa no tiene gran incidencia en el proceso de adaptación a la degradación anaerobia de fenol, pero si en el valor absoluto de la velocidad máxima de degradación ii) la presencia de co-sustrato fácilmente degradable como glucosa no ejerce un efecto positivo en la degradación anaerobia de fenol y iii) la biomasa anaerobia presenta una cierta adaptación a la presencia de fenol e incremento en la velocidad de degradación y disminución en el tiempo de retardo de inicio de degradación, luego de adiciones consecutivas de éste. Estas observaciones quedan demostradas con que para ambos tipos de inóculo (planta de tratamiento de industria cervecera y tabaco), el tiempo de inicio de degradación fue de 20-25 días después de la primera adición de fenol, y la degradación se completó después de 40-45 días. Después de la segunda adición de fenol, el intervalo de tiempo se redujo a 8-10 días y la degradación se completó en 20-25 días, revelando de esta manera, que la biomasa presentaría algún tipo de adaptación al fenol, al reducirse el tiempo requerido para la degradación total del compuesto. Quedando respaldado con una tercera adición donde el tiempo de inicio y total de degradación fenol correspondió a 3 y 11 días respectivamente. Los resultados fueron similares en presencia de glucosa, lo que es contradictorio a lo planteado en bibliografía. En este estudio consideramos que si efectivamente existiera algún co-factor producto de la degradación de glucosa, que favorezca la degradación de fenol, los tiempos de degradación son tan diferentes (menos de 1 día para glucosa, y no menor de 20 días para el inicio de degradación de fenol) que este efecto positivo puede llegar a ser prácticamente insignificante. Quizás un co-sustrato más lentamente degradable, podría ejercer un efecto positivo más considerable.

Con respecto a los resultados en reactor ASBR, este tipo de reactor presenta un buen comportamiento ante la presencia de un compuesto inhibitorio como fenol. La biomasa presente al igual que los ensayos en botellas presentó una adaptación al fenol, ya que la biomasa fue capaz de degradar completamente una concentración de fenol de  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , aunque la velocidad de degradación tiende a disminuir en este punto. Además es importante destacar que un modelo con una ecuación de tipo sigmoideal, es capaz de reproducir adecuadamente la desaparición de fenol y el tiempo de retardo de inicio de degradación de éste compuesto.

Otro aspecto importante a destacar, es que el aumento de concentración de fenol, presenta una influencia en la velocidad inicial y velocidad promedio de degradación de fenol.

Aspectos fundamentales por los que se pueden haber obtenido buenos resultados en la mayoría de las concentraciones aplicadas (120, 240, 500, 800 y 1200 mg·L<sup>-1</sup>), corresponden primero que todo a las ventajas cinética que presenta esta tecnología anaerobia, la ausencia de co-sustrato que favoreció el consumo de fenol como sustrato principal y el tiempo y concentración aplicada durante la fase de adaptación de la biomasa (120 mg·L<sup>-1</sup> durante 80 días).

## 5.5 REFERENCIAS

- APHA, 1995. *Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Barrios, A; Barrot, E; Marrot, B; Moulin, P; Roche, R. 2006. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. *Journal of Membrane Science* (281), 288-296.
- Busca, G.; Berardinelli, S.; Resini, C.; Arrighi, L. 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. Review. *Journal of Hazardous Materials* 160, 265–288.
- Chan, C.-H., Lim, P.-E., 2007. Evaluation of sequencing batch reactor performance with aerated and unaerated FILL periods in treating phenol-containing wastewater. *Bioresource technology* 98, 1333–8.
- Chang, Y.J., Nishio, N., Nagai, S., 1995. Characteristics of granular methanogenic sludge grown on phenol synthetic medium and methanogenic fermentation of phenolic wastewater in a UASB reactor. *J. Fermentation Bioeng.* 79 (4), 348–353.
- Chong, Nyuk-Min. 2009. Modeling the acclimation of activated sludge to a xenobiotic. *Bioresource Technology* 100, 5750–5756.
- Connor, O.A. O'; Young, L.Y. 1989. Toxicity and anaerobic biodegradability of substituted phenols under methanogenic conditions, *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 853–862.
- Contreras, E; Albertario, M; Berlota, N; Zaritzky, N. 2008. Modelling phenol biodegradation by sluges evaluated through respirometric techniques. *Journal of Hazardous Materials* 158, 366-374.
- Donoso-Bravo, a, Rosenkranz, F., Ruiz-Filippi, G., Chamy, R., 2009. Development and validation of a simplified model for the anaerobic degradation of phenol. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 60, 37–45.
- Donoso-Bravo, A; Rosenkranz, F.; Valdivia V; Ruiz-Filippi, G.; Chamy, R. 2009. Anaerobic sequencing batch reactor as an alternative for the biological treatment of wine distillery effluents. *Water Science & Technology*, 60(5), 1155-1160.
- Duff, S.J.B., Kennedy, K.J., Brady, A.J., 1995. Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water Res.* 29 (2), 645–651.

- Escher, B.I.; Snozzi, M.; Schwarzenbach, R.P. 1996. Uptake, speciation, and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes, *Environ. Sci. Tech.* 30, 3071–3079.
- Fang, H.H.P., Chen, T., Li, Y.Y., Chui, H.K., 1996. Degradation of phenol in wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res.* 30 (6), 1353–1360.
- Fang, H.; Chan, O. 1997. Toxicity of phenol towards anaerobic biogranules. *Water Research*, 31 (9), 2229–2242.
- Fang, H.H.P., Zhou, G.M., 2000. Degradation of phenol and p-cresol in reactors. *Water Sci. Technol.* 42 (5–6), 237–244.
- Fang, H.; Lianga, D.W.; Zhanga, T.; Liu, Y. 2006. Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. *Water Research* 40, 427 – 434.
- Fang, CH; Lee, Chi-Lee. 2007. Enrichment, isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. strain P-6. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59, 206–210.
- Fedorak, P.M. S.E. Hrudehy. 1984, The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis, *Water Reserarch.* 18, 361–367.
- Fezzani, B.; Ridha, B. 2009. Extension of the anaerobic digestion model No. 1 (ADM1) to include phenol compounds biodegradation processes for simulating the anaerobic co-digestion of olive mill wastes at mesophilic temperature. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1430–1438.
- Fuchs, G., Heider, J. 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 82–99.
- González, G., Herrera, M.G., García, M.T., Peña, M.M., 2001. Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized-bed bioreactors. *Bioresource technology* 76, 245–51.
- Guiot, S.R., Tawfiki-Hajji, K., Lepine, F., 2000. Immobilization strategies for bioaugmentation of anaerobic reactors treating phenolic compounds. *Water Sci. Technol.* 42 (5), 245–250.
- Guieysse, B., Wikström, P., Forsman, M., Mattiasson, B., 2001. Biomonitoring of continuous microbial community adaptation towards more efficient phenol-degradation in a fed-batch bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 780–787.

- Hernández, J.E; Edyvean, R.G.J. 2008. Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials* 160, 20–28.
- Jiang, H.; Fang, Y.; Fu, Y.; Guo, Q. 2003. Studies on the extraction of phenol in wastewater. *Journal of Hazardous Materials B10*, 179–190.
- Jordan, W.; Van Barneveld, H.; Gerlich, O.; Kleine-Boymann, M.; Ullrich, J. 2002. Phenol, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag.
- Karlsson, A.; Ejlertsson, J.; Nezirevic, D.; Svensson, B.1999. Degradation of phenol under meso- and thermophilic, anaerobic conditions. *Anaerobe* 5, 25-35.
- C.L. Keith, R.L. bridges, L.R. Fina, K.L. Iverson, J.A. Cloran. 1978. The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. I: Dearomatization of the ring and volatile fatty acids formed on ring rupture, *Arch. Microbiol.* 118, 173–176.
- Kennes, C., Mendez, R., Lema, J.M., 1997. Methanogenic degradation of p-cresol in batch and in continuous UASB reactors. *Water Res.* 31 (7), 1549–1554.
- Khardenavis, A.; Kapley, A.; Purohit, H. 2008. Phenol-mediated improved performance of active biomass for treatment of distillery wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 38–45.
- Knoll, J.; Winter. 1987. Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge benzoate formation from phenol and CO<sub>2</sub> in the presence of hydrogen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 384–391.
- Kobayashi, T.; Hashinaga, E.; Mikami, T.; Suzuki. 1989. Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludge, *Water Sci. Technol.* 21, 55–65.
- Lakhwala, F. S.; Goldberg, B. S.; Sofer, S. S., 1992. Comparative study of gel entrapped and membrane attached microbial reactors for biodegrading phenol. *Bioproc. Eng.*, 8 (1-2), 9-18
- Levén, L., Schnürer, A., 2010. *International Biodeterioration & Biodegradation* Molecular characterisation of two anaerobic phenol-degrading enrichment cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 427–433.
- Levén, L, Nyberg, K., Schnürer, A. 2012. Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste – a review of important microorganisms and impact of temperature. *Journal of Environmental Management* 99-103.

- Lin, S; Juang, R. 2009. Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: A review. *Journal of Environmental Management* 90, 1336–1349.
- Loh, K., Chung, T., and Ang, W. 2000. "Immobilized-Cell Membrane Bioreactor for High-Strength Phenol Wastewater." *J. Environ. Eng.*, 126(1), 75–79.
- Mehrotra, I., Kumar, P., Gali, V., 2003. Treatment of phenolic wastewater using upflow anaerobic sludge blanket reactor. Proceedings of National Conference on Biological Treatment of Wastewater and Waste Air, August 28 and 29, Regional Research Laboratory (CSIR), Trivandrum, India.
- Muftah H. El-Naas, Sulaiman Al-Zuhair , Souzan Makhlof. 2010. Batch degradation of phenol in a spouted bed bioreactor system. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16, 267–272.
- Pradhan, N; Ingle, A.O.2007 Mineralization of phenol by *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *International Biodeterioration and Biodegradation* (60): 103-108.
- Rincon, N., Chacin, E., Marin, J., Moscoso, J., Fernandez, L., Torrijos, M., Moletta, R., Fernandez, N., 2002. Optimum time of hydraulic retention for the anaerobic treatment of light oil production wastewater. *Rev. Tec. Fac. Ing. Univ. Zulia* 25 (2), 90–99.
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L.; 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill International Edition, NewYork.
- Ribarova, I. Topalova, J. Ivanov, I. Kozuharov, D. Dimkov, R. Cheng, C. 2002. Anaerobic sequencing batch reactor as initiating stage in complete pentachlorophenol biodegradation. *Water Science and Technology* 46: 565-569
- Seghezze, L., Zeeman, G., van Lier, J.B., Hamelers, H.V.M., Lettinga, G., 1998. A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technol.* 65, 175–190.
- Soto, M., Mendez, R., Lema, J.M. 1993. Methanogenic and non-methanogenic activity tests: theoretical basis and experimental setup. *Water Research*, 27 (8), 1361–1376.
- Suidan, M.T., Cross, W.H., Fong, M., Calvert, J.W., 1981. Anaerobic carbon filter for degradation of phenols. *J. Environ. Eng., ASCE*, 107 (EE3), 563–579.
- Suidan, M.T., Siekerka, G.L., Kao, S.W., Pfeiffer, J.T., 1983a. Anaerobic filters for the treatment of coal gasification wastewater. *Biotechnol. Bioeng.* XXV, 1581–1596.

