



Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

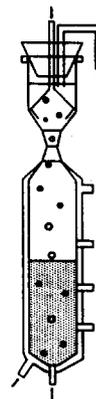
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

126938

**DEGRADACION**

**ANAEROBIA**

**DE ACETAMIDA**



T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

**FLORINA RAMIREZ VIVES**

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

MÉXICO, D.F., 1992

5

11/11/1993 CMC

A mi hija ADRIANA,

a mis PADRES,

a mis HERMANOS.

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

**El presente trabajo se llevó a cabo  
en el laboratorio de Microbiología  
Ambiental del Departamento de  
Biotecnología de la UAM-Iztapalapa.**

**U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA**

**La maestría en Biología Experimental de la UAM-Iztapalapa está en el padrón de posgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y cuenta con el apoyo por medio del convenio de fortalecimiento del posgrado nacional No. 7.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi tutor:**

**126938**

Dr. Jean Pierre Guyot, responsable de investigación de la ORSTOM en México, por todas sus enseñanzas y mi formación en microbiología anaerobia, así como la dirección de esta tesis.

**A mis asesores:**

M. en C. Jorge Gómez y Dr. Francisco Cruz, por su asesoría y apoyo.

**A mi maestro:**

M. en C. Oscar Monroy, por todo su apoyo y las facilidades proporcionadas.

A la Dra. Isabel Guerrero, Jefa del Departamento de Biotecnología, por todas las facilidades otorgadas.

**A mis compañeros y amigos:**

Ing. Henri Ferrer, por su asesoría y ayuda en los análisis cromatográficos.

Juan Carlos Peña, por su ayuda y asesoría para la edición de esta tesis.

Beatriz Schettino, Amparo Ramos, Margarita Salazar, Carmen Fajardo, Elber Salazar, Graciela González, Monica Meráz y José Alvarez, por sus consejos, apoyo y motivación.

**A mis alumnos:**

Agustín Torres, Martha Sánchez, Carolina Luna y Gustavo Luna, porque sin su ayuda no hubiera sido posible la conclusión de este trabajo.

A Jorge Lodigiani, por su apoyo profesional.

---

# ***INDICE***

---

## I N D I C E

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Microbiología y bioquímica de la digestión anaerobia	5
1.1.1. Primera etapa de la digestión anaerobia	7
1.1.2. Segunda etapa de la digestión anaerobia	11
1.1.2.1. Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno	11
1.1.2.2. Bacterias sulfato-reductoras	13
1.1.2.3. Bacterias homoacetogénicas	15
1.1.3. Tercera etapa de la digestión anaerobia	15
1.1.3.1. Bacterias metanogénicas hidrogenotrofas	15
1.1.3.2. Bacterias metanogénicas acetoclásticas	18
1.1.3.3. Bacterias metanogénicas metilotrofas	18
1.1.3.4. Características distintivas de las bacterias metanogénicas	18

1.2. El papel del hidrógeno en la digestión anaerobia	20
1.2.1. Hidrógeno y acetogénesis	20
1.2.2. Hidrógeno y metanogénesis a partir de acetato	22
1.3. Digestión anaerobia y sulfatos	23
1.3.1. Competencia por los sustrato metanogénicos	23
1.3.2. Sulfatos como fuente de sulfuros	24
1.4. Amonio y digestión anaerobia	25
1.5. Descripción de los reactores UASB	26
2. Antecedentes	29
3. Objetivos	32
4. Material y métodos	34
4.1. Actividades	35
4.2. Cuantificación de la microflora	40
4.3. Reactores UASB	42

<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Actividades</b>	<b>46</b>
<b>5.2. Cuantificación de la microflora</b>	<b>60</b>
<b>5.3. Reactores UASB</b>	<b>62</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>77</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>80</b>
<b>Anexo</b>	<b>85</b>
<b>Glosario y abreviaturas utilizadas</b>	<b>99</b>

---

# ***RESUMEN***

## RESUMEN

La acetamida, subproducto de la fabricación de pinturas, taninos, plásticos y otros productos comerciales; puede ser tratada por Digestión Anaerobia como una alternativa para el tratamiento de estos efluentes.

El interés por tratar este tipo de efluentes, surgió debido a la semejanza estructural que presenta este compuesto con el ácido acético (principal precursor del metano).

En este trabajo se presentan las rutas metabólicas de biodegradación de este compuesto por dos muestras de lodos acondicionados durante más de tres años, uno de ellos solamente con acetamida y el otro con acetamida más sulfato de sodio.

Se caracterizó otro tipo de lodo proveniente de una industria de levaduras (IMEXA), y se trabajó con 7 diferentes concentraciones de acetamida para determinar las características cinéticas.

Los resultados de estos cultivos demuestran que el tiempo de biodegradación de este compuesto es de 60 horas para las muestras que contiene únicamente acetamida, y de 330 horas para las muestras con acetamida más sulfato de sodio (incluyendo 40 horas de fase de retardo). Lo que demuestra, en éste caso y con los medios de cultivos utilizados, que la vía sin sulfato (vía metanogénica) es más rápida para la degradación de la acetamida.

Los tres diferentes lodos estudiados demuestran una baja actividad con el sustrato, y estas cinéticas de degradación nos representan una curva que sigue el modelo de Monod.

El presente trabajo demostró que este compuesto puede ser degradado por digestión anaerobia y se pudieron establecer las rutas metabólicas que sigue la microflora por medio de la vía metanogénica y por la vía de sulfato-reducción. Finalmente se trabajó con dos UASB de laboratorio, uno de ellos no presenta remoción debido a problemas de operación. Un segundo reactor de 1.25 l operando a 4 y 3 días de TRH y con cargas orgánicas de acetamida 0.875 y 1.13 KgDQO/m<sup>3</sup>·d respectivamente trabajando en condiciones de laboratorio más controladas presenta porcentajes de remoción de la DQO soluble del 95 y 87% respectivamente y un porcentaje de metano del 55 y 57% respectivamente en la fase gaseosa.

Se presentan además los resultados de la cuantificación de los grupos bacterianos presentes en los lodos.

---

# ***1. INTRODUCCION***

## 1. INTRODUCCION

La digestión anaerobia es un proceso microbiano anaerobio complejo, de conversión de la materia orgánica, en acetato, dióxido de carbono, hidrógeno y finalmente metano. Este fenómeno se produce en diversos tipos de medio ambientes tales como en los pantanos, suelos de arrozales, sedimentos marinos y lacustres, microambientes anóxicos del suelo, corazón de los árboles muertos, fuentes calientes sulfurosas, tracto digestivo del hombre y de los animales particularmente el de los rumiantes (Guyot, 1988). Otro grupo importante contribuyente en la producción de metano es el de las termitas, que según algunas estimaciones pueden producir hasta el 15% (García, 1991).

La formación de metano y bióxido de carbono corresponde a la última etapa de una serie de reacciones por las cuales los compuestos orgánicos son degradados. El metano corresponde a la forma más reducida y el bióxido de carbono a la forma más oxidada del carbono.

La biometanación es realizada por un conjunto de poblaciones bacterianas complejas, las cuales bajo condiciones ambientales particulares (potencial redox menores a  $-350$  mV, pH cercano a la neutralidad), dan lugar a asociaciones estables. En los biotopos naturales anaerobios que contienen compuestos orgánicos complejos, las bacterias metanogénicas están relacionadas con otras bacterias quimioheterótrofas para la degradación de la materia orgánica.

La biometanación puede ocurrir en ambientes psicrófilos ( $10-15^{\circ}$  C), mesófilos ( $30-40^{\circ}$  C) y termófilos (más de  $45^{\circ}$  C), para esta última clasificación se hace una distinción entre bacterias termotolerantes que crecen de  $30-35^{\circ}$  C, pero también a  $50^{\circ}$  C, y las bacterias termófilas que tienen su temperatura óptima de crecimiento hasta de  $100^{\circ}$  C.

El hombre ha utilizado este fenómeno natural de biometanización para su propio beneficio, tanto para la producción de biogas con fines energéticos como la

descomposición y el tratamiento de sus desechos sólidos y líquidos.

Las especies bacterianas implicadas en el proceso de la digestión anaerobia de la materia orgánica, pueden ser diferentes de un biotopo a otro; esto depende de las condiciones fisicoquímicas como son la temperatura, pH, la presión osmótica y la composición del sustrato.

Debido a la complejidad en el cultivo de los microorganismos anaerobios involucrados en la metanización, era muy difícil adaptar metodologías para el estudio de éstos, fue en años recientes y gracias a los aportes de Hungate (1969), Wolfe (1976), Bryant (1967) y Mah (1980), se han logrado grandes avances en el mejoramiento de las técnicas de estudio de las bacterias anaerobias estrictas, los cuales permitieron entender mejor, la complejidad de las interacciones microbianas y bioquímicas, en los sistemas de transformación anaerobia.

### **1.1. BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA DIGESTION ANAEROBIA**

Desde 1930, la producción de metano en los ecosistemas anaerobios fue descrito como un proceso en dos etapas, la primera etapa consiste en la transformación de los polímeros biológicos de alto peso molecular hasta acetato, bióxido de carbono e hidrógeno; la segunda etapa es la transformación del acetato, hidrógeno y bióxido de carbono en metano y bióxido de carbono.

Los descubrimientos hechos por Bryant y col. (1977), sobre la degradación del etanol hasta metano y los estudios realizados posteriormente por Mc. Inerney y col. (1981), llevó a proponer un esquema en tres etapas para responder mejor a los últimos alcances (Fig. 1).

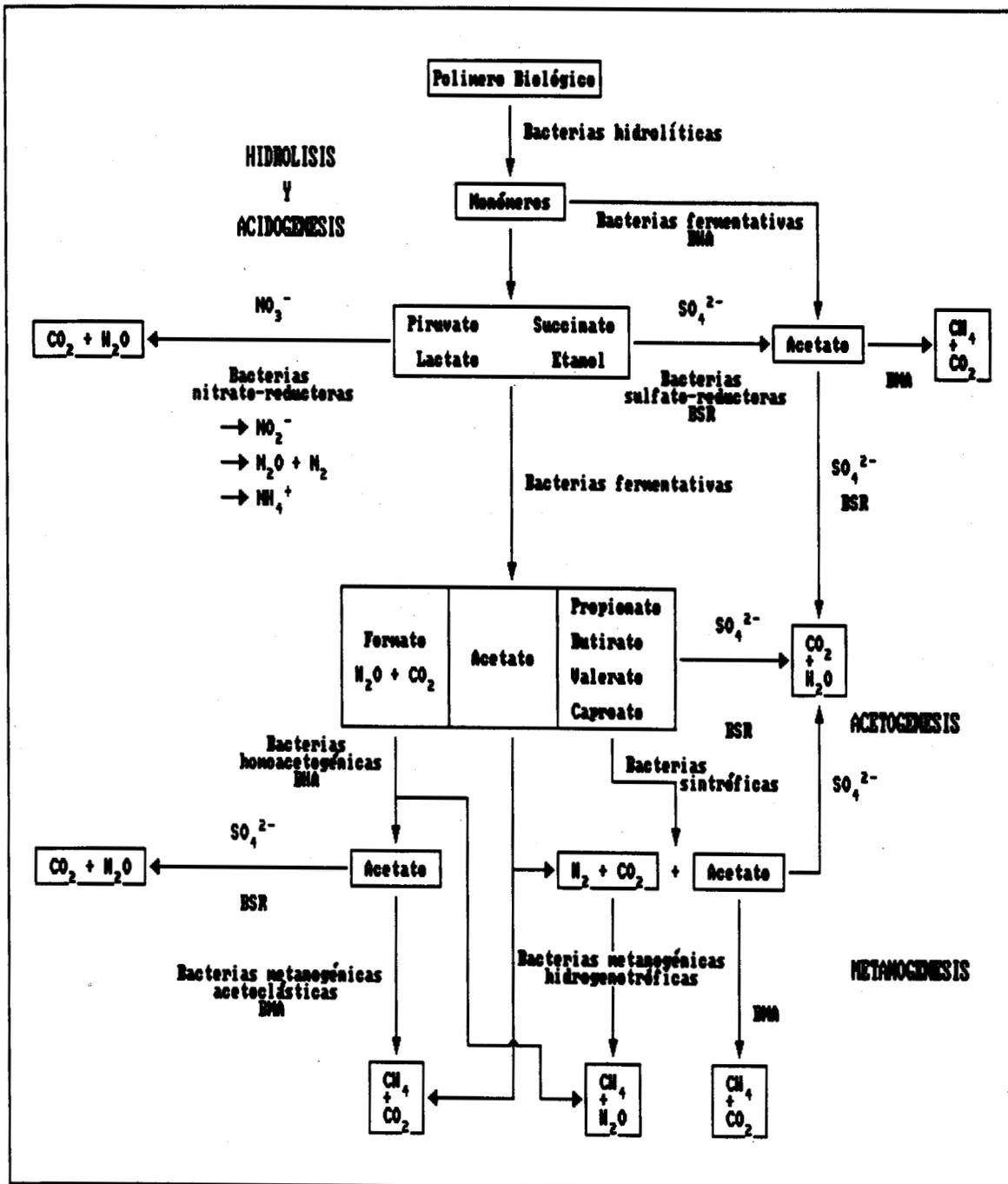


Fig. 1. Esquema de la digestión anaerobia (García, 1991).

### **2.1.1. Primera etapa (Hidrólisis y Acidogénesis)**

La primera etapa consiste en la hidrólisis y acidogénesis de los compuestos de alto peso molecular (proteínas, lípidos, carbohidratos) a unidades químicas más simples como son azúcares, aminoácidos y su fermentación en ácidos grasos volátiles (AGV), otros tipos de ácidos, alcoholes, hidrógeno y bióxido de carbono. Esta etapa se realiza por microorganismos diversos (bacterias y hongos), anaerobios o facultativos, que generan según el polímero biológico degradado, compuestos más simples (Fig. 1).