- Suidan, M.T., Strubler, C.E., Kao, S.W., Pfeffer, J.T., 1983b. Treatment of coal gasification wastewater with anaerobic filter technology. *J. WPCF* 55 (10), 1263–1270.
- Tay, J.H., He, Y.X., Yan, Y.G., 2000. Anaerobic biogranulation using phenol as the sole carbon source. *Water Environ. Res.* 72, 189–194.
- Tay, J.H., He, Y.X., Yan, Y.G., 2001. Improved anaerobic degradation of phenol with supplemental glucose. *J. Environ. Eng., ASCE*, 127 (1), 38–45.
- Scully, C., Collins, G., O'Flaherty, V., 2006. Anaerobic biological treatment of phenol at 9.5-15 degrees C in an expanded granular sludge bed (EGSB)-based bioreactor. *Water research* 40, 3737–44.
- Saravanan, P; Pakshirajan, K; Saha, P. 2000 Biodegradation of phenol and m-cresol in batch and feed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology* (99):8553-8558.
- Sierra-Alvarez, R., Lettinga, G. 1991. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 544–550.
- Stoilova, I; Krastanov, A; Stanchev, V; Daniel, D; Gerginova, M; Alexieva, Z. 2006. Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1036–1041.
- Suárez, M. 1993. Degradación de los ácidos 3 y 4- hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense. Madrid, España.
- Tay, J.H., He, Y.X., Yan, Y.G., 2001. Improved anaerobic degradation of phenol with supplemental glucose. *J. Environ. Eng.*, 127 (1), 38–45.
- Urra, J.E. 2009. Evaluación del comportamiento estructural y molecular de la biomasa presente en digestores anaerobios de lodos de mezcla completa. Tesis Doctoral, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Veeresh, G.; Kumar, P.; Mehrotra, I. 2005 Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research* 39, 154–170.
- Wang, Y.T., Suidan, M.T, Pfeffer, J.T., Najam, I. 1989. The effect of concentration of phenols on their batch methanogenesis, *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1353–1357.

- Ying, W; Ye, T; Bin, H; Hua-Bing, Z; Bao, C. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp strain PD12. *Journal of Environmental Sciences*, 19,222-225.
- Zilli, M., Converti, A., Lodi, A., Del Borghi, M., & Ferraiolo, G. (1993). Phenol removal from waste gases with a biological filter by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 693–699
- Zhong xiang Fang, Yuhuan Zhang, Yuan Lü, Guangpeng Mab, Jianchu Chen, Donghong Liu, Xingqian Ye. 2009. Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices. *Food Chemistry* 113, 884–888.

**CAPITULO 6: DINÁMICA DE LA ESTRUCTURA DE LAS  
COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EN ENSAYOS DE  
DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE FENOL**

## 6.1 ANTECEDENTES

### 6.1.1 Métodos y Técnicas Moleculares

Unos de los problemas que dificulta el análisis de las comunidades microbianas presentes tanto en muestras de suelo, aguas o ambientales en general, es que no todos los microorganismos son cultivables a nivel de laboratorio (Malik *et al.*, 2008). Sin embargo, modernas técnicas moleculares, ofrecen una importante alternativa para superar este inconveniente, permitiéndonos conocer la gran diversidad microbiana existente.

Estos métodos se basan en la caracterización de los componentes celulares, tales como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos grasos y otros grupos de compuestos específicos (Rosselló-Mora *et al.*, 2001). En los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares al estudio de los recursos naturales y la ingeniería del medio ambiente, han aumentado nuestra comprensión de la diversidad y la interacción de los microorganismos presentes en los entornos complejos (Gilbride *et al.*, 2006).

Los métodos moleculares de RNA 16s, han permitido el rápido desarrollo y entendimiento de la interacción de comunidades microbianas. Numerosos estudios ilustran la utilidad del PCR cuantitativo, para dilucidar la expresión de genes asociados con actividades específicas. Se han realizado estudios en técnicas moleculares como hibridación in situ con fluorescencia (FISH) mediante la incorporación de sustratos es decir, el acoplamiento de fluorescencia de hibridación in situ (FISH) con la asimilación de sustratos radiactivos (fluorescencia en hibridación in situ-microautoradiography-peces-MAR). Se han examinado también tecnologías microscópicas como microscopía de barrido láser confocal (CLSM) (Hofman-Bang *et al.*, 2003).

Una de las técnicas moleculares más ampliamente utilizadas hoy en día para el análisis de muestras de tipo ambiental corresponde a Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), que corresponde a una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo gradiente lineal desnaturante (urea), donde secuencias nucleotídicas con la misma longitud, pero de diferente contenido de GC, son separados a lo largo del gel con diferentes condiciones de desnaturalización (Xiaoqi

*et al.*, 2007). La diversidad microbiana es entonces calculada sobre el número de bases, la intensidad y la posición de las bandas que aparecen en el gel (Seghers *et al.*, 2004). Esta técnica nos permite tener una buena aproximación de la composición microbiana presente.

Las ventajas y desventajas de la técnica de DGGE se presentan en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1:** Ventajas y desventajas de Técnica molecular DGGE (Sanz *et al.*, 2007).

Ventajas	Desventajas
Permite un rápido y simple monitoreo de las poblaciones microbianas.	Dependiendo de la naturaleza de la muestra la extracción y amplificación del DNA puede presentar algunas complicaciones.
Fácil obtención de una visión general de las especies dominantes del ecosistema.	Número de bandas detectadas es pequeño.
Adecuado para un gran número de muestras.	El número de copias de DNA amplificado no depende de la abundancia del microorganismo (método no cuantitativo).

Una de sus aplicaciones más interesante del método de DGGE, es que permite vigilar los cambios dinámicos en las comunidades microbianas, especialmente cuando no se tiene claro cuáles son específicamente las que participan en el proceso y se quiere obtener un conocimiento general de ellas, pudiéndose complementar con análisis posteriores.

Existen diferentes aplicaciones de DGGE relacionados con los procesos de digestión anaerobia, los cuales se presentan en la Tabla 6.2 (a y b).

**Tabla 6.2 (a):** Aplicaciones de DGGE en tratamientos de tipo anaerobio (Sanz *et al.*, 2007)

Aplicaciones	Referencia
Estudio de diferencias entre reactores termofílicos y mesofílicos, demostrando una baja biodiversidad de naturaleza termofílica, usado para el tratamiento de aguas residuales de industria farmacéutica.	Lapara <i>et al.</i> , 2000

**Tabla 6.2 (b):** Aplicaciones de DGGE en tratamientos de tipo anaerobio (Sanz et al., 2007)

Aplicaciones	Referencia
Análisis de cambios observados para diversidad de bacterias en digestores anaerobios para el tratamiento de residuos sólidos urbanos.	Silvey <i>et al.</i> , 2000
Estudio de cambio en comunidades bacterianas en reactor de tanque agitado continuo.(CSTR) en respuesta a la tasa de dilución.	Uneo <i>et al.</i> , 2001
Monitorización de cambios de comunidades bacterianas en la degradación de etilbenceno en condiciones sulfato reductoras.	Nakagawa <i>et al.</i> , 2002
Determinación de cambios en el tiempo para el tratamiento de ácido oleico en reactores EGSB.	Pereira <i>et al.</i> , 2002
Monitoreo de reactores acidogénicos, termofílicos y mesofílicos tratando aguas residuales, complementado con análisis de hibridización.	Lui <i>et al.</i> , 2002
Uso para el monitoreo de cambios de comunidades microbianas en bioreactores productores de hidrógeno durante las diferentes fases del proceso.	Xing <i>et al.</i> , 2005
Monitoreo de poblaciones microbianas en un reactor UASB tratando agua residual de industria de papel, durante 3 años, combinando diferentes técnicas moleculares.	Roest <i>et al.</i> , 2005
Comparación de comunidades microbianas de biofilm y fase líquida en un reactor de membrana.	Park <i>et al.</i> , 2005
Evaluación del comportamiento estructural y molecular de la biomasa presente en digestores anaerobios de lodos de mezcla completa	Urra <i>et al.</i> 2009
Mejora la producción de metano a partir de la digestión anaeróbica de estiércol de cerdo con pescado y desechos de biodiesel como co-sustratos.	Regueiro <i>et al.</i> , 2012
Producción de biohidrogeno en fermentación acidogénica, utilizando reactores en multi-etapas de tanque agitado	Tapia-Venegas <i>et al.</i> , 2013

De acuerdo a la gran variedad de aplicaciones en tratamiento anaerobio de DGGE, es interesante la implementación de esta técnica en reactores de tipo ASBR frente a la presencia de compuestos de difícil degradación, para evaluar los cambios de la

estructura microbiana, ayudando a entender mejor la estabilidad del proceso y su alteración.

### 6.1.2 Microorganismos encargados de la degradación anaerobia de fenol

Como se mencionó en el Capítulo 2 de Antecedentes, el proceso de digestión anaerobia es desarrollado por diferentes grupos de microorganismos como: Bacterias Hidrolíticas fermentativas, Acetogénicas, Archaeas Metanogénicas Acetoclásticas y Metanogénicas Hidrogenotróficas. (Zinder *et al.*, 1984, Talbot *et al.*, 2008). Debido a que la degradación anaerobia depende de un consorcio de microorganismos y en la mayoría de los casos, de factores de crecimiento producidos por algunos de ellos, es que las distintas capacidades de degradación que puede presentar la biomasa al degradar un compuesto con características inhibitorias como fenol, puede estar dada por las diferencias en la diversidad microbiana (Leven *et al.*, 2005, 2007).

Con respecto a la degradación anaerobia de fenol, se han reportado estudios que concluyen que microorganismos presentes en ambientes metanogénicos son encargados de la eliminación, estipulándose que la degradación anaerobia solo es posible llevar a cabo en presencia de microorganismos metanogénicos o sulfato reductores (Knoll *et al.*, 1987).

Se han desarrollado estudios sobre poblaciones microbianas implicadas en la degradación de fenol bajo condiciones metanogénicas a diferentes temperaturas (26 y 55°C) (Fang *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2005). A 26°C, obtuvieron que el fenol se convierte primero en benzoato de metilo posiblemente por *Desulfotomaculum spp.* y *Clostridium spp.*, y luego a acetato y a H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> por *Syntrophus spp.* Estos compuestos intermediarios se convertirían posteriormente en CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> por distintos microorganismos como *Methanosaetaceae*, *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriaceae*.

Chen *et al.* (2008), también estudiaron la composición microbiana de un consorcio degradador de fenol, cultivado en un rango mesofílico (37°C) y termofílico (55°C), cuyos resultados concordaron con los obtenidos por los autores citados anteriormente. Según lo revelado por clonación, hibridación in situ fluorescente

(FISH) y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), estos dos cultivos diferían mucho en cuanto a su estructura microbiana. Los resultados obtenidos sugieren que las bacterias predominantes fueron *Deltaproteobacteria* y *Pelotomaculum spp.* en la familia *Desulfotomaculum*, bajo condiciones mesofílicas y termofílicas, respectivamente. En cuanto a los microorganismos encargados del proceso de la transformación a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, se encontró que estuvieron asociados a miembros mesofílicos y termofílicos de *Methanosaetaceae*, *Methanobacteriaceae* y *Methanomicrobiales*.

Un resumen de las principales poblaciones detectadas en sistemas de degradación anaerobia de fenol, se presentan en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3:** Poblaciones importantes presentes en siete diferentes consorcios metanogénicos en degradación de fenol (Levén *et al.*, 2012).

Poblaciones importantes	Origen	Temperatura (°C)	Sustrato	Referencias
<i>Desulfotomaculum subcluster lh</i>	UASB tratando fenol	26	Fenol	Zhang <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridia</i> ,	UASB tratando fenol	55	Fenol	Fang <i>et al.</i> , 2006
<i>Syntrophorhabdaceae</i>	WWTP	37	Fenol, benzoato, tereftalato	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Desulfotomaculum subcluster lh</i>	WWTP	55	Fenol, benzoato, tereftalato	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Syntrophorhabdaceae</i> <i>Sintrophus</i>	GAC-AFB tratando aguas residuales fenólicas	35	Aguas residuales fenólicas	Chen <i>et al.</i> , 2009
<i>Syntrophorhabdaceae</i>	CSTR mesofilico tratando OMSW	37	Fenol, 4-OHBa, benzoato	Levén y Schnürer, 2010
<i>Desulfotomaculum subcluster lh</i>	CSTR termofilico tratando OMSW	37	Fenol, 4-OHBa,	Levén y Schnürer, 2010

UASB=Upflow anaerobic sludge blanket reactor, WWTP = wastewater treatment plant, CSTR= continuous stirred tank reactor, OMSW=organic municipal solid waste, GAC-AFB=granular activated carbon-anaerobic fluidized bed. 4-OHBa =4-hidroxibenzoato

En diferentes investigaciones se ha detectado la presencia de bacterias específicas que participan en la degradación de fenol. Estas se presentan en la Tabla 6.4.

**Tabla 6.4:** Bacterias degradadoras de fenol, aisladas de ambientes metanogénicos (Levén *et al.*, 2012)

Bacterias	Origen	Temperatura (°C)	Sustrato	Referencias
<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicum</i>	Sedimento de agua dulce	33-34	Fenol, catecol, OHBa,	Zhang <i>et al.</i> , 1994
<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i>	Cultivo mixto de aguas de pantano, aguas residuales, residuos porcinos y suelo	30-37	Fenol, OHBa,	Juteau <i>et al.</i> , 2004
<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i>	Agua residual de planta de tratamiento de manufactura de tereftalato	35-37	Fenol, catecol, OHBa, p-cresol, isoftalato	Qui <i>et al.</i> , 2008

Además de las investigaciones desarrolladas en ambientes anaerobios, se han realizado una serie de estudios de tratamiento con cultivos de microorganismos aerobios que degradan fenol. Una de las principales comunidades microbianas que se ha reportado como degradadora de residuos fenólicos, corresponde a especies de *Pseudomonas spp.* (Whiteley *et al.*, 2001).

Fang *et al.* (2007), aislaron cepas puras de microorganismos degradadores de fenol, utilizando un cultivo con una mezcla enriquecida. El medio contenía componentes inorgánicos y compuestos procedentes de suelos contaminados con pentaclorofenol de Taiwan. Se añadieron 50-600 mg·L<sup>-1</sup> de fenol, como única fuente de carbono y energía. De este estudio, se lograron aislar dos cepas del cultivo mixto aclimatado, analizándolas por DGGE. Ellos fueron identificados como *Pseudomonas resinovorans* y *Brevibacillus sp.* La cepa *P. resinovorans* apareció al principio, y durante el periodo de enriquecimiento. La segunda cepa, *Brevibacillus sp.*, no apareció en la etapa inicial, pero apareció después de 2 semanas de enriquecimiento. Las temperaturas óptimas para el crecimiento *P. resinovorans.* y *Brevibacillus sp.* fueron 31 y 39°C,

respectivamente. *P. resinovorans* podría degradar completamente el fenol dentro de 57.5 h, cuando la concentración inicial de fenol fue inferior a  $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cuando la concentración de fenol inicial era inferior a  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , *Brevibacillus sp.* pudo eliminar por completo el fenol en 93.1 h. La capacidad de degradación de fenol *P. resinovorans* era mucho mejor que la de *Brevibacillus sp.* La vía metabólica de la degradación de fenol por *P. resinovorans* fue meta-clavage, asignado a la actividad de la enzima catecol 2.3-dioxigenasa.

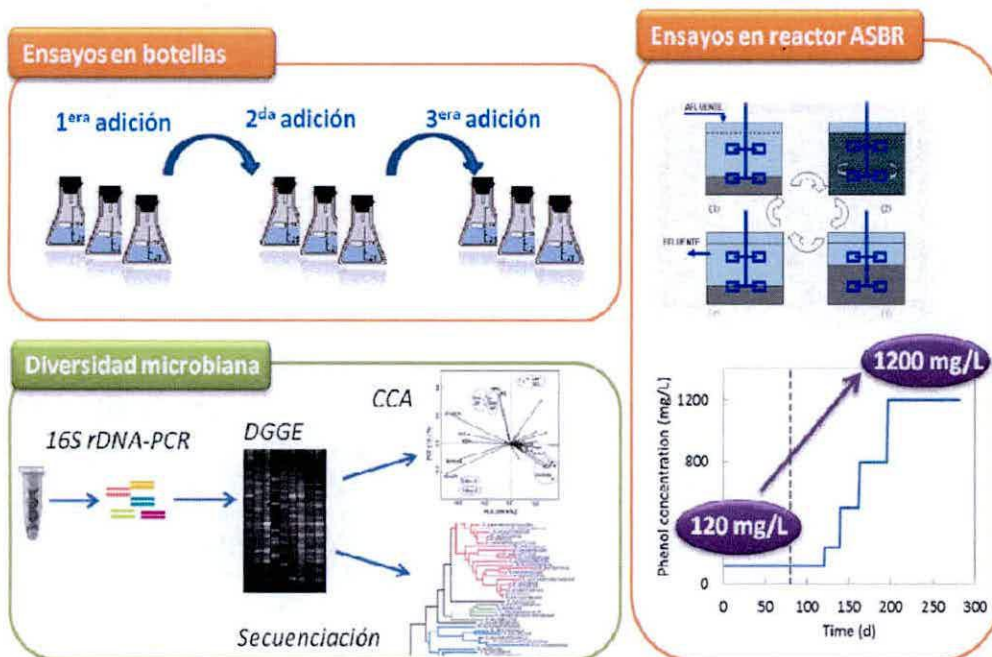
De acuerdo a lo mencionado anteriormente, es interesante además de determinar los microorganismos presentes en el sistema de degradación, poder establecer la relación de la estructura microbiana con los resultados físico-químicos que reflejan el comportamiento del digestor. Es por esto, que en la presente investigación se evaluó la relación entre la capacidad de degradación de fenol con el cambio de la estructura microbiana en un reactor ASBR al incrementar la concentración de fenol desde  $120$  a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## 6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.1 Procedimiento y montaje Experimental

El procedimiento y montaje experimental a partir de los cuales se desarrolló el análisis de evolución de las comunidades microbianas de ensayos en batch y reactor, son los mismos que fueron descritos en el Capítulo 5 en la degradación anaerobia de fenol.

La forma en que se obtuvo la relación de los parámetros ambientales obtenidos a partir de los ensayos en botellas y reactor, con la estructura de la ecología microbiana presente, se muestra en la Figura 6.1.



**Figura 6.1:** Esquema general de ensayos de relación de parámetros ambientales de degradación anaerobia de fenol, obtenidos de ensayos en botellas y reactor ASBR.

## 6.2.2 Metodología análisis molecular

### Caracterización de la presencia de comunidades microbianas encargadas de la degradación de fenol

Para la caracterización de las comunidades, en los ensayos en botellas, las muestras fueron tomadas por duplicado al final de cada ensayo. En el caso del reactor, las muestras fueron tomadas durante el último ciclo de operación a cada concentración de fenol estudiada.

Las muestras de biomasa fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10.000 rpm. El ADN genómico total fue extraído desde 450 mg de biomasa sedimentada usando un kit de extracción Powersoil, MO BIO Laboratories Inc (Carlsbad, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ADN extraído fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se cuantificó por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro BioSpec-nano, Shimadzu (Kyoto, Japón).