El estudio de estos microorganismos está enfocado principalmente a la hidrólisis de la celulosa, dada su importancia como fuente principal de biomasa a través de la producción vegetal y sus subproductos.

Los microorganismos celulolíticos han sido estudiados por su capacidad de producir celulasas, son numerosos en el rumen de donde se descubrieron los primeros hongos celulolíticos anaerobios.

Las bacterias fermentativas producen ácidos grasos volátiles, lactato, etanol, formiato hidrógeno y bióxido de carbono. En el caso de la celulosa se pueden representar en tres niveles (Guyot, 1988):

a) **primer nivel:** bacterias primarias son las que hidrolizan la celulosa a celobiosa, glucosa, etanol, lactato, acetato, hidrógeno y bióxido de carbono.

b) **segundo nivel:** bacterias secundarias son las que hidrolizan celobiosa + glucosa a etanol, lactato, hidrógeno y bióxido de carbono.

c) **tercer nivel:** bacterias auxiliares son las que transforman el etanol o el lactato a acetato, hidrógeno y bióxido de carbono.

Además de las bacterias celulolíticas existen bacterias proteolíticas y lipolíticas que no han sido todavía muy bien estudiadas.

Dentro de las especies celulolíticas anaerobias más numerosas se encuentra el género *Clostridium* (Tabla I).

Dentro de la primera etapa de la digestión anaerobia se lleva también a cabo la fermentación de los compuestos resultados de la hidrólisis de los polímeros de alto peso molecular y también de compuestos intermediarios hasta la formación de alcoholes, ácidos grasos volátiles, otros ácidos, hidrógeno y bióxido de carbono. Esta etapa fermentativa es llevada a cabo por un conjunto diverso de bacterias anaerobias o facultativas, cuyo rango fermentativo es muy amplio. En esta primera etapa el piruvato ocupa una posición clave y controla la orientación de las fermentaciones.

Los productos intermedios como el lactato o el etanol no se acumulan en los digestores anaerobios, porque la microflora metanogénica consume activamente el hidrógeno y desplaza el metabolismo hacia productos más oxidados como el acetato, lo que hace que las bacterias fermentativas produzcan más hidrógeno y acetato y en menores cantidades los demás metabolitos como el lactato y el etanol (García, 1991).

La producción de ácidos en esta etapa disminuye el pH y es una fuente frecuente de inhibición del proceso entero.

Los ácidos acumulados son tóxicos sobretudo para la bacterias metanogénicas, porque las bacterias fermentativas son todavía activas hasta un pH de 4.5-5.

La composición de las poblaciones bacterianas varía mucho con el biotopo considerado o el origen del sustrato que se metaniza. En la tabla II, se presentan diferentes grupos de estas bacterias así como sus productos.

**TABLA I. Bacterias hidrolíticas de la digestión anaerobia  
(García, 1983).**

ESPECIES	SUSTRATO
<b>Mesofilicas</b>	
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Celulosa
<i>Bacteroides succinogenes</i>	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
<i>Cillobacterium cellulosolvens</i>	
<i>Ruminococcus albus</i>	
<i>Ruminococcus flavifaciens</i>	
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Hemicelulosas
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
<i>Bacillus</i> spp.	Almidón
<i>Bacteroides</i> spp.	
<i>Clostridium butyricum</i>	
<i>Clostridium</i> spp.	
<i>Lactobacillus</i> spp.	
<i>Micrococcus</i> spp.	
<i>Pseudomonas</i> spp.	
<i>Clostridium butyricum</i>	Pectinas
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Lípidos
<i>Bacillus</i> spp.	
<i>Clostridium acidi urici</i>	Comp. nitrogenados
<i>Clostridium cylindrosporum</i>	
<i>Micrococcus aerogenes</i>	
<i>Micrococcus lactilycus</i>	
<i>Bacillus</i> spp.	Proteínas
<i>Clostridium</i> spp.	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	
<i>Peptococcus anaerobus</i>	
<i>Staphylococcus</i> spp.	
<b>Termofilicas</b>	
<i>Clostridium thermocellum</i>	Celulosa
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Almidón, Pectinas

**TABLA II. Bacterias fermentativas de la digestión anaerobia  
(García, 1983).**

ESPECIES	METABOLITOS
<b>Mesofilicas</b>	
<i>Acetobacterium woodii</i> <i>Clostridium aceticum</i> <i>Clostridium formiaceticum</i>	acetato
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>Acidaminococcus</i> sp.	acetato, butirato
<i>Clostridium</i> sp.	acetato, butirato, etanol
<i>Propionibacterium</i> sp. <i>Anaerovibrio</i> sp. <i>Veillonella</i> sp.	acetato, propionato
<i>Lactobacillus</i> sp.	acetato, etanol, lactato
<i>Bifidobacterium</i> sp.	acetato, lactato
<i>Ruminococcus</i> sp.	acetato, lactato, formato
<i>Leptotrichia</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	lactato
<i>Succinivibrio</i> sp.	succinato
<i>Butyrivibrio</i> sp. <i>Fusobacterium</i> sp.	butirato
<i>Megasphaera</i>	butirato, isobutirato, valerato, isovalerato, caproato
<b>Termofilicas</b>	
<i>Clostridium thermo-aceticum</i> <i>Acetogenium kivui</i>	acetato
<i>Thermo-anaerobium brockii</i>	lactato, acetato, etanol
<i>Thermo-bacteroides acetoethilicus</i>	etanol, acetato, butirato, isobutirato
<i>Thermo-anaerobater ethanolicus</i>	etanol, acetato, lactato, isobutirato, isovalerato
<i>Clostridium thermo-saccharolyticum</i>	etanol, acetato, lactato, butirato, formato

### **2.1.2. Segunda etapa (Acetogénesis)**

La segunda etapa de la metanogénesis corresponde a la transformación de los productos de la primera etapa en acetato, hidrógeno y bióxido de carbono, y se describe como una etapa de deshidrogenación acetogénica. Los principales sustratos de esta etapa son el propionato, butirato y el etanol. A este nivel existe también una etapa de homoacetogénesis que es la producción directa de acetato a partir de hidrógeno y bióxido de carbono (Fig. 1).

En esta etapa pueden intervenir tres grupos de bacterias:

#### **2.1.2.1. Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno (OHPA)**

Estas bacterias son las más representativas de la segunda etapa en los digestores anaerobios y producen hidrógeno y acetato, muy pocas han sido aisladas, casi siempre deben estar en estrecha relación sintrófica con las bacterias hidrogenofílicas, tienen tiempos de crecimiento muy largos de 90-160 horas, (Boone y Bryant, 1980). Son muy particulares ya que solamente pueden crecer en presencia de otras bacterias anaerobias estrictas consumidoras de hidrógeno como las metanogénicas hidrogenotrofas o algunas sulfato-reductoras en presencia de sulfato. La deshidrogenación de los sustratos producidos durante la primera etapa es termodinámicamente desfavorable en condiciones estándares, y no puede ser realizada por estas bacterias en cultivo puro; sin embargo con muy bajas presiones parciales de hidrógeno, las reacciones se vuelven termodinámicamente posibles y la variación de energía permite el crecimiento de estas bacterias en cocultivo (Tabla III). Su descubrimiento puso en evidencia el proceso de transferencia de interespecies de hidrógeno. La existencia de estos cultivos naturales subraya la importancia de las asociaciones bacterianas que pueden

**TABLA III. Bacterias sintróficas obligatorias de la digestión anaerobia (OHPA) [García, 1991].**

Bacterias	Reacción	G'° (KJ/reacción)
Organismo "S" ( <i>Pelobacter</i> sp.)		
	Etanol + H <sub>2</sub> O ----> acetato + 2H <sub>2</sub> O	+9.6
<i>Syntrophobacter wolinii</i>		
	Propionato + 3H <sub>2</sub> O ----> acetato + 3H <sub>2</sub> O + CO <sub>2</sub>	+76.1
<i>Syntrophomonas bryantii</i>		
	<i>sapovorans</i>	
	<i>wolfei</i> sub. sp. <i>saponavida</i>	
	<i>wolfei</i> sub. sp. <i>wolfei</i>	
<i>Syntrophospora bryantii</i>		
	Butirato + 2H <sub>2</sub> O ----> 2 acetato + 2H <sub>2</sub>	+48.1
<i>Syntrophus buswellii</i>		
	Benzoato + 7H <sub>2</sub> O ----> 3 acetato + 3H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	+53.0

establecerse durante la digestión anaerobia de polímeros biológicos.

Varios géneros han sido descritos, como los que son capaces de oxidar los ácidos grasos volátiles de cadena larga y el ácido benzoico.

#### **2.1.2.2. Bacterias sulfato-reductoras (BSR)**

Son bacterias que utilizan principalmente sulfato como aceptor final de electrones y se clasifican en dos grupos:

- a) Las bacterias que oxidan de manera incompleta su sustrato, tal como la oxidación del lactato en acetato y  $\text{CO}_2$ , por las bacterias del tipo *Desulfovibrio* sp.
- b) Las que oxidan de manera completa su sustrato, tal como la oxidación completa de compuestos aromáticos, como el género *Desulfosarcina* sp.

Algunas bacterias sulfato-reductoras son competidoras de las bacterias metanogénicas, siendo una de las causas de la ausencia de metanogénesis en presencia de sulfatos. La BSR y las metanogénicas compiten para el uso del acetato y del hidrógeno en presencia de sulfato. Sin embargo, la importancia trófica y la actividad metabólica de las bacterias sulfato-reductoras en los digestores en ausencia de sulfatos no han sido del todo estudiadas (García, 1991). Puede existir no obstante una relación mutua con las bacterias metanogénicas en el campo de la transferencia interespecies de hidrógeno. En este proceso las metanogénicas eliminan el hidrógeno producido por las sulfato-reductoras y remplazan el sulfato como aceptor final de electrones y hacen la reacción termodinámicamente favorables. Solo un número restringido de especies son capaces de realizar esta transferencia y pertenecen todas al género *Desulfovibrio* (Tabla IV).

**TABLA IV. Bacterias sulfato-reductoras (García, 1991).**

Grupo 1	Grupo 2
<p><i>Desulfovibrio</i>  <i>africanus</i>  <i>alcoholovorans</i>  <i>carbinolicus</i>  <i>desulfuricans</i>  <i>fructosovorans</i>  <i>furfuralis</i>  <i>giganteus</i>  <i>gigas</i>  <i>halophilus</i>  <i>pigra</i>  <i>saalexigens</i>  <i>simplex</i>  <i>sulfodismutans</i>  <i>termitidis</i>  <i>vulgaris</i></p>	<p><i>Desulfobacter</i>  <i>curvatus</i>  <i>hydrogenophilus</i>  <i>latus</i>  <i>postgatei</i></p> <p><i>Desulfobacterium</i>  <i>anilini</i>  <i>autotrophicum</i>  <i>catecholicum</i>  <i>indolicum</i>  <i>macestii</i>  <i>niacini</i>  <i>phenolicum</i>  <i>vacuolatum</i></p>
<p><i>Desulfobotulus</i>  <i>sapovorans</i></p>	<p><i>Desulfococcus</i>  <i>biacutus</i>  <i>multivorans</i></p>
<p><i>Desulfotomaculum</i>  <i>antarticum</i>  <i>guttoideum</i>  <i>nigrificans</i>  <i>orientis</i>  <i>ruminis</i></p>	<p><i>Desulfoarculus</i>  <i>baarsii</i></p> <p><i>Desulfotomaculum</i>  <i>acetoxidans</i>  <i>geothermicum</i>  <i>kuznetsovii</i>  <i>thermoacetoxidans</i>  <i>thermobenzoicum</i></p>
<p><i>Desulfomicrobium</i>  <i>apsheronum</i>  <i>baculatum</i></p>	<p><i>Desulfonema</i>  <i>limicola</i>  <i>magnum</i></p>
<p><i>Desulfomonile</i>  <i>tiedjei</i></p>	<p><i>Desulfosarcina</i>  <i>variabilis</i></p>
<p><i>Desulfohalobium</i>  <i>retbaense</i></p> <p><i>Thermodesulfobacterium</i>  <i>commune</i>  <i>mobile</i></p>	<p><i>Archaeoglobus</i>  <i>fulgidus</i>  <i>profundus</i></p>
<p><i>Desulfobulbus</i>  <i>elongatus</i>  <i>propionicus</i></p>	

### **2.1.2.3. Bacterias homoacetogénicas**

Estas bacterias fermentativas se caracterizan por la producción exclusiva de acetato, sea a partir de un sustrato carbonado, reduciendo el bióxido de carbono con los electrones formados durante la fermentación de este sustrato (Grupo 1), ó a partir de la reducción del bióxido de carbono por el hidrógeno (Grupo 2). Esta vía de formación de acetato a partir de bióxido de carbono más hidrógeno no parece competitiva con la metanogénesis, ya que se enumeran alrededor de cien veces menos homoacetogénicas del grupo 2 que de metanogénicas en los digestores anaerobios (Tabla V). Estas bacterias pertenecen a grupos bacterianos muy diversos y tienen las siguientes características (Eichler y Schink, 1984):

- a) Tres moles de acetato deben de ser formados a partir de la glucosa o fructosa.
- b) No hay hidrógeno molecular producido.
- c) El bióxido de carbono es necesario para el crecimiento.
- d) El bióxido de carbono es incorporado al acetato, dependiendo del sustrato utilizado.

### **2.1.3. Tercera etapa (Metanogénesis)**

La metanogénesis es la última etapa de la digestión anaerobia y consiste en la producción de metano a partir del acetato, hidrógeno más bióxido de carbono, compuestos metilados y de ciertos alcoholes en presencia de bióxido de carbono (Fig. 1).