La región hipervariable V3 de ADNr 16S bacteriano fue amplificado por PCR usando primers w49F y w104R (Delbes *et al.*, 2000). Un clamp 40-pb GC fue añadido en el extremo 5' terminal del primer reverso (Muyzer *et al.*, 1993). La amplificación por PCR se llevó a cabo en 50 µL con 1 U Platinum de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA, EE.UU.), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada primer, 0.5 mM de dNTP y 100 ng de ADN molde, en un termociclador MJ Mini (Bio Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EE.UU.) a través de una desnaturalización a una temperatura inicial de 94°C, durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 segundos), hibridación a 57°C (40 segundos) y elongación a 72°C (40 segundos), y una elongación final a 72°C durante 2 minutos. La verificación del tamaño correcto y no contaminación de los productos de PCR fue realizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los productos de PCR se cuantificaron por fluorescencia a 535 nm utilizando Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Los productos de PCR (500 ng) se separaron por electroforesis en gel gradiente denaturante (DGGE), en un gel de poliacrilamida al 10% con un gradiente lineal desde 25% a un 65%, de acuerdo con el protocolo de Muyzer *et al.*, (1993). Las

soluciones desnaturizantes se prepararon sobre la base de 100%- denaturante que contenían 7 M de urea y 40% de formamida. La migración se llevó a cabo durante 16 horas a 120 V y 60°C, en tampón TAE 1X, utilizando el sistema de DCode (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EE.UU.). Los geles de DGGE fueron teñidos con 1X SYBR Green I (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se fotografió usando el sistema Gel Doc-Print Documentación (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Francia).

Las bandas de interés que fueron obtenidas mediante DGGE, se cortaron de los geles con una hoja de afeitar estéril, dispuestas en 40 µl de agua ultrapura, y fueron mantenidas durante 8 horas a 4°C para la difusión pasiva de ADN. El ADN fue purificado con Invitek MSB Spin PCRapace kit (Stratec Molecular GmbH, Berlín, Alemania), y amplificado por PCR, de acuerdo al mismo procedimiento descrito previamente. Se realizó una nueva DGGE para verificar el perfil de una sola banda de cada producto de PCR, cara a cara con el perfil original. El procedimiento de escisión se repitió hasta obtener un perfil de banda única, que finalmente se escindió del gel y se amplificó por PCR como se realizó previamente, excepto que no se utilizó un primer forward GC-clamp. Posteriormente los productos de PCR fueron enviados a la secuenciación (Macrogen Inc, Seúl, Corea) en aABI 3730XL sequencer CON ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing kit y amplificados con Taq ADN polimerasa (Applied Biosystems).

Se utilizó el software NCBI BLASTn para identificar los parientes filogenéticos con la base de datos GenBank.

### **Análisis estadísticos**

La fotografía del gel fue analizada con el software GelCompar II (Matemáticas Aplicadas, Sint-Martens-Latem, Bélgica), para obtener la matriz de bandas de intensidades relativas acorde a la posición de la banda. La similitud de pares-bases entre los perfiles de las comunidades, se calculó por el coeficiente de Bray-Curtis (Legendre and Legendre, 1998) y las muestras se agruparon jerárquicamente en un dendograma UPGMA sobre la base de su similitud Bray Curtis.

Las posibles correlaciones entre la estructura de la comunidad bacteriana (basado en la matriz de intensidad de la banda) y diversas variables ambientales (después de la normalización) fueron determinadas por análisis de correspondencia canónica (CCA), asumiendo una distribución unimodal de las especies (terBraak, 1986).

El análisis de correspondencia canónica (CCA) restringe la ordenación de una matriz por medio de regresiones lineales múltiples con variables en una segunda matriz; en este sentido este análisis combina los conceptos de orden y regresión. Se usa CCA para relacionar por ejemplo una matriz de distribución de especies por sitios y las características ambientales de esos sitios, tal como se desarrolló en esta investigación.

CCA se calculó con XLSTAT (Addin soft) y la relación de significación fue probada por test de permutación (500 permutaciones). Por otra parte, una representación de burbuja se superpuso a la trama CCA, mediante la asignación de un símbolo cuyo tamaño era proporcional a la concentración de fenol de entrada, indicándose la fecha de muestreo correspondiente. En el CCA biespacial, las variables ambientales fueron representadas como flechas cuya dirección y longitud indican (i) la dirección en la que la variable explica la mayor parte de los patrones bacterianos y (ii) la magnitud de la contribución de que la variable ambiental explica la variación de los perfiles bacterianos.

Para el análisis de datos obtenidos de las bandas de DGGE se utilizó la herramienta estadística de Análisis de Componentes Principales (PCA). El objetivo de ésta es expresar la covariación entre las variables en el menor número de variables sintéticas (componentes). Las covariaciones más fuertes emergen de los primeros ejes y por esto se llaman componentes principales.

PCA es una buena técnica para usar cuando hay una relación aproximadamente lineal entre las variables. En algunos casos se pueden hacer transformaciones para mejorar esta linealidad.

## 6.3 RESULTADOS

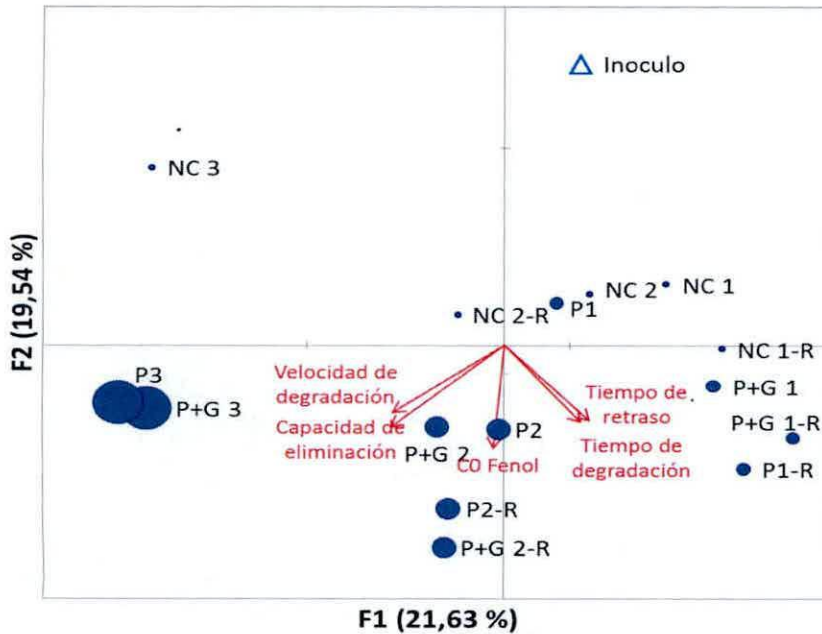
Además de evaluar los parámetros físico-químicos producto del comportamiento operacional en el caso del reactor ASBR, como parte del estudio de la degradación anaerobia de fenol (descritos en el Capítulo 5), se evaluó el cambio de la estructura de las comunidades microbianas producto del efecto causado por la presencia de este compuesto.

El análisis de la comunidad bacteriana por DGGE está limitado por el parcialidad cuantitativa inherente de los diferentes pasos de la metodología (Extracción de ADN no exhaustiva, amplificación preferencial en la PCR, DGGE con un límite de detección y saturación que afecta la detección de especies minoritarias, múltiples secuencias de operón que resulta en múltiples bandas para una sola especie y la co-migración resultando en una banda única para varias especies diferentes) (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer y Smalla, 1998). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, la metodología molecular DGGE es una buena herramienta para cumplir con el presente objetivo, que es comparar las estructuras de la comunidad entre un número relativamente grande de muestras, basado en la detección de las principales poblaciones (Loisel *et al.*, 2006).

### 6.3.1 Ensayos en Botellas

#### ***Relación entre la estructura de las comunidades bacterianas y el proceso funcional***

En los ensayos desarrollados en botellas, en términos de comportamiento funcional, como se observó mediante los parámetros físico-químicos medidos (Capítulo 5), la biomasa presentó una adaptación a las sucesivas adiciones de fenol, incluso aplicando diferentes tipos de biomasa (planta de tratamiento de industria cervecera y tabaco). La estructura total revelada por DGGE, fue fuertemente correlacionada con el número de adiciones de fenol y la velocidad de degradación, como se representa en bubble-PCA o análisis de componentes principales en la Figura 6.2.



**Figura 6.2:** Análisis de Componentes Principales (PCA) de perfiles de DGGE de ensayos en batch (botellas). El tamaño del símbolo es proporcional a la velocidad de degradación de fenol. El sustrato es indicado por P (solo Fenol) o P+G (Fenol+Glucosa). 1-2-3: número de adiciones de fenol. R: replica de ensayos; NC: control negativo.

Después de la primera adición, la composición de la comunidad difiere fuertemente del inóculo y en menor medida de los controles negativos, revelando una adaptación a corto plazo a fenol. La diferenciación de la comunidad fue mucho más pronunciada después de las segundas y terceras adiciones de fenol, con un fuerte aumento de algunas bandas específicas, revelando una adaptación a largo plazo a través de mecanismos de selección. La disminución global de la diversidad sugirió una especialización de la comunidad después de sucesivas adiciones de fenol, dando lugar a un mejoramiento del rendimiento de degradación.

El número de adiciones de fenol fue la principal fuerza impulsora de la estructura de la comunidad, mientras que la presencia de glucosa como co-sustrato no indujo una diferenciación significativa de composición de la comunidad microbiana, en cualquiera de los 3 ciclos considerados. Esto fue consistente con el hecho de que, en

el nivel de función, la tasa de degradación del fenol se mantuvo sin cambios cuando se adicionó glucosa como co-sustrato, desechando cualquier efecto potencial de co-digestión.

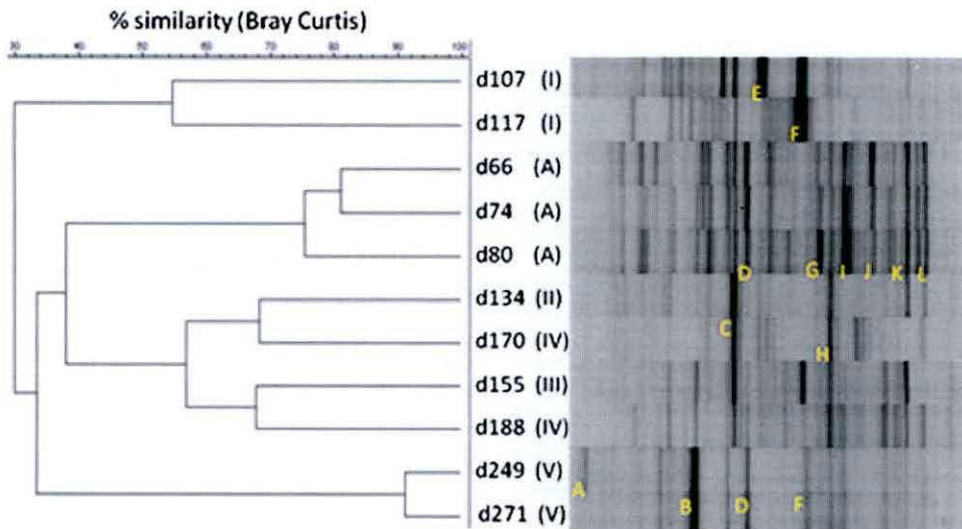
### 6.3.2 Ensayos en reactor ASBR

#### *Estructura de las comunidades bacterianas*

En cuanto al estudio de las comunidades microbianas durante la degradación anaerobia de fenol, la estructura de las comunidades reveladas por DGGE fue dinámica y agrupada de acuerdo al tiempo y la concentración de alimentación de fenol (Figuras 6.3 y 6.4). Las tres muestras correspondientes a la fase de aclimatación (días < 80) se encontraron agrupadas y fuertemente separadas de los otros grupos. La fase de aclimatación fue el período de mayor dinamismo y mayor diversidad bacteriana, en términos de número de la banda DGGE (Figura 6.3). Esta segregación demuestra que la aclimatación al fenol fue un proceso estructural (no sólo fisiológica), impulsado por los cambios profundos de la diversidad y composición de la comunidad. Entre el periodo de aclimatación y el período de prueba, el número de banda DGGE disminuyó de  $31 \pm 3$  a  $25 \pm 3$  (equivalente al índice de Shannon de  $3,1 \pm 0,1$  a  $2,6 \pm 0,2$ ), debido a la desaparición de las especies más sensibles. Posteriormente, durante la fase de prueba, la diversidad mantuvo bastante constante ( $25 \pm 3$  bandas DGGE, equivalentes a índice de Shannon  $2,6 \pm 0,2$ ). Sin embargo, la estructura de la comunidad era variable.

Durante la fase de prueba, se pudieron diferenciar tres grupos a partir de la representación obtenida del dendograma, de acuerdo a la concentración de alimentación: las muestras correspondientes a la concentración más baja de fenol ( $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , período I), a las concentraciones intermedias de fenol ( $240$  a  $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , períodos de II a IV), y la más alta concentración de fenol ( $1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , el período de V) (Figura 6.4). El aumento de la concentración de fenol se acompaña de una disminución de la diversidad bacteriana, lo que sugiere la especialización de la comunidad a través de la aparición y la selección de los filotipos más adaptados (por ejemplo, la banda A), lo que puede probablemente jugar un papel importante en el mantenimiento de la alta capacidad de degradación.

En la representación CCA (Figura 6.4), las muestras correspondientes a las concentraciones bajas e intermedias de fenol (120 a 800 mg·L<sup>-1</sup>, período de I a IV) se encontraron agrupados estrechamente, y sólo las muestras que corresponden a la concentración más alta de fenol (1200 mg·L<sup>-1</sup>, periodo V) se encontraron fuertemente separadas. La influencia de la concentración de fenol en la estructura de la comunidad microbiana fue dependiente de: el aumento de la concentración de fenol, el cual no tuvo efectos significativos sobre la estructura de la comunidad microbiana cuando se aumentó desde 120-800 mg·L<sup>-1</sup>. Sin embargo, se observaron cambios estructurales drásticos cuando se aumentó desde 800-1200 mg·L<sup>-1</sup>. El umbral de perturbación estructural fue similar al umbral funcional observado para los parámetros funcionales (tiempo de degradación, capacidad de eliminación y velocidad de degradación inicial) (Capítulo 5), lo que sugiere que la desestabilización del comportamiento de degradación entre 800 y 1200 mg·L<sup>-1</sup> se relacionó a una desestabilización de la estructura de la comunidad.

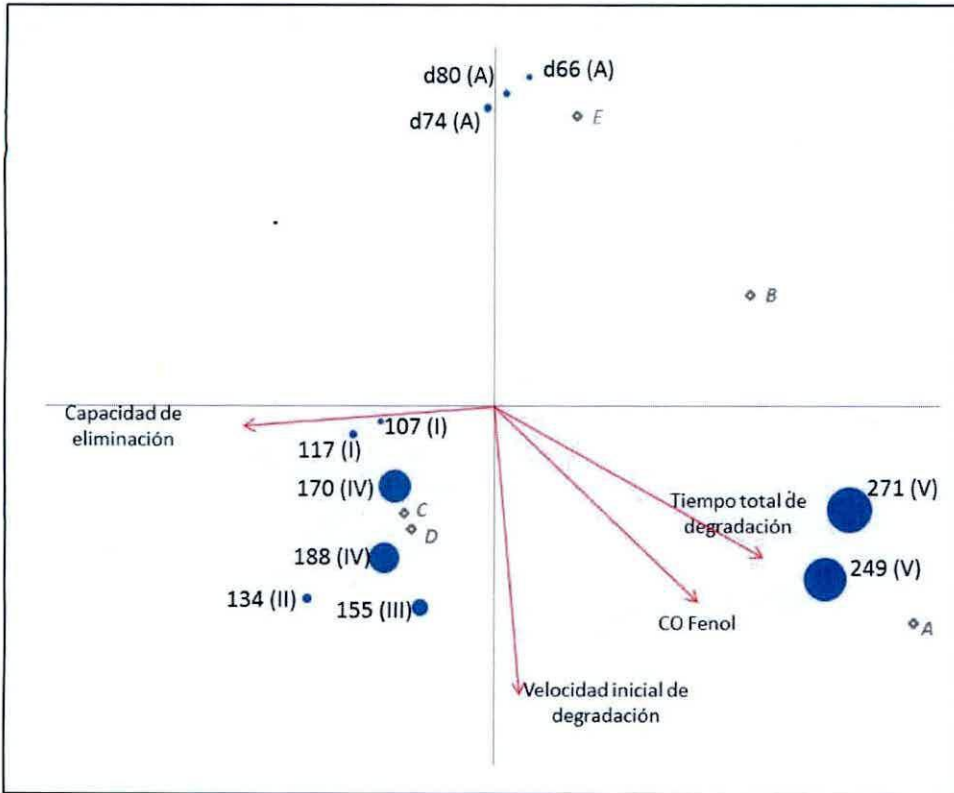


**Figura 6.3:** Dendrograma UPGMA de los perfiles de DGGE de las muestras del reactor ASBR basado en el análisis de similaridad Bray Curtis. El número indica la concentración de entrada de fenol (medida) al comienzo de cada ciclo de operación.

**Relación entre la estructura de las comunidades bacterianas y el proceso funcional**

El conjunto de variables ambientales (VA) probadas para el análisis CCA fueron: la concentración de fenol alimentada, el tiempo total de la degradación, la velocidad inicial de degradación, y la capacidad de eliminación. El test de permutación CCA mostró una significativa relación lineal entre los datos de abundancia (estructura de la comunidad) y las variables ambientales (p-valor de 0,014). Una de las relaciones más importantes, fue la desarrollada por la estructura de la comunidad a 1200 mg de fenol·L<sup>-1</sup> correlacionándose positivamente con el tiempo de degradación (más largo) y negativamente con la capacidad de eliminación. Por el contrario, las estructuras de las comunidades que se desarrollaron entre 120 y 800 mg de fenol·L<sup>-1</sup> se correlacionaron equitativamente tanto a la capacidad de eliminación y la velocidad de degradación inicial.

La influencia de las condiciones ambientales, principalmente la concentración de contaminantes, con la estructura de la comunidad bacteriana se encuentra bien establecida en varios ecosistemas. Estudios anteriores han demostrado que las adiciones repetidas de fenol tienen efectos sobre la estructura de la comunidad (Guieysse *et al.*, 2001). Ante la presencia de concentraciones crecientes de otros compuestos aromáticos con características inhibitorias, se ha registrado una sucesión microbiana y una especialización de la población (Trably *et al.*, 2008). Sin embargo, la inversa (es decir, a medida que las características de la comunidad impulsan la función macroscópica) sigue siendo un tema crítico para los ecologistas (Cabrol y Malhautier, 2011). Aquí, mostramos una clara evidencia de que el rendimiento de degradación a una alta o baja concentración de fenol (en términos de velocidad de degradación y capacidad de eliminación) fue esencialmente impulsado por características específicas de la estructura de la comunidad (diversidad, la composición de las especies y abundancias relativas).



**Figure 6.4:** Análisis de correspondencia canónica (CCA) de las comunidades microbianas generada por análisis 16S-DGGE a partir de 11 muestras de comunidades presentes en un ASBR (círculos). El tamaño de los círculos es proporcional a la concentración de fenol en el reactor. Los números indican el día de operación en que fue tomada la muestra, y el periodo de prueba se indica en paréntesis (como en la Figura 6.3). El eje primario y secundario representan el 40.9% y el 37.6% del total de la varianza. Las variables ambientales seleccionadas (flechas) explican el 59% de la inercia de los datos de DGGE establecidos. Entre todas las variables individuales (bandas DGGE), están representados sólo las cortadas y secuenciadas (símbolos de diamantes y la letras (como en la Figura 6.3)).

**Composición de especies bacterianas**

Las bandas seleccionadas fueron cortadas y re-amplificadas a partir de los geles de DGGE, obteniendo de esta manera patrones de bandas puras después de una segunda corrida de DGGE.