Se pueden definir tres grupos nutricionales (Tabla VI).

**2.1.3.1. Bacterias metanogénicas hidrogenotrofas:** utilizan como sustrato el hidrógeno más bióxido de carbono y algunas el formato.

**TABLA V. Bacterias homoacetogénicas de la digestión anaerobia (García, 1991).**

---

**Grupo 1 : H<sup>+</sup> (reducción de un comp. carbonado) + CO<sub>2</sub> -> acetato**

---

<i>Butyribacterium</i>	<i>rettgeri</i>
<i>Clostridium</i>	<i>acidiurici</i> <i>cylindrospermum</i> <i>formicoaceticum</i> <i>magnum</i> <i>thermoaceticum</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>glycinophilus</i>

---

**Grupo 2 : H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> ----> acetato**

---

<i>Acetoanaerobium</i>	<i>noterae</i>
<i>Acetobacterium</i>	<i>carbinolicum</i> <i>malicum</i> <i>termitida</i> <i>wieringae</i> <i>woodii</i>
<i>Acetogenium</i>	<i>kivui</i>
<i>Acetofilamentum</i>	<i>rigidum</i>
<i>Acetohalobium</i>	<i>arabaticum</i>
<i>Acetomicrobium</i>	<i>flavidum</i>
<i>Acetothermus</i>	<i>paucivorans</i>
<i>Acetitomaculum</i>	<i>ruminis</i>
<i>Clostridium</i>	<i>aceticum</i> <i>ljungdahlii</i> <i>mayombii</i> <i>thermoautotrophicum</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>
<i>Sporomusa</i>	<i>acidovorans</i> <i>malonica</i> <i>ovata</i> <i>paucivorans</i> <i>sphaeroides</i> <i>termitida</i>

---

**TABLA VI. Grupos nutricionales de las bacterias metanogénicas (García, 1991).**

**1. Hidrogenotróficas (67%)**

Usan H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> y según las especies, el formato

<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanobrevibacter</i>
<i>Methanothermus</i>	<i>Methanopyrus</i>
<i>Methanococcus</i>	<i>Methanomicrobium</i>
<i>Methanolacinia</i>	<i>Methanoculleus</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>Methanocorpusculum</i>
<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanoplanus</i>
<i>Methanoplasma</i>	

**2. Acetoclásticas (13%)**

Usan el acetato y según las especies, H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, formato, metanol y metilaminas

<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanothrix</i>
<i>Methanosaeta</i>	

**3. Metilotróficas (27%)**

Usan el metanol y las metilaminas

<i>Methanolobus</i>	<i>Methanococcoides</i>
<i>Methanohalophilus</i>	<i>Methanohalococcus</i>
<i>Methanohalobium</i>	

**4. Hidrogeno-metilotróficas (3%)**

Usan exclusivamente H<sub>2</sub> + metanol

*Methanosphaera*

**5. Alcoholotróficas (10%)**

Usan CO<sub>2</sub> + alcohol (2-propanol, 2-butanol, etanol)

<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanospirillum</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>Methanocorpusculum</i>

**2.1.3.2. Bacterias metanogénicas acetoclásticas:** utilizan el acetato como sustrato, y según las especies, hidrógeno más bióxido de carbono y metilaminas.

**2.1.3.3. Bacterias metanogénicas metilotrofas:** son las que utilizan como sustrato metanol, metilaminas y metildisulfuros.

Entre las sesenta y ocho especies descritas hasta hoy 67% son hidrogenotrofas, 13% son acetoclásticas y 27% son metilotrofas, de éstas últimas 17% son metilotrofas obligadas y el 3% son hidrógeno-metilotrofas y usan el hidrógeno para reducir el metanol a metano. Algunas especies son alcoholotrofas y producen metano en presencia de ciertos alcoholes como donadores de hidrógeno. El monóxido de carbono puede también ser convertido en metano, pero no constituye un sustrato importante en la metanogénesis.

Excepto las acetoclásticas y las metilotrofas, la mayoría de las especies son capaces de usar formiato. Ciertas acetoclásticas son incapaces de oxidar el hidrógeno; las especies del género *Methanosarcina* son las más versátiles de las metanogénicas, pero la especie del género *Methanotrix* usan solamente el acetato.

La taxonomía de las bacterias metanogénicas ha sido profundamente revisada después del estudio comparativo de algunas de sus características distintivas (Woese, 1977), como es la secuencia de su ARN ribosomal 16S, la composición de los lípidos en sus paredes y los análisis inmunológicos. La bacterias metanogénicas se clasifican en un nuevo reino: el de las Arquibacterias.

#### **2.1.3.4. Características distintivas de las bacterias metanogénicas**

En 1977, Woese clasificó a las bacterias metanogénicas dentro de las Arquibacterias que presentan diferencias con las bacterias clásicas, tanto fisiológicas como

estructurales. Su pH óptimo es de 6-8, el amoniaco y el sulfuro de hidrógeno son sus principales fuentes de nitrógeno y azufre; el níquel es el átomo central de la coenzima F430, que actúa como grupo prostético de la enzima metil-coMreductasa que cataliza el paso final de la formación de metano (Schoberth y col., 1982). El factor F420 hace que las bacterias metanogénicas fluorescan a 420 nm y permite su identificación por medio de un microscopio con dispositivo de epifluorescencia, y determinar actividades bioquímicas en los digestores anaerobios Gorris y col. (1988). Son bacterias anaerobias estrictas que exigen además de la ausencia de oxígeno, condiciones de reducción del medio ambiente inferiores a los -350 mV para crecer Zehnder (1978), tienen como características comunes producir metano, tiene un rango de sustratos muy limitado y tiempos de crecimiento largos. La pared de estas bacterias en ningún caso tienen mureína o peptidoglicano, por el contrario la pared de las bacterias metanogénicas tienen una gran variedad de estructura; por ejemplo, las Methanobacteriaciae tiene una pared compuesta de un polímero denominado pseudomureína que se caracteriza por la ausencia de ácido murámico y la presencia de ácido N-acetiltalosaminurónico y las Methanosarcina tienen un polisacárido, estas estructuras hacen a las bacterias insensibles a la acción de la lisozima y antibióticos tales como, la penicilina, cicloserina y la valeromicina.

La composición en lípidos de estas bacterias es también particular. Las secuencias de ARNr no están relacionadas con las de las bacterias típicas, y los ARNt no tienen la parte común universal GT CG sino un análogo.

Se han descubierto nuevas coenzimas que no se encuentran en otros microorganismos excepto el cofactor F420 tales como, la coenzima M (ácido 2-mercaptoetanol sulfónico), la metanopterina, el factor F342, el FAF (formaldehyde activator factor), el factor CDR o metanofuran, el factor F430, etc.

Balch y col. (1979) propusieron una revisión importante de la taxonomía de las metanogénicas que constituía trece especies divididas en tres órdenes de cuatro familias y géneros. Actualmente estas tres órdenes comportan siete familias y veintiún géneros con más de setenta especies (García, 1983), (Tabla VII).

## **2.2. EL PAPEL DEL HIDROGENO EN LA DIGESTION ANAEROBIA**

El papel del hidrógeno se destaca principalmente a dos niveles, la acetogénesis y la metanogénesis a partir de acetato.

### **2.2.1. Hidrógeno y acetogénesis (Transferencia interespecies de hidrógeno)**

El concepto moderno de la digestión anaerobia en tres etapas, surge del descubrimiento que los ácidos grasos volátiles y el etanol son convertidos en acetato e hidrógeno, por un grupo especial de bacterias. Para que estas reacciones se realicen es necesario tener en el medio concentraciones muy bajas de hidrogeno. Bryant y col. (1967) demostraron que la bacteria *Methanobacillus omelianski* era una asociación sintrófica de dos bacterias, incapaz cada una de llevar a cabo la degradación del etanol. Una de ellas era una bacteria metanogénica hidrogenofílica, que convierte el hidrógeno y CO<sub>2</sub> en metano, y la otra era una bacteria nueva que oxida el etanol en acetato e hidrógeno. Esta clase de relación fisiológica, que implica un intercambio de hidrógeno entre un organismo quimioheterotrófico y una bacteria metanogénica u otro microorganismo utilizador de hidrógeno, que permite realizar algunas reacciones químicas que pueden ocurrir solamente a baja concentración de hidrógeno es llamada "**Transferencia interespecies de hidrógeno**". Las reacciones dependientes de este fenómeno se pueden clasificar en tres categorías:

**TABLA VII. Bacterias metanogénicas (García, 1983)**

---

**METANOBATERIALES**

**METHANOBACTERIACEAE**

<i>Methanobacterium</i>	<i>bryantii</i> <i>formicicum</i> <i>thermoautotrophicum</i>
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>arboriphilus</i> <i>ruminantium</i> <i>smithii</i>

**METHANOTHERMACEAE**

<i>Methanothermus</i>	<i>fervidus</i>
-----------------------	-----------------

**METHANOPLANACEAE**

<i>Methanoplanus</i>	<i>limicola</i>
----------------------	-----------------

**METANOCOCCALES**

**METHANOCOCCACEAE**

<i>Methanococcus</i>	<i>deltae</i> <i>maripaludis</i> <i>thermolithotrophicus</i> <i>vannielii</i> <i>voltae</i> <i>jannaschii</i>
----------------------	--

**METANOMICROBIALES**

**METHANOMICROBIACEAE**

<i>Methanomicrobium</i>	<i>mobile</i> <i>paynteri</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>cariaci</i> <i>marisnigri</i> <i>olentangyi</i> <i>thermophilicum</i> <i>tatii</i>
<i>Methanolobus</i>	<i>tindarius</i>
<i>Methanococcoides</i>	<i>methylutens</i>
<i>Methanospirillum</i>	<i>hungatei</i>

**METHANOSARCINEAE**

<i>Methanosarcina</i>	<i>acetivorans</i> <i>barkeri</i> TM1 <i>mazei</i>
<i>Methanotherix</i>	<i>soehngenii</i> sp. (thermophile)
<i>Methanoplasma</i>	<i>elizabethii</i>

---

La primera es relacionada con el catabolismo de pequeñas moléculas, tales como alcoholes, lactato, o formiato. Las bacterias que hacen estas reacciones pueden crecer con otros sustratos sin necesidad de una transferencia de hidrógeno, pero catabolizan alcoholes, lactato o formiato solamente cuando el hidrógeno es removido por asociación con bacterias consumidoras de hidrógeno, o cuando hay un aceptor de hidrógeno inorgánico (sulfato) u orgánico (fumarato). En ausencia de un receptor estas reacciones están inhibidas por la acumulación de hidrógeno.

La segunda categoría de reacciones se realiza con bacterias fermentativas que catabolizan carbohidratos simples o complejos. Estas bacterias crecen bien en ausencia de remoción de hidrógeno, produciéndolo o no, pero en presencia de bacterias consumidoras de hidrógeno (a menudo metanogénicas), incrementan su producción de hidrógeno y disminuyen la producción de metabolitos reducidos tales como, lactato, propionato, butirato y etanol para dar lugar a una producción de acetato mayor.

En la tercera clase de reacciones, la producción de hidrógeno es obligatoria, las bacterias de este grupo son sintróficas obligadas que requieren la presencia de bacterias consumidoras de hidrógeno. Las primeras degradan principalmente los ácidos grasos monocarboxílicos en acetato e hidrógeno y son llamadas OHPA (Bacterias acetogénicas obligadas productoras de hidrógeno).

### **2.2.2. Hidrógeno y metanogénesis a partir de acetato**

Mah en 1980, demostró que el hidrógeno inhibe la degradación del acetato por las bacterias acetoclásticas del género *Methanosarcina*. Este efecto se produce a diferentes grados, dependiendo de las especies. Por ejemplo *Methanosarcina thermofila* (ex TM-1) no puede utilizar el hidrógeno, pero el consumo del acetato se inhibe si hay hidrógeno en el medio. *Methanosarcina barkeri* 227 oxida el hidrógeno, pero la

utilización del acetato se logra solamente cuando el hidrógeno desaparece completamente del medio. Estudios recientes hechos por Lovley y Ferry (1985), Boone y col. (1987), demostraron que bacterias del género *Methanosarcina* cultivadas con acetato, producen pequeñas cantidades de hidrógeno 16-92 Pa, y que dentro de un rango de 2 a 810 Pa. (1% de la fase gaseosa), no causaba ninguna inhibición. Además demostraron que estas mismas bacterias alimentadas con  $H_2-CO_2$  e incubadas mas de 4 días después de la desaparición del hidrógeno no utilizaban el acetato, a condición de que se agregara una pequeña cantidad de hidrógeno al medio. Así se puede demostrar un doble efecto del hidrógeno, un efecto inhibitor a altas concentraciones y un efecto positivo a concentraciones bajas.

### **2.3. DIGESTION ANAEROBIA Y SULFATOS**

El sulfato es un factor que puede influir fuertemente en la metanogénesis. Su acción se presenta a dos niveles: competencia por los principales sustratos utilizados por las bacterias metanogénicas (acetato e hidrógeno), e inhibición de las bacterias acetoclásticas por la producción de sulfuros.

#### **2.3.1. Competencia por los sustratos metanogénicos:**

Numerosas bacterias sulfato reductoras (BSR), son capaces de reducir el sulfato utilizando el hidrógeno o acetato como fuente de electrones.

Bryant y col. (1977), demostraron que en un cultivo mixto de una bacteria sulfato-reductora y una bacteria metanogénica hidrogenofílica en presencia de sulfato, se produce una disminución estequiométrica en la producción de metano.

Schonheit y col. (1982), y Kristjansson y col. (1982), demostraron que la competencia se lleva a cabo cuando la concentración del sustrato es limitante y que no hay

limitación en sulfato. Es decir que en condiciones no limitantes de sulfato, las bacterias sulfato-reductoras ganan la competencia por tener una afinidad mayor a estos sustratos.

Lovley y col. (1982), plantearon que dada la afinidad de las bacterias BSR por el hidrógeno, en condiciones no limitantes de sulfato, estas bacterias mantienen una presión parcial de hidrógeno bajo un nivel mínimo necesario para la producción de metano. Este nivel es por lo menos 6 veces más alto que la presión parcial de hidrógeno en los sedimentos.

### **2.3.2. Sulfatos como fuente de sulfuros:**

El sulfato como tal, no es un inhibidor de la digestión anaerobia, pero los sulfuros provenientes de la sulfato-reducción, además de ser una fuente de azufre para las bacterias metanogénicas, pueden inhibir la reacción acetoclástica a partir de concentraciones determinadas.

Khan y col. (1978), demostraron que se necesita una concentración de 0.85 mM de sulfato para la producción de metano a partir de celulosa, pero a concentraciones de 1.75 mM se empieza a inhibir la metanogénesis y a una concentración de 10 mM la inhibición es total.

Guyot y col. (1985), encontraron que con un cultivo mixto de una bacteria sulfato-reductora utilizadora de propionato y *Methanosarcina barkeri* en presencia de sulfato y de propionato, el acetato producido podía ser utilizado por *M. barkeri* únicamente si había fierro en el medio, para precipitar el sulfuro producido. Sin fierro una concentración de 5 mM de sulfuro inhibía la metanogénesis.

Así se comprobó el papel importante del fierro y la inhibición directa de la acetogénesis por altos niveles de sulfuros solubles.

Por otra parte los sulfuros producidos mejoran las condiciones reducidas del medio ambiente, lo que representa

otro papel positivo de la adición limitada de sulfatos en ciertos procesos anaerobios.

#### 2.4. AMONIO Y DIGESTION ANAEROBIA

El ion amonio proveniente de los compuestos nitrogenados que se generan de la primera o segunda etapas de la digestión anaerobia pueden ser causa de inhibición de la metanogénesis debido al incremento de pH en los digestores anaerobios y a su acumulación.

Estudios anteriores han sugerido que la presencia de amoníaco ejercen una acción importante en el crecimiento de las bacterias hidrogenofílicas, siendo una causa de inhibición de la metanogénesis. Scriba (1985), demostró que a concentraciones de 1.5 y 3.0 g/l de amonio había inhibición de la metanogénesis. En 1987 Jarrel y Saulnier trabajando con cultivos puros de bacterias metanogénicas encontraron que la inhibición de la metanogénesis por amoníaco varía de acuerdo a la cepa estudiada, que trabajando con pH de 6.5 algunas cepas soportaban concentraciones de amoníaco hasta de 10 g/l. Naguib y col. (1988), demostraron que el catabolismo del acetato con la adición de  $\text{NH}_3$  presentaba una inhibición de tipo competitivo. Poggi y col. (1991), trabajando con lodos anaerobios de un digestor con acetato como fuente de carbono demostraron que se forman tres etapas en la inhibición de la flora metanogénica acetoclástica y en la producción de metano y que existe una inhibición total a partir de una concentración de 170 mg/l de amonio.

La forma ionizada es la menos tóxica y dado que en un digestor anaerobio el pH se mantiene en la neutralidad, esta es la forma que predomina.

## **2.5. DESCRIPCION DEL REACTOR ANAEROBIO DE LECHO DE LODOS CON FLUJO ASCENDENTE (UASB)**

En la última década, el tratamiento anaerobio de aguas residuales ha sido una tecnología aceptada para tratar aguas residuales, tanto domésticas como de una amplia variedad de industrias.

El desarrollo de esta tecnología ha dado lugar a tres generaciones de reactores (Noyola, 1990).

### **a) Reactores anaerobios de primera generación:**

La primera generación de reactores comprende aquellos procesos donde la biomasa se encuentra en suspensión, por lo que los tiempos de retención hidráulica son largos desde 4 hasta más de 30 días, lo que hace que los reactores sean de tamaño muy grandes.

### **b) Reactores anaerobios de segunda generación:**

En este tipo de reactores los microorganismos son retenidos en el reactor, ya sea por medio de soportes inertes para formar biopelículas o por medio de su sedimentación, lo que permite mantener altos tiempos de retención celular independientes del tiempo de residencia hidráulica, los cuales disminuyen a intervalos de 0.5 a 3 días.

### **c) Reactores anaerobios de tercera generación:**

Los reactores de tercera generación también retienen los microorganismos en forma de biopelícula, pero el soporte se expande o fluidiza con altas velocidades ascensionales y presentan tiempos de retención hidráulico menores a 12 horas.

Dentro del grupo de reactores de segunda generación se encuentra el reactor anaerobio de lecho de lodos y flujo ascendente UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (Fig. 2), desarrollado por Lettinga y col. (1980).

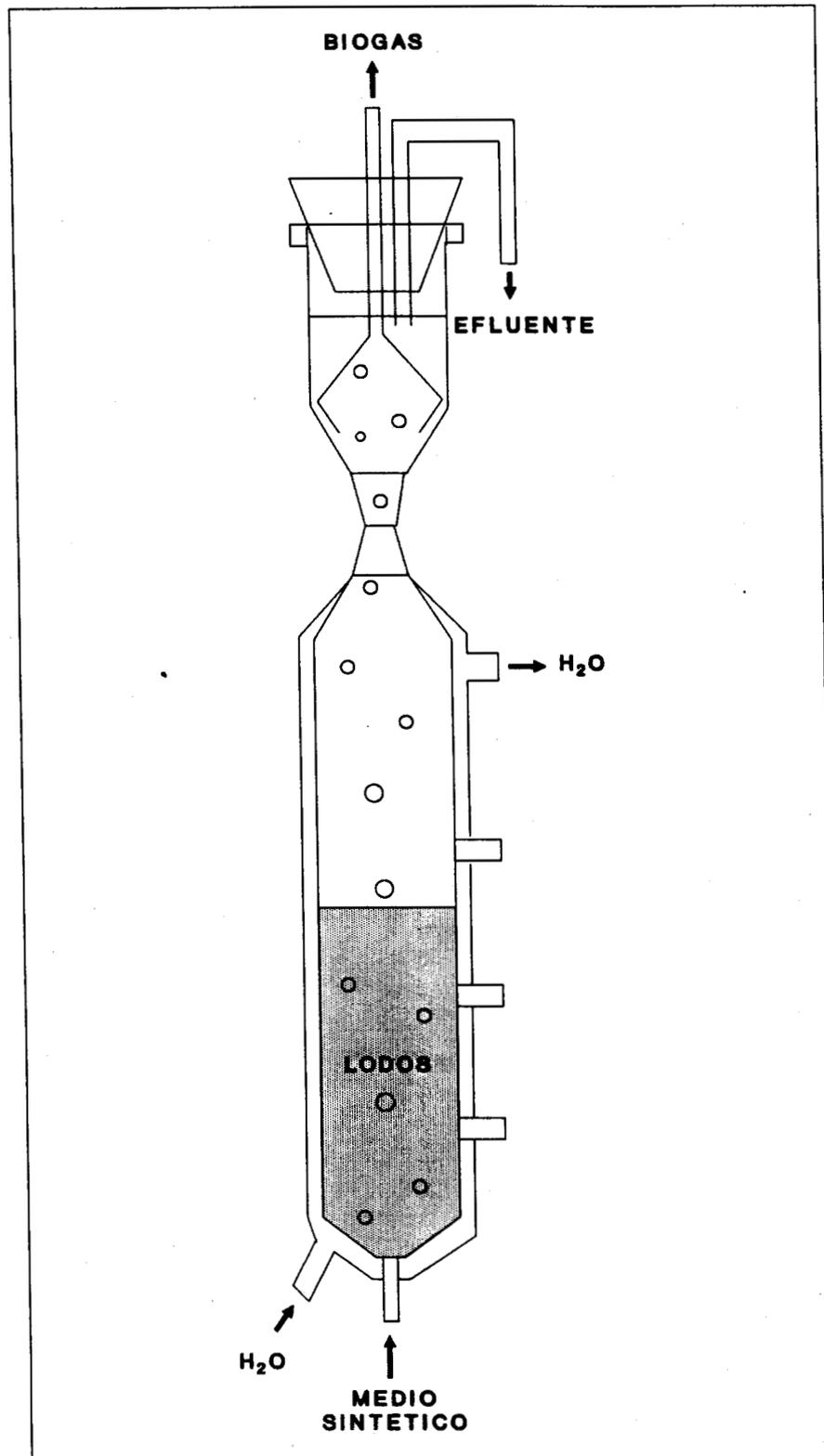


Fig. 2. Reactor UASB.

Este reactor opera con flujo ascendente, el cual ejerce una cierta selectividad sobre los microorganismos presentes y favorece así la formación de un lodo con buenas propiedades de floculación y sedimentación, dando como resultado una cama o lecho de lodos en la parte inferior del reactor. Por la parte superior contiene un separador de gas-líquido-sólido, el cual evita la salida de los sólidos suspendidos en el efluente y favorece la evacuación del gas y la decantación de los flóculos que eventualmente llegan a la parte superior (Noyola 1988). El agua residual a tratar es uniformemente distribuida en la base del reactor y pasa a través de la cama de lodos, la cual transforma la materia orgánica en biogas (mezcla de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ), que se evacúa por medio de colectores en la parte superior.

El aspecto fundamental del sistema UASB lo constituyen los lodos granulares indispensables para su correcto funcionamiento. La característica de estos gránulos es contar con una actividad metanogénica elevada, forma esférica y tiene alta capacidad de decantación lo que favorece un alto grado de retención en el reactor, con lo que se logran bajos tiempos de retención hidráulico con altos tiempos de retención celular (Lettinga y col., 1982). Lo anterior permite el tratamiento de aguas residuales con altas cargas orgánicas hasta de 40 KgDQO/ld en reactores de tamaño más pequeños.

## ***2. ANTECEDENTES***

## 2. ANTECEDENTES

La acetamida es un compuesto que tiene un peso molecular de 59.07 g/mol, un punto de fusión de 82° C, punto de ebullición de 221° C, es cristalino, sólido e incoloro, delicuescente en el aire húmedo e inodoro en estado puro. En virtud de su variada funcionalidad es muy estimada como disolvente, por lo que se utiliza en muchos procesos industriales tales como: disolvente de colorantes en la industria textil, fundentes de soldadura, antiácido en la industria de lacas, humectante de papel y tintorería, explosivos y cosméticos, materia prima en síntesis orgánica de medicamentos, etc.

Muy poca información se ha reportado sobre el daño ecológico que pueden ocasionar los nitrilos orgánicos y sus derivados, entre ellos las amidas. Las descargas directas de aguas residuales conteniendo estos compuestos pueden causar severos daños a la salud, ya que algunos de ellos son altamente tóxicos, y algunos mutagénicos y carcinógenos (Mohamed y col., 1989).

En particular para la acetamida se ha visto que una administración oral en ratas, forma tumores malignos en el hígado y debido a la liberación de amonio también es causa de la desnaturalización de las proteínas (Kirk-Otmer, 1978). Estudios realizados, demuestran que bajo condiciones aerobias de cultivo es posible degradar acetónitrilo y otros nitrilos a sus amidas correspondientes, por medio de la acción de dos enzimas: la nitrilo-hidratasa produciendo sus amidas correspondientes y la amidasa dando como productos principales ácido acético y amoniaco (Mohamed y col., 1989). Los estudios sobre las vías anaerobias de biodegradación de este producto aún no se han informado.

Existe evidencia experimental de que la acetamida ( $\text{CH}_3\text{-CONH}_2$ ), es transformada en gas bajo condiciones anaerobias, esto se provó en el laboratorio de microbiología ambiental

de esta Universidad, con dos lodos alimentados con acetamida desde hace algunos años.

En este trabajo de tesis nos preguntamos si había alguna forma de degradar la acetamida en anaerobiosis, con el fin de detoxificar y tratar efluentes que contengan este compuesto. Tomando en cuenta las reacciones que se llevan a cabo en digestión anaerobia, se plantearon varias hipótesis de degradación anaerobia de la acetamida:

#### **VIAS METANOGENICAS:**

(i) Metanación vía transferencias interespecies de hidrógeno, con la oxidación de la acetamida en acetotriilo más hidrógeno. En este caso no debía aparecer amonio en el medio.

(ii) Desamidación del compuesto en acetato más amonio, y transformación del acetato en metano.

(iii) Dado la semejanza estructural de la acetamida con el acetato y la capacidad que tienen algunas bacterias metanogénica acetoclásticas de utilizar el acetato y las metilaminas se planteó la hipótesis de la utilización directa de la acetamida por estas bacterias para producir metano.

#### **SULFATO-REDUCCION:**

(i) Utilización directa de la acetamida.

(ii) Utilización indirecta vía la formación de acetato.

Así este trabajo se enfocó en una primera etapa en determinar la secuencia de eventos que ocurren durante la degradación anaerobia de acetamida.

Por otra parte se estudió la degradación anaerobia de este compuesto en reactores de tipo UASB, para determinar la factibilidad del tratamiento de efluentes que contienen acetamida.

La acetamida es un compuesto interesante, y no tan fácil de manejar porque al degradarse puede liberar amonio, el cual al acumularse podría inhibir la metanogénesis.

## ***3. OBJETIVOS***

### 3. OBJETIVOS

3.1. Evaluar tres diferentes inóculos mixtos naturales en un medio de cultivo definido con acetamida como fuente de carbono, para:

3.1.1. Verificar bajo condiciones anaerobias de cultivo que los inóculos mixtos transforman la acetamida en metano en ausencia de sulfatos.