La búsqueda BLAST reveló que las bandas secuenciadas, estaban estrechamente relacionados (> 97% de similitud de secuencia) a familias y/o géneros conocidos (Tabla 6.5 a y b). En la mayoría de los casos, las mejores secuencias de acuerdo al programa BLAST fueron obtenidas de los procesos de digestión anaerobia, muchos de ellos relacionados con la degradación de hidrocarburos.

**Tabla 6.5 (a):** Afiliación BLAST de las secuencias de las cinco bandas dominantes extirpados de los perfiles de DGGE, como se indica en la Figura 6.3.

DGGE Banda	Closest BLAST match (número de acceso)	Similaridad%	Fuente de Identificación
A	<i>Pseudomonas koreensis</i> cepa wrf6 (JQ713596)	100	Rizosfera azafrán
B	<i>Uncultured Anaerolineaceae bacterium</i> clone (JN806351)	99	Comunidad microbiana anaerobia degradadora de tolueno.
C	<i>Uncultured Chlproflexi</i> clone (CU919393)	100	Digestor anaerobio para el tratamiento de aguas residuales domésticas
	<i>Uncultured bacterium</i> clone (FQ659799)	97	Comunidad bacteriana degradadora de PAH.
D	<i>Spirochaetaceae</i> bacterium clone (HQ689210)	97	Consorcio metanogénico desde un suelo contaminado con petróleo crudo
E	<i>Brevundimonas sp.</i> strain SMXB12 (HF571531)	100	Lodo activado capaz de biodegradación aeróbica bencénico-antibiótico

**Tabla 6.5 (b):** Afiliación BLAST de las secuencias de las cinco bandas dominantes extirpados de los perfiles de DGGE correspondientes a la más alta concentración de fenol (período V), como se indica en la Figura 6.3.

F	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. clone (JQ087143)	100	Acuíferos contaminados con hidrocarburos.
G	Uncultured <i>Thauera</i> sp. clone (FJ439103)	99	Lodo activo de un bioreactor tratando aguas residuales de una refinería petroquímica alimentado con alta carga fenólica
H	Uncultured bacterium clone (FR823667)	100	Reactor anaerobio metanogénico para el tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera.
I	Uncultured <i>Syntrophaceae</i> bacterium clone (JN806341)	100	Comunidad microbiana anaerobia degradadora de tolueno.
J	Uncultured Bacteroidetes bacterium isolate DGGE	99	Biorremediación anaeróbica de las aguas subterráneas contaminado con gasolina.
K	Uncultured Synergistetes bact clone (JX301643)	100	Reactor UASB para el tratamiento de aguas residuales domésticas.
	Uncultured bacterium clone (FJ164085)	100	Consorcio metanogénico degradador de tolueno a bajas temperaturas.
L	Uncultured Syntrophobacteraceae bacterium clone (JN809532)	99	Filtros anaeróbicos de flujo ascendente tratamiento de residuos de los mataderos.

La banda A fue una de las bandas que presentó menor intensidad en los perfiles de DGGE correspondientes a la más alta concentración de fenol (249-271 días, período V), y no fue detectada en los otros perfiles correspondientes a concentraciones más bajas de fenol. Esta banda, presentó un 100% de similitud de secuencia con una

cepa *Pseudomonas koreensis* wrf6 (JQ713596) identificados en una comunidad microbiana presentes en el aislamiento de rizobacterias y selección de las promotoras del crecimiento vegetal de *Crocus sativus* (azafrán) durante su período de floración. *Pseudomonas sp.* en la rizosfera y *Bacillus sp* y *Brevibacterium*, correspondieron a los géneros predominantes en la mayor parte del suelo, respectivamente (Ambardar *et al.*, 2012).

La banda B fue la banda más intensa en los perfiles de DGGE correspondientes a la más alta concentración de fenol (249-271 días, período V), sin embargo, apenas fue detectada en los otros perfiles correspondientes a concentraciones más bajas de fenol. Esta banda, presentó un 99% de similitud de secuencia con un no cultivo de bacteria *Anaerolineaceae* (dentro del *phylum Chloroflexi*) identificados en una comunidad microbiana que degrada tolueno anaeróbicamente, pero no siendo responsable de la degradación de tolueno (Sun y Cupples, 2012). Los miembros de la clase *Anaerolineae* son anaerobios obligados, que se encuentran ampliamente distribuidos en diversos tipos de ecosistemas anaeróbicos naturales y artificiales. Algunas cepas cultivables pudieron ser aislados de digestores anaerobios y desde un suelo de cáscara de arroz, pero al utilizar fenol como único sustrato (1 mM) el crecimiento de estas cepas no fue favorecido (Yamada *et al.*, 2007). Los miembros de la familia *Anaerolineaceae* fueron significativamente enriquecidos en microcosmos modificados de petróleo y participan en la degradación del petróleo bajo condiciones sulfato reductoras (Sherry y col., 2013). En suelos contaminados con diesel, la presencia de contaminación se correlacionó con un aumento de la abundancia relativa de *Chloroflexi* y la detección *Anaerolineae*, siendo conocidos por estar asociados con la degradación anaerobia de compuestos relacionados con petróleo (Sutton *et al.*, 2013).

La banda C, de acuerdo al perfil de DGGE, se encontró presente en la mayoría de los periodos de operación a concentraciones bajas e intermedias de fenol (I-IV). La secuenciación de esta banda arrojó que esta comunidad de bacterias presenta un 100% de similitud con un cultivo no identificado de *Cloriflexi* presente en un *digestor* anaerobio para el tratamiento de aguas residuales domésticas y un 97% de similitud con un no cultivo de *Betaproteobacteria* proveniente de un suelo contaminado por PAH expuesto a fenantreno (Martin *et al.*, 2010).

La banda E, solo se encontró presente en el periodo en el cual el reactor ASBR operó a la más baja concentración ( $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), desapareciendo al aplicar concentraciones más altas de fenol. Esta secuencia presentó un 100% de similitud con una cepa de *Brevundimonas sp.*, presente en un lodo activado capaz de degradar antibiótico Sulfametoxazol en condiciones aeróbicas. Este antibiótico presenta ciclos fenólicos (Herzog *et al.*, 2013).

Bandas D y F también estuvieron presentes en los perfiles de DGGE durante el periodo V de operación del reactor, aunque eran más intensas en los perfiles de DGGE correspondiente al período de aclimatación y al periodo I. La banda D mostró 97% de similitud de secuencia con un clon *Spirochaetaceae* (dentro del *phylum Spirochaetes*) identificados a partir de las primeras etapas de cultivo de enriquecimiento de tierra contaminada con petróleo (Cheng *et al.*, 2013). Además, la banda B también muestra 97% de similitud con diversos clones de bacterias, que a pesar de que no están estrechamente relacionados con las especies conocidas, se identificaron a partir de un reactor de lecho fluidizado de tratamiento anaerobio de 2,4,6-tricloro-fenol y fenol (número de acceso DQ306716), y a partir de un cultivo enriquecido de microorganismos metanogénicos degradadores de fenol (número de acceso GQ377468, Leven *et al.*, 2010.), sin embargo, este clon no se considera que es el principal responsable de la degradación de fenol en el último cultivo enriquecido.

La banda F mostró un 100% de similitud de secuencia con un cultivo de clones de *Clostridium sp.* (en el *phylum Firmicutes*) identificados a partir de un acuífero contaminado con un hidrocarburo de petróleo (Tabla 6.5). Banda C también tuvo 99% de similitud de secuencia con un clon *Clostridium* identificados entre los miembros más frecuentes de la comunidad presente en los sedimentos de una cuenca de infiltración (número de acceso JQ177694, Rotaru *et al.*, 2012). *Clostridiales* son organismos fermentativos de los cuales se piensa que utilizan intermediarios de hidrocarburos para generar precursores de ácidos orgánicos (por ejemplo, acetato, formiato) (Sherry y col., 2013). Se identificaron los miembros Clostridia (Stable Isotope Probing), como los supuestos degradadores de tolueno en microcosmos de sulfato-modificados de suelos agrícolas (Sol y Cupples, 2012). *Clostridiaceae* también se ha identificado entre la más abundante OTU enriquecido a partir de un consorcio metanogénicos utilizadores de aceite (Gieg *et al.*, 2008), y como uno de los

microorganismos más eficientes en la oxidación primaria anaeróbica de benceno en un cultivo de enriquecimiento de hierro-reducción (Kunapuli *et al.*, 2007).

La banda G, fue más intensa durante el periodo de aclimatación a fenol, desapareciendo a las concentraciones más altas. La secuencia presenta un 99% de similitud con un cultivo bacteriano de *Thauera sp. clone* (FJ439103), proveniente de bioreactor tratando aguas residuales de una refinería petroquímica alimentado con alta carga fenólica. *Thauera spp.*, ha sido reportada por otros autores, como especies encargadas de la degradación de tolueno bajo condiciones de el nitrato reducción (Sun y Cupples, 2012).

Bandas H e I fueron de baja intensidad en las bandas presentes en los perfiles correspondientes al período V. La banda D mostró un 100% de similitud de secuencia con clones de bacterias no clasificadas, identificados a partir de los diversos procesos de digestión anaerobia de tratamiento de lodos municipales (número de acceso CU918284, Riviere *et al.*, 2009) o los residuos de procesamiento de alimentos (número de acceso GU389559, Nelson *et al.*, 2012), entre otros. La banda I mostró un 100% de similitud de secuencia con un clon bacteriano de *Syntrophaceae* (dentro de la clase *Deltaproteobacteria*) identificados a partir de una comunidad microbiana que degrada tolueno anaeróticamente, pero no siendo responsable de la degradación de tolueno (Sun y Cupples, 2012). La banda I también tuvo un 99% de similitud de secuencia con un clon de *Deltaproteobacteria* que era probablemente responsable de la degradación microbiana de 4-metilbenzoato de metilo en un consorcio metanogénico (número de acceso AF254389, Wu *et al.*, 2001). Además, la banda E que se muestra 99% de similitud con diversos clones de bacteria que, a pesar de que no están estrechamente relacionados con las especies conocidas, se identificó a partir de un medio anaerobio con dietil ftalato y un reactor UASB con microorganismos degradadores de benzoato (número de acceso EF053105) y un consorcio de fenol-degradantes de un reactor anaeróbico tratamiento de aguas residuales industriales (número de acceso EF590284) (Liang *et al.*, 2007).