3.1.2. Verificar la degradación de este compuesto en condiciones sulfato-reductoras.

3.2. Evaluar la población microbiana presente en los lodos.

3.3. Estudiar el tratamiento anaerobio en un reactor UASB, de un medio sintético con acetamida como única fuente de carbono.

3.4. Estudiar la actividad de los lodos del reactor UASB, para compararla con las actividades de los otros lodos.

---

## ***4. MATERIAL Y METODOS***

## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1. ACTIVIDADES**

#### **4.1.1. Inóculo**

La idea de degradar a la acetamida por vía anaerobia surgió debido a la semejanza estructural que presenta este compuesto con el acetato (principal precursor del metano). Esta semejanza sugirió que un lodo con una población activa metanogénica puede degradar a la acetamida.

Para el siguiente estudio se trabajó con tres diferentes lodos los cuales se describen de la manera siguiente:

#### **4.1.2. Lodo del ingenio:**

Se colectaron de los sedimentos del neutralizador de un ingenio en Santa Clara en el Estado de Michoacán en 1987. Este lodo fue alimentado durante más de tres años con agua corriente y acetamida, con el fin de mantener activa la población microbiana. El lodo fue mantenido en una botella de suero de 500 ml con tapón de hule y aguja para la salida del biogas. La temperatura fué de 35° C y un pH cercano a 7. Al cabo de este tiempo se realizó un ensayo preliminar en botellas serológicas para comprobar que la acetamida era degradada a metano. Unos meses antes de iniciar el estudio, la alimentación se hizo cada semana, y con un medio de cultivo para bacterias metanogénicas (Balch y Wolfe, 1976), y con una concentración constante de acetamida de 10 mM. Una noche antes de iniciar los cultivos el lodo se dejó bajo un vacío de 20 mmHg, para eliminar el metano y otros gases disueltos. Se determinaron los sólidos suspendidos volátiles de este lodo, para calcular la cantidad de inóculo que se debía utilizar en las cinéticas.

#### **4.1.3. Lodo de los sedimentos:**

Se colectaron de los sedimentos de un efluente de Río Blanco en Orizaba, Veracruz, cercano a una fábrica de papel en 1987. Debido a que en las fábricas de papel utilizan los sulfatos se supuso que en este lodo existían bacterias sulfato-reductoras, por lo que se decidió alimentarlo con sulfato de sodio y con acetamida. Como el lodo del ingenio, este lodo fue alimentado con concentraciones variables de acetamida y sulfato de sodio durante más de tres años. El olor característico del sulfuro de sodio nos indicó la presencia de bacterias sulfato-reductoras. Se alimentaron con el mismo medio de cultivo que el lodo anterior y con 20 mM de sulfato de sodio. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para el lodo del ingenio.

#### **4.1.4. Lodo de IMEXA:**

Se colectaron de una planta de tratamiento anaerobio de las aguas residuales de una industria (IMEXA) que produce levaduras en el Estado de Puebla. Este lodo fue adaptado dos semanas antes del estudio con 10 mM de acetamida bajo las mismas condiciones de operación que los lodos anteriores. Este lodo se utilizó para determinar cinéticas de degradación de acetamida, a diferentes concentraciones.

#### **4.1.5. Sustrato**

El sustrato utilizado fué acetamida grado reactivo marca J.T. BAKER. Se preparó una solución patrón concentrada en tubos de Hungate con 10 ml de agua hervida bajo nitrógeno. Dentro de la cámara anaerobia la acetamida se adicionó a los tubos.

Para los cultivos con el lodo del ingenio, el cultivo se inició con una concentración de acetamida en el medio de 10

mM. Para el lodo de los sedimentos se utilizó acetamida 10 mM más 20 mM de sulfato de sodio.

Para el cultivo con el lodo de IMEXA las concentraciones de acetamida fueron: 4.24, 12.71, 25.42, 50.85, 76.3, 101.7 y 169 mM.

La solución de acetamida se esterilizó a 20 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### 4.1.6. Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo basal se describe en la tabla siguiente y está basado en el medio descrito por Balch y Wolfe (1976).

**TABLA VIII. MEDIO DE CULTIVO (por litro)**

---

Solución mineral 1	50.0 ml
Solución mineral 2	50.0 ml
Solución de oligoelementos	10.0 ml
Solución de vitaminas	10.0 ml
Solución de cloruro de níquel(0.005%)	10.0 ml
Solución de sulfato ferroso (2.5%)	1.0 ml
Solución de resarsurina (0.1%)	1.0 ml
Peptona de caseína	0.1 g
Extracto de levadura	0.1 g
Bicarbonato de sodio	2.0 g
Cisteína	0.5 g

---

(Ver anexo).

Se mezclan todos los componentes, excepto la cisteína. Se pone a ebullición bajo atmósfera de nitrógeno para remover todo el oxígeno presente, que es cuando la resarsurina cambia de azul a rosa, el medio se enfría bajo nitrógeno, y se le agrega la cisteína para una mejor reducción. El matraz se tapa con un tapón de hule y se introduce dentro de la

cámara anaerobia, a cada botella se le agrega 16 ml de medio, y se tapan. Fuera de la cámara se colocan sellos de aluminio y a cada una de las botellas se le cambia la atmósfera por una corriente de  $N_2-CO_2$ , (80-20%), durante 2 minutos. Para los medios con sulfato de sodio el medio basal no lleva bicarbonato. El pH del medio se ajusta a 9 con hidróxido de sodio antes de la ebullición y el cambio de atmósfera después de llenar las botellas se hace únicamente con nitrógeno, durante 2 minutos, para desplazar todo el hidrógeno que estuviera presente proveniente de la cámara al llenar las botellas.

Todos los medios se esterilizaron a 20 lb/in, durante 15 minutos.

#### **4.1.7. Cinética de los cultivos:**

El plan experimental fué el siguiente:

Las cinéticas de los cultivos se realizaron en botellas de suero de 60 ml, las cuales contenían 16 ml de medio de cultivo estéril.

Se realizaron las cinéticas de los cultivos con lodos del ingenio y de los sedimentos. Se hicieron controles con lodos esterilizados para asegurar que la acetamida fuera degradada por los microorganismos y no abióticamente, y controles con lodos activos sin sustrato.

Se realizaron cinéticas con los lodos del ingenio y de los sedimentos con y sin fuente nitrogenada (amonio).

Se realizaron también cinéticas con lodos de IMEXA con fuente nitrogenada, variando la concentración de acetamida.

#### **4.1.8. Inoculación:**

Los lodos después de una noche al vacío, se introdujeron a la cámara anaerobia, con los diferentes medios de cultivo y el material necesario para la inoculación, cada una de las botellas fué inoculada con 4 ml de lodo por medio de

jeringas estériles. Después de la inoculación los cultivos se sacaron de la cámara, se sellaron con tapón de aluminio y bajo condiciones estériles y flujo de nitrógeno se adicionó a las botellas que no contenían sulfato 0.2 ml de sulfuro de sodio (solución de sulfuro de sodio 2.5% estéril). De la misma manera se adicionaron a todas las botellas 0.4 ml de acetamida a las concentraciones calculadas para cada experimento, utilizando cuatro botellas para cada experimento (dos para muestra líquida y dos para las muestras de gas). A partir de la adición del sustrato se contabilizó el tiempo cero. Las botellas fueron incubadas a 35° C. Las dos botellas que servían para determinar metano se incubaron invertidas para evitar alguna fuga del gas.

#### **4.1.9. Toma de muestras**

Para la determinación de acetato, acetamida, amonio y sulfuros, se tomaron a cada intervalo de tiempo un ml de muestra en viales de 1.5 ml, se centrifugaron durante 20 minutos a 13,000 RPM, y el sobrenadante se separó en tres viales de 250  $\mu$ l. Para la determinación cromatográficas se le agregó a las muestras 30  $\mu$ l de ácido fórmico concentrado (99% de pureza), con el fin de parar la fermentación y lograr una mejor resolución en los análisis. Finalmente, las muestras fueron congeladas hasta la realización del análisis.

#### **4.1.10. Análisis químicos:**

Se realizó una curva estándar con 4 diferentes concentraciones de acetamida y acetato, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.999 para acetamida y un coeficiente de correlación de 0.996 para acetato (Ver anexo).

La acetamida y el acetato, se determinaron por cromatografía de gases con un cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 5890,

con detector de ionización de flama, una columna capilar Superox II FFA de una longitud de 10 m y un diámetro de 0.53 mm, con temperatura programada de 120-170° C a una temperatura del detector de 120° C, temperatura del inyector de 130° C, el gas acarreador fué nitrógeno a una velocidad de 4 ml/min. El volumen de inyección fué de 0.4 µl.

El metano se determinó por cromatografía de gases, con un cromatógrafo GOW-MAC, con detector de conductividad térmica, una columna de acero inoxidable empacada con Carbosphere, con una longitud de 2 m. La temperatura de la columna fué de 140° C, la del detector fué de 160° C, y la del inyector de 150° C. La corriente en el detector fué de 150 mA, el gas acarreador fué helio con una velocidad de 45 ml/min. El volumen de inyección fué de 50 µl. La estandarización del método se realizó con 9 concentraciones de metano, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.997 (Ver anexo).

El amonio se determinó por colorimetría, mediante la técnica de Nessler (Rodier, 1978), obteniendo las concentraciones de una curva estándar elaborada con cloruro de amonio con 8 concentraciones diferentes, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.996 (Ver anexo).

Se determinaron sulfuros disueltos y precipitados en el medio, por colorimetría mediante la técnica de Ralf Cord-Ruwisch (1985). Las concentraciones se obtuvieron de una curva estándar de sulfuro de sodio con 6 concentraciones diferentes, obteniéndose una correlación de 0.993 (Ver anexo).

#### **4.2. CUANTIFICACION DE LA MICROFLORA**

Con el propósito de cuantificar los diferentes grupos involucrados en la degradación anaerobia de acetamida, se decidió hacer cuantificaciones de éstos. La numeración de la microflora se llevó a cabo por la técnica del Número Más

Probable (NMP), (García y col., 1982), utilizando 5 tubos por dilución.

#### 4.2.1. Preparación de los cultivos:

Para cuantificar la microflora existente en cada uno de los lodos se trabajó con el medio de cultivo de Balch y Wolfe (1976), y utilizando acetato, acetamida, e hidrógeno como sustrato (acetato y acetamida en una concentración de 1 g/l, y para los cultivos con hidrógeno se cambia la atmósfera durante dos minutos cada semana). Se hicieron 10 diluciones por cada inóculo ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ). El medio para las diluciones fue el mismo que el descrito anteriormente. Las diluciones se prepararon dentro de la cámara anaerobia, posteriormente y bajo condiciones estériles y anaerobias con flujo de nitrógeno se procede a inocular, con 0.2 ml de cada una de las diluciones, 5 tubos por dilución. Después de la inoculación los cultivos fueron incubados a 35° C durante tres semanas. Pasado el tiempo de crecimiento se determinó la presencia de metano por cromatografía de gases en cada uno de los tubos.

#### 4.2.2. Análisis de metano:

Se determinó metano cualitativamente por cromatografía de gases con un cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 1580, con detector de ionización de flama, columna capilar de superox FFA de 10 m, temperatura de columna de 125° C, temperatura del detector de 120° C y la del inyector de 130° C, utilizando nitrógeno como gas acarreador con una velocidad de 4 ml/min. El volumen de inyección fué de 50  $\mu$ l.

La cuantificación de cada tipo microbiano se hizo por la ayuda de las tablas de Mac Grady (NMP) (García y col., 1982).

#### 4.3. REACTORES UASB

Se trabajó primero con un reactor UASB de 1.75 l, el cual fué alimentado por un medio sintético con diferentes concentraciones de acetamida, el cual se describe en la tabla siguiente:

TABLA IX. MEDIO DE CULTIVO (mg/l)

NaHCO <sub>3</sub>	600.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	130.00
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200.00
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10.00
ZnCl <sub>2</sub>	1.00
CoCl <sub>2</sub>	1.00
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub>	0.20
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.10
CuCl <sub>2</sub>	0.05

(Khan y col., 1979).

Durante dos semanas se mantuvo el reactor en lote para una mejor adaptación del inóculo al sustrato. El lodo empleado para inocular el reactor fue lodo de IMEXA, el cual ya tenía algún tiempo de adaptación al sustrato. El volumen de lodo inoculado en el reactor fue de 500 ml. Después de las dos semanas, el reactor fué operado en continuo con un tiempo de retención hidráulica de 4 días, durante 30 días con una carga orgánica de 3.38 KgDQO/m<sup>3</sup>·d con una concentración de 10 g/l de acetamida en el medio de alimentación. Posteriormente se cambió el tiempo de retención a 3 días,

con 5 g/l de acetamida en el medio de alimentación con el fin de disminuir la carga a  $1.4 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ , ya que a una carga mayor no se observó remoción. Se continuó operando el reactor durante 15 días más, pero ante los malos resultados se optó por vaciar este reactor y cambiar el lodo a otro reactor de 1.25 l (Fig. 2), para operar en nuevas condiciones. El medio de alimentación se esterilizó para evitar su contaminación, y se ajustó a un pH de 6.5, y se mantuvo en agitación constante. Esta vez se decidió operar el reactor en lote con el fin de establecer el tiempo de retención y la carga orgánica. A partir de la curva de desaparición de la acetamida se empezó a operar en continuo con un tiempo de retención de 4 días y con una carga orgánica de  $0.875 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ . Después de 35 días tiempo en cual el sistema se encontraba estabilizado, se cambió el tiempo de retención a 3 días con una carga orgánica de  $1.13 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ . Al inicio del experimento se añadió directamente al lodo 1.0 g/l de glucosa y de sulfato ferroso para lograr mejores condiciones iniciales de reducción.

#### 4.3.1. Análisis:

Las determinaciones de acetamida, acetato y metano se hicieron por cromatografía de la misma forma que para los estudios anteriores.

Toma de biogas: la colección del biogas se hacía por medio de una botella serológica de 60 ml en forma invertida con solución salina saturada para no disolver los gases producidos, la cual se conectaba a la parte superior del reactor por medio de una manguera y la solución salina era desplazada por medio de una aguja. Esta toma de biogas se realizaba todos los días durante tres horas aproximadamente, de esta botella se tomaban  $50 \mu\text{l}$  de la fase gaseosa por medio de una jeringa. Las determinaciones de la demanda química de oxígeno soluble y total (DQO), pH, alcalinidad, sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) y

potencial redox se hicieron de acuerdo al STANDARD METHODS (APHA, 1989). Las muestras para DQO se tomaban todos los días, para los demás análisis cada tercer día.

El amonio se determinó por la técnica colorimétrica de Nessler.

Cuando el sistema se encontraba de nuevo estabilizado se tomaron muestra de los lodos y se les determinó su actividad para compararla con las actividades encontradas en los lodos estudiados anteriormente. La determinación se hizo de manera similar.

# ***5. RESULTADOS Y DISCUSION***

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. ACTIVIDADES

#### 5.1.1. Cinéticas con el lodo del ingenio

La prueba con el lodo esterilizado (Fig. 37) se realizó para comprobar si la degradación de la acetamida se llevaba a cabo por los microorganismos o era abiótica. Los resultados de este cultivo indicaron la presencia constante de acetamida, acetato y amonio, es decir no hubo degradación de acetamida ya que el promedio de 5 determinaciones a lo largo del experimento nos dio un promedio de 12.12 mM y una desviación estándar de 1.23 para acetamida; la presencia de acetato y amonio se deben al residual en el lodo y la concentración también fué constante presentando una media de 0.21 mM y una desviación estándar de 0 para acetato, una media de 10.84 mM y una desviación estándar de 0.26 para amonio. Con estos resultados se pudo comprobar que no había degradación abiótica de la acetamida. La concentración de SST de este lodo fué de 26.12 g/l, los SSV fué de 13.8 g/l, el porcentaje de SSV fué de 52.8% y los SSV por botella fué de 2.76 g/l.

La figura 3 muestra el cultivo del control sin sustrato y como podemos observar, hay producción de amonio y metano los cuales provienen probablemente de la autólisis bacteriana, ya que la cantidad de acetamida residual no fué considerable.

La figura 4 muestra la degradación de la acetamida para el lodo del ingenio con nitrógeno. Se puede ver que la acetamida desaparece aproximadamente a las 50 horas. Mientras desaparece la acetamida vemos una producción de acetato, amonio y metano, y como se puede observar la producción de amonio es superior a la del control, el valor obtenido es superior a la que se esperaría de la hidrólisis de la acetamida, lo anterior podría ser consecuencia de la

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos control del ingenio)**

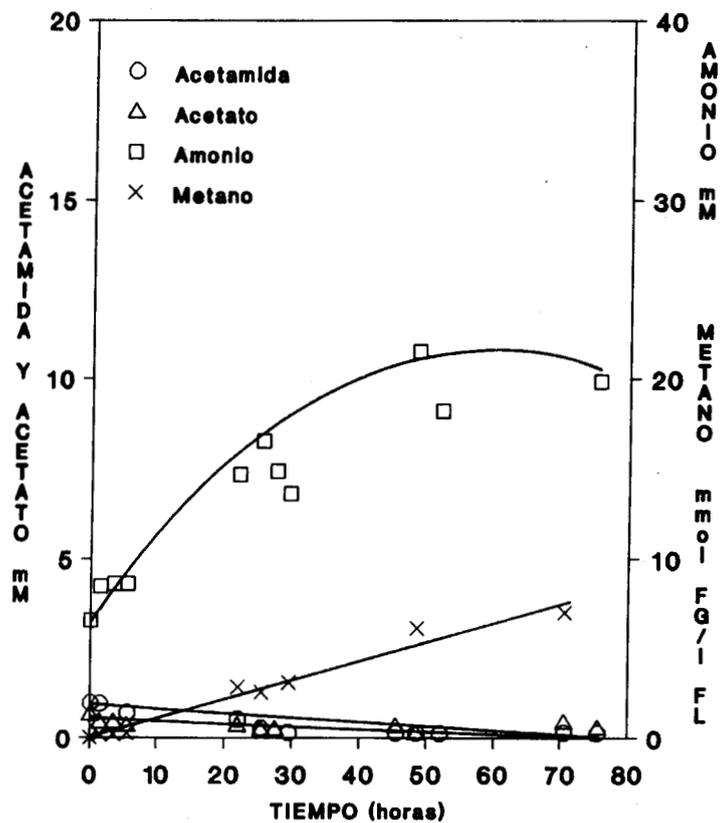


Fig. 3

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos del ingenio con nitrogeno)**

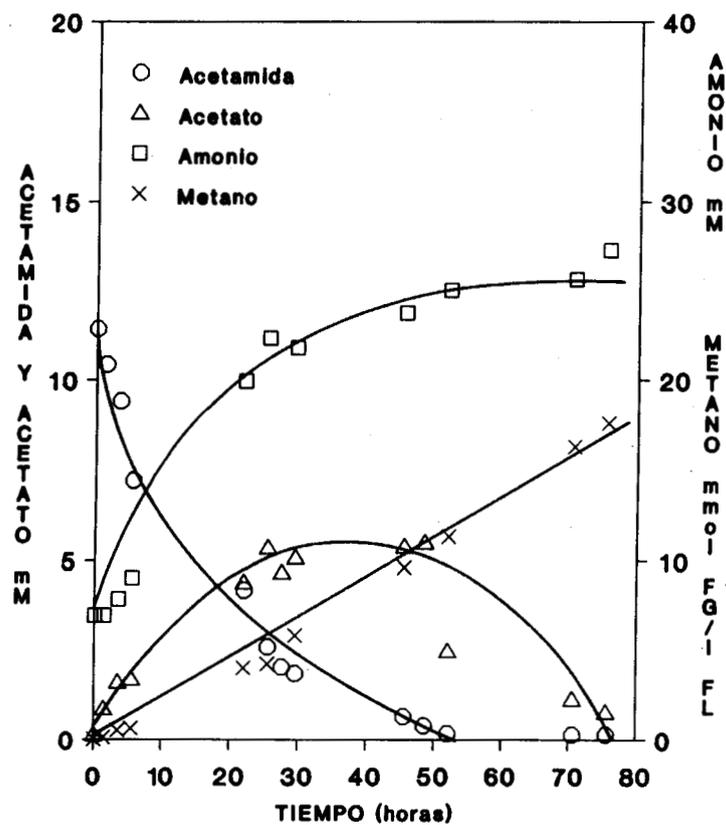


Fig. 4

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos del ingenio sin nitrógeno)

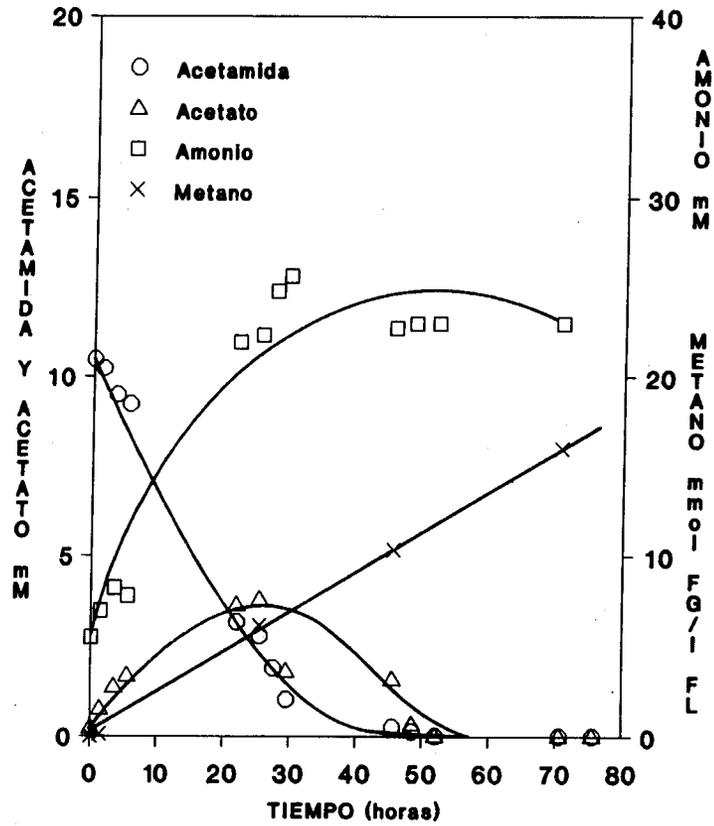


Fig. 5

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Control lodos de sedimentos)

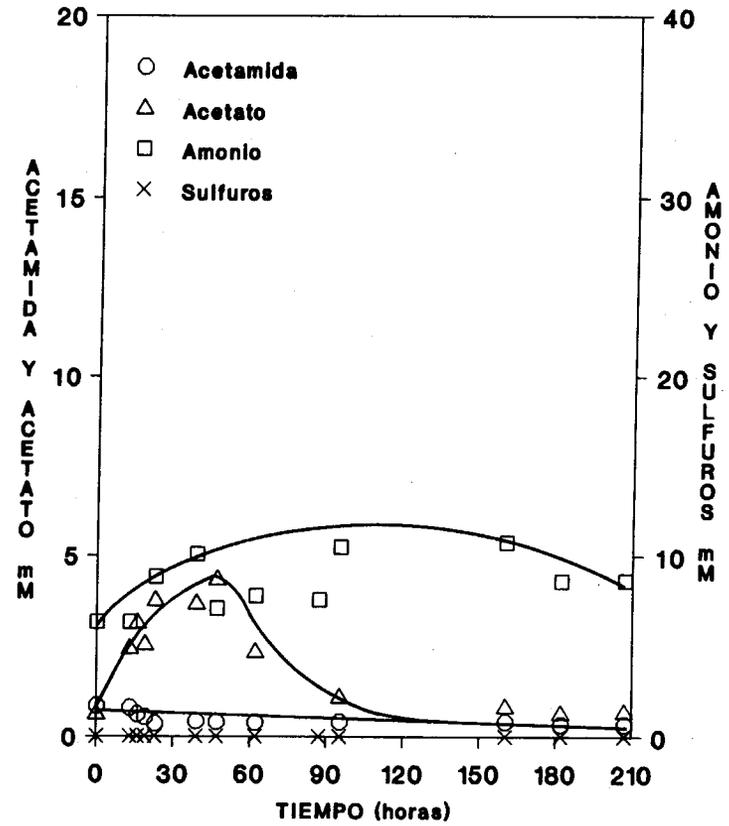


Fig. 6

autólisis de la microflora aerobia, presentes en las botellas de enriquecimiento, dado que a este nivel no se llevó a cabo una anaerobiosis estricta. Se preparó el medio de enriquecimiento bajo anaerobiosis, pero la atmósfera durante la incubación fué aire, dado que el medio no fué agitado, pudo haberse formado una zona anóxica en el fondo de la botella y una zona superficial en donde se llevó a cabo el consumo de oxígeno, resultado de la difusión del oxígeno del aire en el líquido. Parte del metano producido como lo indica el control proviene de las sustancias endógenas del lodo, pero la diferencia del control y las muestras, demuestran claramente que la presencia de metano es debida a la degradación de la acetamida. Las observaciones microscópicas con epifluorescencia de estos lodos nos demostraron la presencia de numerosas bacterias metanogénicas.

La figura 5 nos muestra los resultados del lodo sin fuente nitrogenada, se puede ver que los resultados son muy similares a los del experimento con nitrógeno. Se puede pensar que la acetamida sirve también como fuente de nitrógeno, para estos microorganismos.

En la tabla X se presentan los resultados de las velocidades de degradación de acetamida y las actividades específicas, estas actividades específicas son mucho más bajas que las actividades reportadas (Guyot y col., 1988) para otros tipos de sustratos. Como se puede ver las actividades específicas para los cultivos con nitrógeno son muy similares a los cultivos sin fuente nitrogenada. Por microscopio con dispositivo de epifluorescencia se detectaron en estos lodos bacterias metanogénicas del género *Methanosarcina*, las cuales presentan muy poca afinidad por el acetato (menor a 5 mM), y tienen además tiempos de generación muy lentos (30 horas). La acumulación intermediaria de acetato, durante la cinética indica que estas bacterias están saturadas por este producto.

**TABLA X**  
**VELOCIDADES DE DEGRADACION Y ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LOS**  
**DIFERENTES LODOS ESTUDIADOS EN LA DEGRADACION ANAEROBIA DE**  
**ACETAMIDA**

Lodos	Acetamida		Metano	
	V (mmol/l/h)	Asp (mmol/gSSV/h)	V (mmol/l/h)	Asp (mmol/gSSV/h)
<b>Ingenio</b>				
sin N	0.3235	0.1100	0.2300	0.0833
con N	0.3036	0.1168	0.2400	0.0869
<b>Sedimentos</b>				
sin N	0.0330	0.0067		
con N	0.0460	0.0094		
<b>IMEXA</b>				
con N*	0.5500	0.2291		
con N**	1.3500	0.5136	0.3700	0.1400

\* Cinética a diferentes concentraciones.

\*\* Reactor de laboratorio de 1.25 l.

Con estas pruebas comprobamos que la acetamida puede ser transformada anaerobicamente en metano, vía la producción de acetato, sin embargo a pesar del tiempo tan largo de adaptación del inóculo durante el enriquecimiento, en condiciones parecidas al lodo del ingenio (sin establecer condiciones estrictas de anaerobiosis), no se obtuvo una actividad alta de transformación de la acetamida en acetato. Este lodo es potencialmente un inóculo para reactores anaerobios, pero haría falta incrementar las actividades microbianas por medio de mejores condiciones de cultivo, para que sea eficiente.