Las bandas J, K, L se encontraron presentes con mayor intensidad en la etapa de aclimatación y a concentraciones intermedias de fenol. La banda J presentó un 99% de similitud con una comunidad de *Bacteroidetes*, aislada de biorremediación

anaeróbica de las aguas subterráneas contaminado con gasolina (Souza *et al.*, 2009). La banda K presentó un 100% de similitud con una comunidad de bacterias *Synergistetes* proveniente de un reactor UASB para el tratamiento de aguas residuales domésticas y un cultivo de bacterias proveniente de un consorcio metanogénico degradador de tolueno a bajas temperaturas (Cardinali-Rezende *et al.*, 2009)

La banda L presentó un 99% de similitud con *Syntrophobacteraceae* aislada de filtros anaeróbicos de flujo ascendente tratamiento de residuos de los mataderos (Stets *et al.*, 2011).

Aunque la función exacta de los miembros de la comunidad correspondientes a cada banda de DGGE no puede descartarse con certeza a partir de la secuenciación del 16S banda rDNA-DGGE, podemos distinguir entre dos grupos de especies dominantes: los tres miembros de la comunidad correspondientes a las bandas F, G, H (*Clostridium* no clasificado y *Syntrophaceae*), supuestos degradadores de fenol a bajas concentraciones de fenol, con alta tasa de degradación, pero con poca tolerancia por encima de  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , y otro grupo constituido por dos miembros de la comunidad correspondientes a las bandas B y D (*Spirochaetaceae* y *Anaerolineaceae*), supuestos degradadores de fenol a altas concentraciones, con baja tasa de degradación, pero una gran tolerancia por encima de  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Sin embargo, podemos asumir a *Anaerolineaceae* como la más abundante de los ribotipos presentes en el reactor ASBR bajo la concentración más alta de fenol y que probablemente fue la que tuvo mayor participación en la degradación exitosa de fenol a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , y ha surgido a través de una adaptación progresiva al aumento de las concentraciones de fenol, ya que no era dominante significativamente a las concentraciones más bajas de fenol.

## 6.4 CONCLUSIÓN

Los análisis de microbiología respaldan los resultados obtenidos mediante los parámetros físico-químicos, ya que el número de adiciones de fenol fue la principal fuerza impulsora de la estructura de la comunidad, mientras que la presencia de glucosa como co-sustrato no indujo una diferenciación significativa de composición de la comunidad microbiana.

Con respecto a los resultados del estudio de la microbiología de las muestras obtenidas a partir de los ensayos realizados en el reactor ASBR, la estructura de la comunidad microbiana fue significativamente influenciada por la concentración de fenol, especialmente por encima de  $240 \pm 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Los cambios más drásticos fueron observados durante la concentración más alta ( $1200 \pm 43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) con una fuerte diferenciación de la estructura de la comunidad. El aumento de la concentración de fenol se acompaña de una disminución de la diversidad microbiana, sugiriendo una selección de los filotipos más adaptados.

## 6.5 REFERENCIAS

- Ambardar, S., Vakhlu, J. 2012. Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. *World J Microbiol Biotechnol.*
- Boone, D.R., Whitman, W.B., Rouvie`re, P., 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In: Ferry, J.G. (Ed.), *Methanogenesis*. Chapman & Hall Co., New York, 35–80.
- Cardinali-Rezende J, Debarry RB, Colturato LF, Carneiro EV, Chartone-Souza E, Nascimento AM. 2009. Molecular identification and dynamics of microbial communities in reactor treating organic household waste. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 84 (4):777-89.
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044–64.
- Delbes C., Moletta R., Godon J.J. 2000. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction±single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.*, 2(5), 506-515
- Dumont, M., Rapaport, a., Harmand, J., Benyahia, B., Godon, J.-J., 2008. Observers for microbial ecology - How including molecular data into bioprocess modeling? 2008 16th Mediterranean Conference on Control and Automation 1381–1386.
- Fang, H.H.P., Liu, Y., Ke, S.Z., Zhang, T., 2004. Anaerobic degradation of phenol in wastewater at ambient temperature. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 49, 95–102.
- Fang,CH; Lee, Chi-Lee. 2007. Enrichment, isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. strain P-6. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59, 206–210.
- Gieg, L. M., Duncan, K. E., Suflita, J. M. 2008. Bioenergy Production via Microbial Conversion of Residual Oil to Natural Gas. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (10), 3022–3029.
- Gilbride, K. a, Lee, D.-Y., Beaudette, L. 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of microbiological methods* 66(1), 1–20.
- Guieysse, B., Wikström, P., Forsman, M., Mattiasson, B. 2001. Biomonitoring of continuous microbial community adaptation towards more efficient phenol-degradation in a fed-batch bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 780–787.

- Hofman-Bang, J.; Zheng, D.; Westermann, P.; Ahring, B.K.; Raskin, L. 2003. Molecular ecology of anaerobic reactor systems. *Adv Biochem. Eng.* 81, 151–203.
- Knoll, J.; Winter. 1987. Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge benzoate formation from phenol and CO<sub>2</sub> in the presence of hydrogen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 384–391.
- Kunapuli, U., Lueders, T., Meckenstock, R. 2007. The use of stable isotope probing to identify key iron-reducing microorganisms involved in anaerobic benzene degradation. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 1, 643-653.
- Legendre, P.; and Legendre. L. 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam ; New York .
- Levén, L., Schnürer, A., 2005. Effects of temperature on biological degradation of phenols, benzoates and phthalates under methanogenic conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55, 153e160.
- Levén, L., Eriksson, A.R.B., Schnürer, A., 2007. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 683e693.
- Levén, L, Nyberg, K., Schnürer, A. 2010. Molecular characterisation of two anaerobic phenol-degrading enrichment cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64,427-433.
- Levén, L, Nyberg, K., Schnürer, A. 2012. Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste – a review of important microorganisms and impact of temperature. *Journal of Environmental Management* 99-103.
- Liang DW, Zhang T, Fang HH. 2007. Anaerobic degradation of dimethyl phthalate in wastewater in a UASB reactor. *Water Research*, 41(13):2879-84.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J.-P., Godon, J.-J., 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8 (4), 720–31.
- Mah, R.A., Xun, L.Y., Boone, D.R., Ahring, B.K., Smith, P.H., Wilkie, A., 1990. Methanogenesis from propionate in sludge and enrichment systems. In: Be' laich, Bruschi, Garcia (Eds.), *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer*. Plenum Press, New York, USA, pp. 99–111.

- Malik, S.; Beer, M.; Megharaj, M.; Naidu, R. 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International* 34 (2) 265–276.
- Martin F, Torelli S, Le Paslier D, Barbance A, Martin-Laurent F, Bru D, Geremia R, Blake G, Jouanneau Y. . 2010. Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environ Pollut.* 2012 Mar;162:345-53.
- Muyzer, G.; E C de Waal, Uitterlinden, A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*; 59(3): 695–700.
- Muyzer and Smalla. 1998. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127–141.
- Nelson, M., Morrison, M. Schanbacher, F., Yua, S. 2012. Shifts in microbial community structure of granular and liquid biomass in response to changes to infeed and digester design in anaerobic digesters receiving food-processing wastes. *Bioresource Technology* 107, 135–143.
- Regueiro, L.; Carballa, M.; Alvarez, J.; Lema, J.M. 2012. Enhanced methane production from pig manure anaerobic digestion using fish and biodiesel wastes as co-substrates. *Bioresource Technology* 123, 507–513.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A. 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *International Society for Microbial Ecology*, 3, 700–714.
- Roest, K.; Heilig, H.; Smidt, H.; de Vos, M.; Stams, A.; Akkermans, A. 2005. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 175–185.
- Rotaru, C., Woodard, T. L., Choi, S., Nevin, K. P. 2012. Spatial Heterogeneity of Bacterial Communities in Sediments from an Infiltration Basin Receiving Highway Runoff. *Microbial Ecology*, 64, 461–473.
- Sanz, J.; Köchling, T. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42, 119–133
- Seghers D, Wittebolle L, Top E M. 2004. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 1475–1482.

- Sherry A., Gray ND, Ditchfield AK., Aitken CM., Jones DM, Röling WFM., Hallmann C., Larter SR, Bowler BFJ, Head IM. 2013. Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 105–113.
- Stams, A.J.M., Zehnder, A.J.B., 1990. Ecological impact of syntrophic alcohol and fatty acid utilization. In: Be' laich, J.P., Bruschi, M., Garcia, J.L. (Eds.), *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer*. Plenum Press, New York, USA, pp. 87–89.
- Souza, D., Chinalia, F., Foresti, E. 2009. Bioremediation of gasoline-contaminated groundwater in a pilot-scale packed-bed anaerobic reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009,63:747-751.
- Sun, W. and A. M. Cupples. 2012. Diversity of five anaerobic toluene degrading microbial communities investigated using stable isotope probing (SIP), *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 972-980.
- Sutton NB, Maphosa F, Morillo JA, Abu Al-Soud W, Langenhoff AA, Grotenhuis T, Rijnaarts HH, Smidt H. 2013. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2):619-30.
- Talbot, G.; Topp, E.; Palin, M.F.; Massé, D.I. 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic Bioreactors. *Water Research* 42, 513 – 537.
- Tapia-Venegas, E., Ramirez, J., Donoso-Bravo, E., Jorquera, L., Steyer, J.P., Ruiz-Filippi, G. 2013. Bio-hydrogen production during acidogenic fermentation in a multistage stirred tank reactor Original Research Article *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 38, Issue 5, 19 February 2013, Pages 2185-2190.
- terBraak C. J. F.1986. Canonical Correspondence Analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67(5), 1167-1179.
- Trably, E., Batstone, D., Christensen, N., Patureau, D., Schmidt, J. 2008. Microbial dynamics in anaerobic enrichment cultures degrading di-n -butyl phthalic acid ester. *Federation of European Microbiological Societies Microbiol Ecology* 66, 472–483.