### 5.1.2. Cinética con el lodo de los sedimentos

126938

La prueba con el lodo esterilizado (Fig. 38) demostró como en el caso anterior, que la degradación de la acetamida no es llevada a cabo en forma abiótica. Se inició con una concentración de acetamida de 10 mM, es posible que la cantidad faltante de acetamida en el tiempo inicial se encuentre absorbida en los lodos, dado que para todas las cinéticas se encontró siempre un valor menor que el adicionado inicialmente, lo mismo que el caso anterior, de las 5 determinaciones realizadas, se obtuvo una media de 8.8 mM y una desviación estándar de 0.32 para la acetamida, una media de 0.72 mM y una desviación estándar de 0.041 para acetato y una media de 6.03 mM y una desviación estándar de 0.12 para amonio. La presencia de amonio y acetato provienen como residuo del lodo, no hubo degradación de acetamida y no hubo formación de metano. La concentración de SST de este lodo fue de 27.75 g/l, los SSV fue de 24.64 g/l, el porcentaje de SSV fue de 88.8% y los SSV por botella fue de 4.92 g/l.

La figura 6 muestra los perfiles del control del lodo de los sedimentos, los cuales no contienen sustrato. En este control hay una producción de amonio y de acetato que resulta de la autólisis de la biomasa, pero el acetato es de nuevo utilizado por la microflora que no fué afectada por la autólisis. La producción de amonio sufrió una depresión entre las 60 y 90 horas de incubación, que puede explicarse como un reuso de este producto por las bacterias utilizadoras de acetato, por lo que la presencia de amonio en el medio resulta de un balance entre su producción y su consumo.

En los cultivos suplementados con amonio, (Fig. 7) se observó durante las 140 primeras horas de incubación una producción de acetato hasta niveles similares a los del control, desaparece la acetamida y aumenta la producción de amonio. En esta etapa no se detecta formación de sulfuros

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos de sedimentos con nitrógeno)

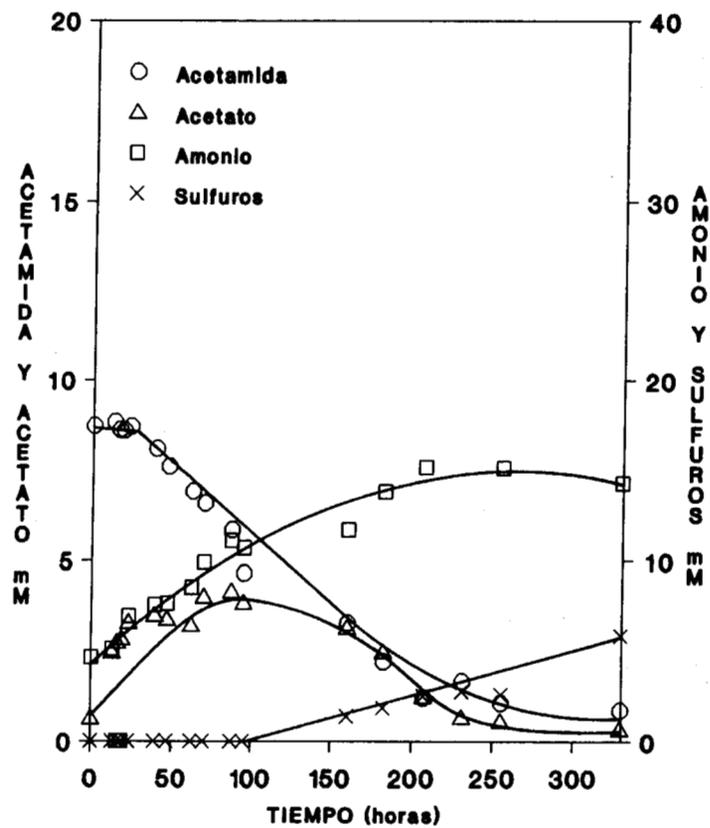


Fig. 7

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos de sedimentos sin nitrógeno)

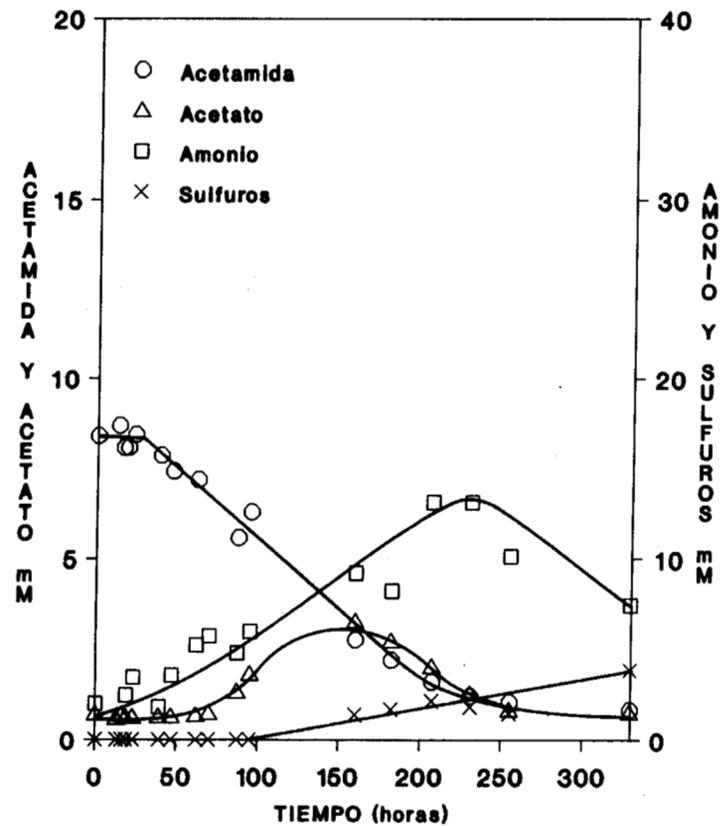


Fig. 8

por lo que la degradación de la acetamida y la producción de amonio no parecen estar ligadas al fenómeno de sulfato reducción. Este fenómeno de sulfato-reducción se inicia aproximadamente a las 160 horas al iniciarse la desaparición del acetato acumulado. Por medio de estos resultados se puede decir que la acetamida no es utilizada por el fenómeno de sulfato reducción, sino que sufre primero una etapa de desaminación para producir acetato y en una segunda etapa este acetato es utilizado por las bacterias sulfato reductoras.

En el caso de los cultivos sin nitrógeno, (Fig. 8), el fenómeno que presenta es similar al anterior. Durante las 89 horas de incubación no se registra una producción tan fuerte de acetato y no hay sulfuros, lo que se podría pensar que hay otro mecanismo de utilización de acetato tal como lo hemos visto en el control sin acetamida.

Para los datos de la figura 8 se puede proponer una vía alterna de acetato, que no podemos determinar en base a estos resultados. A las 160 horas empiezan aparecer los sulfuros que corresponden a la segunda etapa de la degradación del acetato por sulfato reducción. Los dos experimentos anteriores muestran un período de retardo de 30 horas de degradación de acetamida siendo ésta 5 veces más larga que para el lodo del ingenio. En la tabla X se presentan los resultados de las velocidades máximas de degradación de acetamida y sus actividades específicas, para las cinéticas de este lodo.

Las actividades específicas para el lodo de los sedimentos es mucho más baja que para el lodo del ingenio y la presencia o ausencia de amonio no parece afectarla. Debido a esta actividad tan baja este lodo no puede considerarse un buen inóculo para reactores anaerobios, pero podemos constatar que en un medio natural, existe la posibilidad de detoxificar a la acetamida por anaerobiosis por medio de su transformación en acetato.

### 5.1.3. Cinéticas con el lodo de IMEXA

Con el objeto de saber si un lodo ya adaptado en un digestor anaerobio que trata efluentes de una planta productora de levadura tenía la capacidad de degradar la acetamida, se hicieron pruebas cinéticas, pensando utilizar este lodo para inocular reactores de laboratorio, para tratar un efluente sintético con acetamida.

Se estudió la degradación de la acetamida a 7 diferentes concentraciones, con el fin de determinar la afinidad de este lodo por este sustrato (Figs. 9-13). La concentración de SST de estos lodos fue de 26.23 g/l, los SSV fue de 12 g/l, el porcentaje de SSV fue de 45.7% y los SSV por botella fue de 2.4 g/l.

Se analizó únicamente la fase líquida. Se confirmó la presencia de metano al final del estudio

La figura 9 nos presenta la cinética del control, se puede apreciar que existía 3.2 mM de acetamida residual por lo que hay formación de acetato y amonio. La razón por la que existe acetamida es que este lodo fue aclimatado con acetamida dos semanas antes del experimento.

La figura 10 presenta la cinética a una concentración de 4.24 mM. El amonio se produce desde el inicio, sin embargo después de las 120 horas empieza a consumirse, esto puede explicarse ya que los microorganismos del inóculo pueden utilizarlo como fuente de nitrógeno. La curva de producción de acetato caracteriza la aparición de éste como producto intermediario.

Para concentraciones mayores (Figs. 11-16), el perfil de las curvas de acetamida y amonio es similar a las anteriores, pero se ve que hay una acumulación del acetato, esta acumulación de acetato indica que las bacterias acetoclásticas se encuentran saturadas.

En la figura 17 se muestran las curvas de degradación de acetamida para todas las concentraciones estudiadas. Por