- Urra, J.E. 2009. Evaluación del comportamiento estructural y molecular de la biomasa presente en digestores anaerobios de lodos de mezcla completa. Tesis Doctoral, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413: 860–864.
- Xiaoqi, Z.; Yanfen, W.; Ying, C.; Xiangzhong, H.; Yanbin, H.; Jianqing, T.; Tuanyao, C. 2007. PCR-DGGE detection of the bacterial community structure in the Inner Mongolia steppe with two different DNA extraction methods. *Ecologica Sinica*, 27(5): 1684–1689.
- Zhang, T., Ke, S.Z., Liu, Y., Fang, H.H.P., 2005. Microbial characteristics of a methanogenic phenol-degrading sludge. *Water Sci. Technol.* 52 (1–2), 73–78.
- Zinder, S.H., Cardwell, S.C., Anguish, T., Lee, M., Koch, M., 1984. Methanogenesis in a thermophilic (58 °C) anaerobic digester: *Methanotheroxiphilum* sp. as an important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (4), 796–807.

## **CAPITULO 7: CONCLUSIONES GENERALES**

A continuación se presenta un resumen de las principales conclusiones obtenidas a partir de los ensayos desarrollados para el cumplimiento de los objetivos propuestos de esta tesis, los cuales hacen referencia a la influencia que ejercen diferentes factores en el comportamiento de un reactor anaerobio secuencial (ASBR) y su relación con el cambio generado en la estructura de las comunidades microbianas.

Se puede destacar algunos aspectos generales como:

- El comportamiento de un reactor ASBR se ve afectado pero se adapta frente a perturbaciones generadas ya sea por compuestos inhibitorios como fenol o parámetros operacionales como temperatura.
- Existe una clara dinámica entre el comportamiento funcional y poblacional en un digester ASBR.
- El comportamiento de un ASBR perturbado por temperatura se ajusta a el modelo propuesto por Bernard *et al.*, 2001.
- El comportamiento de un ASBR con presencia de fenoles se ajusta a el modelo propuesto por Chong *et al.*, 2009.
- La tecnología anaerobia de tipo ASBR representa una buena alternativa para tratamiento de compuestos de difícil degradación con respecto a tecnologías anaerobias convencionales, presentando capacidades de eliminación similares a altas concentraciones de fenol y mejores condiciones de adaptación y operación.

#### ***Influencia de la disminución de la temperatura***

La disminución de temperatura en periodos cortos de operación disminuye la tasa de producción de biogás, aumenta la acumulación de ácido propiónico y reduce la eficiencia de eliminación de materia orgánica.

La estructura de las comunidades de archaeas se ve muy afectada por las bajas temperaturas de operación en períodos cortos de tiempo en el rango de 37°C a 20°C, siendo los microorganismos hidrogenotróficos más afectados que los

acetoclásticos. Este resultado parece contradictorio con otros obtenidos en el estudio de operaciones a temperaturas significativamente más bajas. Esta discrepancia puede atribuirse a tres efectos: i) La solubilidad de  $H_2$  a 25°C es mucho más baja que a 4°C. ii) Altos tiempos de reacción favorecen a los microorganismos acetoclásticos frente a los hidrogenotróficos y iii) Mayor concentración de AGVs también favorece la actividad acetoclástica

### ***Influencia de la presencia de un compuesto inhibitorio como fenol***

Ensayos en batch mostraron principalmente tres aspectos importantes i) el origen de biomasa no tiene gran incidencia en el proceso de adaptación a la degradación anaerobia de fenol, pero si en el valor absoluto de la velocidad máxima de degradación ii) la presencia de co-sustrato fácilmente degradable como glucosa no ejerce un efecto positivo en la degradación anaerobia de fenol y iii) la biomasa anaerobia presenta una cierta adaptación a la presencia de fenol e incremento en la velocidad de degradación y disminución en el tiempo de retardo de inicio de degradación, luego de adiciones consecutivas de éste. Estas observaciones quedan demostradas con que para ambos tipos de inóculo (planta de tratamiento de industria cervecera y tabaco), el tiempo de inicio de degradación fue de 20-25 días después de la primera adición de fenol, y la degradación se completó después de 40-45 días. Después de la segunda adición de fenol, el intervalo de tiempo se redujo a 8-10 días y la degradación se completó en 20-25 días, revelando de esta manera, que la biomasa presentaría algún tipo de adaptación al fenol, al reducirse el tiempo requerido para la degradación total del compuesto. Quedando respaldado con una tercera adición donde el tiempo de inicio y total de degradación fenol correspondió a 3 y 11 días respectivamente. Los resultados fueron similares en presencia de glucosa, lo que es contradictorio a lo planteado en bibliografía. En este estudio consideramos que si efectivamente existiera algún co-factor producto de la degradación de glucosa, que favorezca la degradación de fenol, los tiempos de degradación son tan diferentes (menos de 1 día para glucosa, y no menor de 20 días para el inicio de degradación de fenol) que este efecto positivo puede llegar a ser prácticamente insignificante. Quizás un co-sustrato más lentamente degradable, podría ejercer un efecto positivo más considerable.

Con respecto a los resultados en reactor ASBR, este tipo de reactor presenta un buen comportamiento ante la presencia de un compuesto inhibitorio como fenol. La biomasa presente al igual que los ensayos en botellas presentó una adaptación al fenol, ya que la biomasa fue capaz de degradar completamente una concentración de fenol de  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , aunque la velocidad de degradación tiende a disminuir en este punto.

Otro aspecto importante a destacar, es que el aumento de concentración de fenol, presenta una influencia en la velocidad inicial y velocidad promedio de degradación de fenol.

Aspectos fundamentales por los que se pueden haber obtenido buenos resultados en la mayoría de las concentraciones aplicadas ( $120$ ,  $240$ ,  $500$ ,  $800$  y  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), corresponden primero que todo a las ventajas cinética que presenta esta tecnología anaerobia, la ausencia de co-sustrato que favoreció el consumo de fenol como sustrato principal y el tiempo y concentración aplicada durante la fase de adaptación de la biomasa ( $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 80 días).

#### ***Dinámica de la estructura microbiana por la presencia de un compuesto inhibitorio como fenol***

Los análisis de microbiología respaldan los resultados obtenidos mediante los parámetros físico-químicos. El número de adiciones sucesivas de fenol fue la principal fuerza impulsora de la estructura de la comunidad microbiana presente en ensayos en botellas, mientras que la presencia de glucosa como co-sustrato no indujo una diferenciación significativa de composición de la comunidad microbiana. Con respecto a los resultados del estudio de la microbiología de las muestras obtenidas a partir de los ensayos realizados en el reactor ASBR, la estructura de la comunidad microbiana fue significativamente influenciada por la concentración de fenol, especialmente por encima de  $240\pm 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Los cambios más drásticos fueron observados durante la concentración más alta ( $1200\pm 43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con una fuerte diferenciación de la estructura de la comunidad. El aumento de la concentración de fenol se acompaña de una disminución de la diversidad microbiana, sugiriendo una selección de los filotipos más adaptados.

**ANEXO**

## A.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL ENSAYOS EN BOTELLAS

El protocolo empleado para los ensayos de degradación anaerobia de fenol, son los mismos descritos por Soto *et al.* (1993) para una actividad metanogénica, pero solo cambia el sustrato añadido.

### **Mediciones:**

- Fase gas: Determinar la presión y luego, tomar muestra gaseosa para medir la composición del biogás producido. La frecuencia de muestreo debe ser diaria durante los 6 primeros días
- Fase líquida: Una vez realizadas las mediciones a la fase gas, se debe tomar muestra líquida para determinar la concentración de sustrato (AGV, fenol o glucosa), DQO soluble y pH.
- Biomasa: Al inicio y término de cada ensayo en botella, se deben tomar muestras de biomasa para medir la cantidad de sólidos y para el análisis de las comunidades microbianas presentes (DGGE).

*Medio de Cultivo:* Solución de macro y micronutrientes; resazurina; extracto de levadura; cisteína y agua destilada.

*Disolución reductora:* ( $100 \text{ g Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}\cdot \text{L}^{-1}$ ), para esto, pesar 4 g y disolver en 100 mL de agua destilada.

*Solución patrón de fenol:* 40 g fenol en 1 L.

*Solución patrón de glucosa:*  $150 \text{ g DQO}\cdot \text{L}^{-1}$  (14.058 gramos de glucosa en 100 mL).

*Solución de AGV para actividad metanogénicas:*  $50 \text{ g DQO}\cdot \text{L}^{-1}$  (2.23 ml ácido acético, 0.833 mL de ácido propiónico, 0.718 ml ácido butírico, 5.7 mL de NaOH 10 M).

Luego De prepararlo, verificar que pH esté en 7.0, si es menor, ajustar con NaOH.

**Preparación de botellas:****Consideraciones:**

- Si el lodo se encuentra en cámara fría o inactiva, antes de comenzar el ensayo, acondicionarlo a 37°C por 1 día.
- Antes de comenzar la preparación de las botellas verificar que el pH del medio se encuentre en 7.5, si es mayor, adicionar solución de NaOH.
- Corroborar que el pH de la solución reductora esté en 7.5, como es mayor, adicionar ácido clorhídrico

**Metodología:**

- 1- Adicionar el volumen de medio de cultivo de acuerdo a los requerimientos de nutrientes dependiendo de la concentración de biomasa y fuente de carbono presente.
- 2- Agregar 1 mL de disolución reductora por botella.
- 3- Agregar agua destilada dependiendo de las concentraciones estipuladas.
- 4- Agregar bicarbonato, dependiendo de la concentración de sustrato presente, de manera que sea una relación de 1 g DQO por 1 g. de bicarbonato.
- 5- Verificar que el pH en la botella se encuentra en 7.5.
6. Adicionar biomasa en una concentración 1.5 g SSV·L<sup>-1</sup> por botella, de acuerdo a la concentración que tenga el lodo.
7. Tapar las botellas y poner en shaker y a 37°C por 30 minutos, de manera que el lodo que la biomasa se acondicione al medio.
8. Agregar el sustrato a degradar, ya sea glucosa y fenol o solo fenol (degradación anaerobia) o AGV (actividad metanogénica) dependiendo del ensayo, en volúmenes tales de soluciones patrones para que la concentración de fenol sea 200 mg·L<sup>-1</sup> y 1.5 g DQOs ·L<sup>-1</sup> para glucosa o AGV.

9. Una vez finalizados los pasos anteriores, agitar y tomar muestra líquida a tiempo cero.
10. Gasear las botellas con nitrógeno y verificar que la presión interna es cero.
11. Disponer las botellas en un shaker agitado y a 37°C.