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos control IMEXA)**

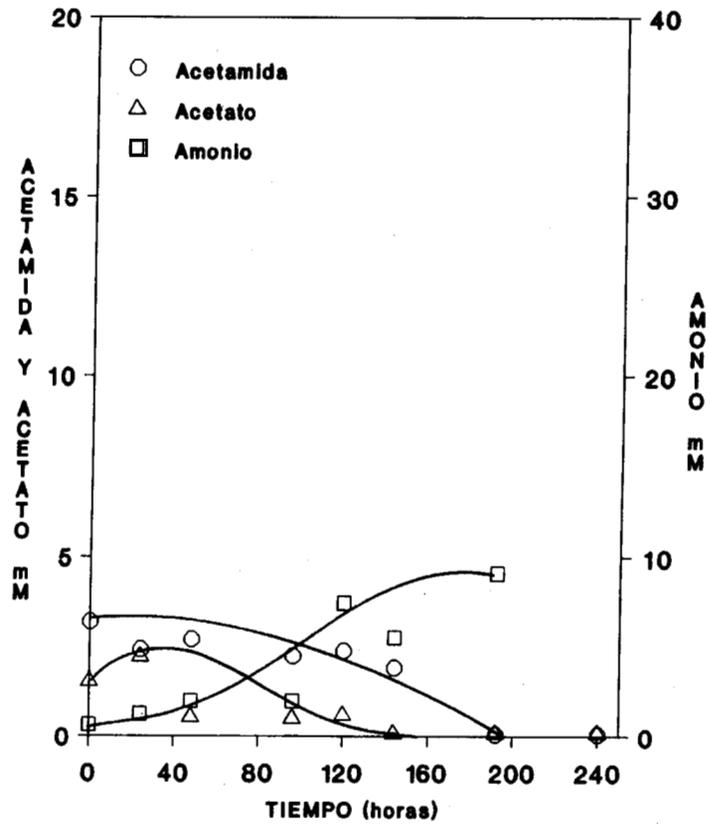


Fig. 9

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos IMEXA 4.24 mM)**

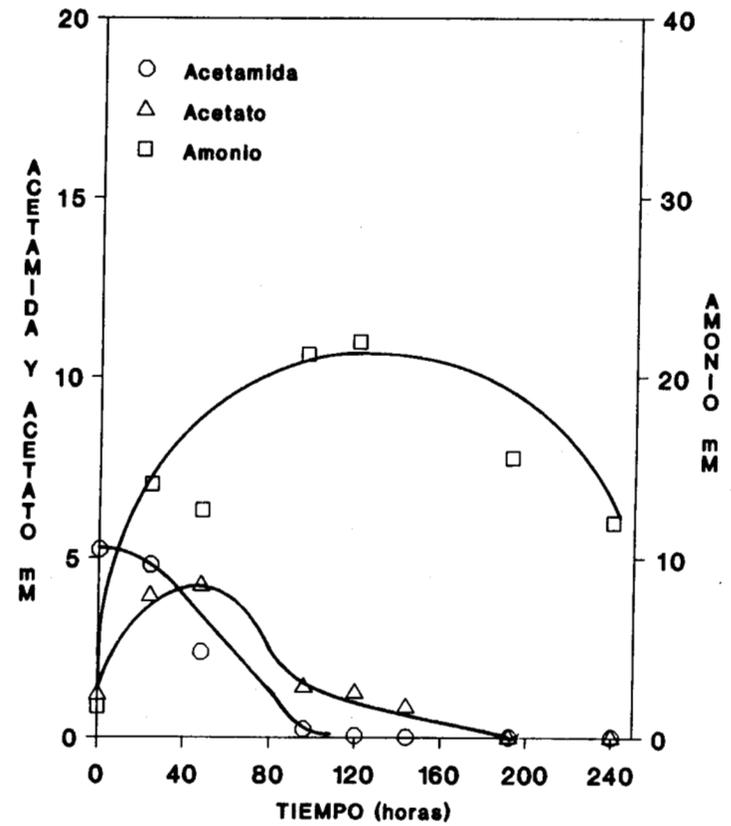


Fig. 10

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos IMEXA 12.71 mM)**

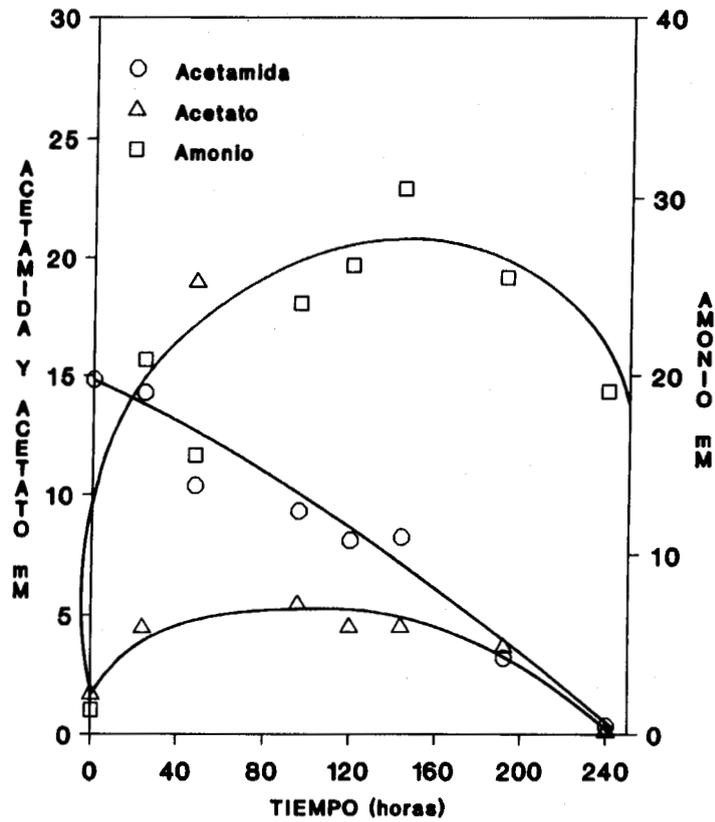


Fig. 11

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos IMEXA 25.42 mM)**

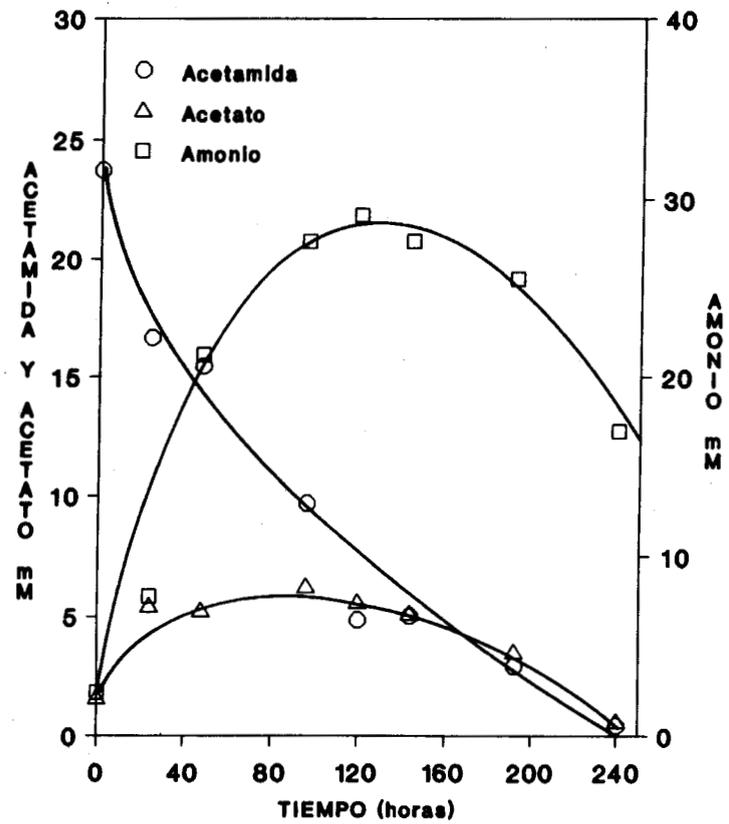


Fig. 12

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos IMEXA 50.85 mM)**

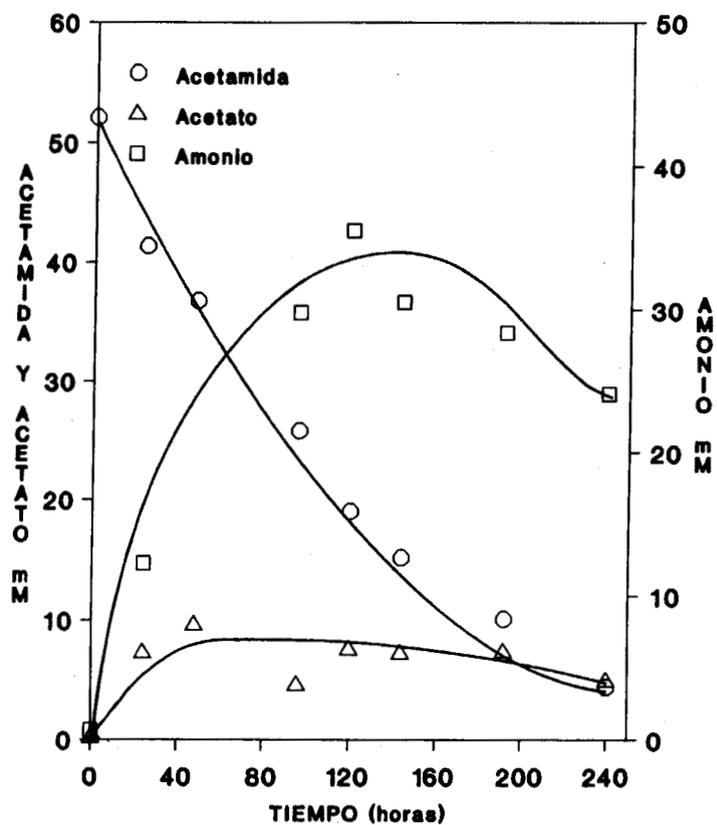


Fig. 13

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
(Lodos IMEXA 76.27 mM)**

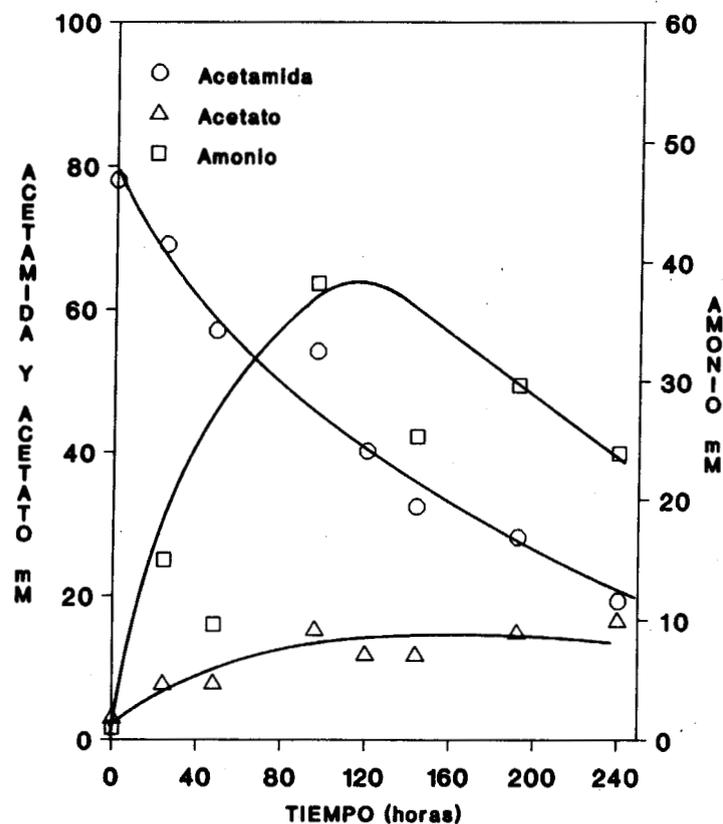


Fig. 14

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos IMEXA 101.69 mM)

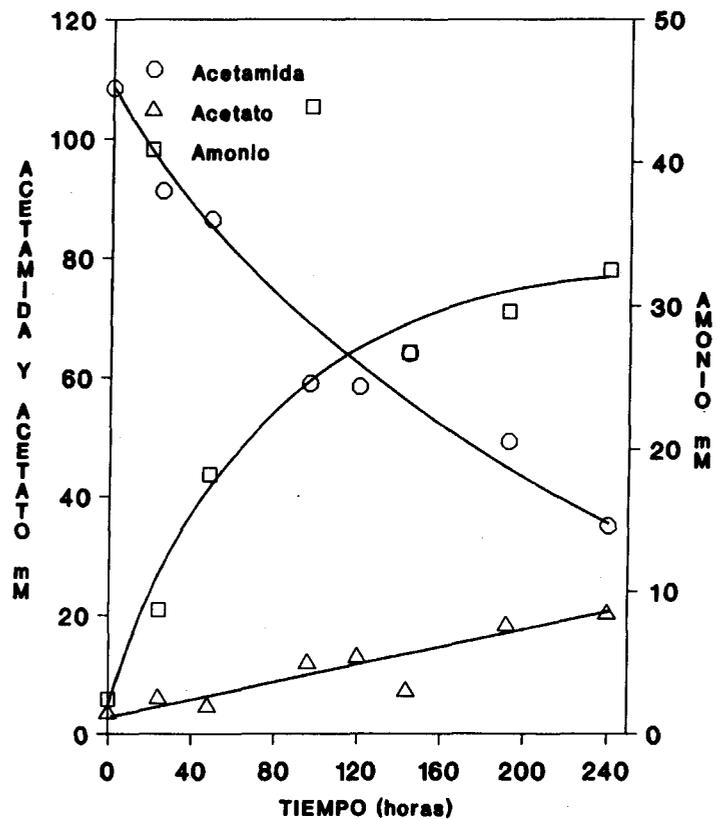


Fig. 15

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos IMEXA 169 mM)

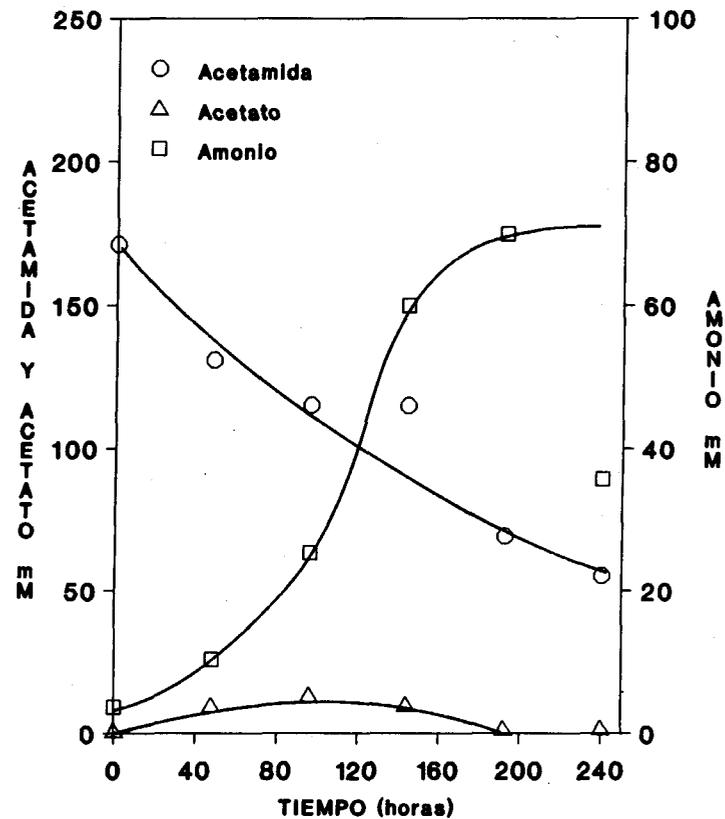


Fig. 16

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**

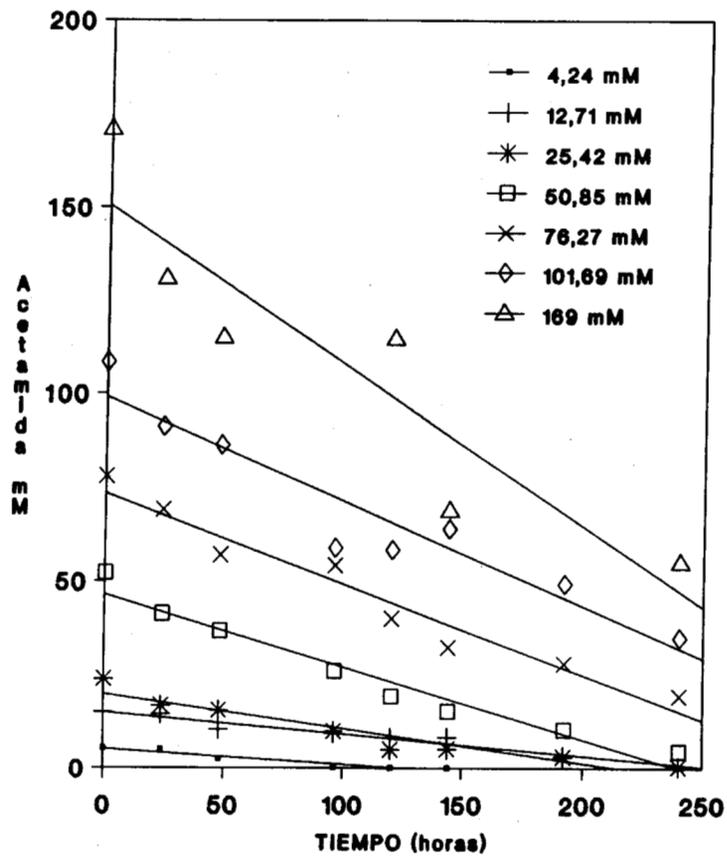


Fig. 17

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
Curva de progreso**

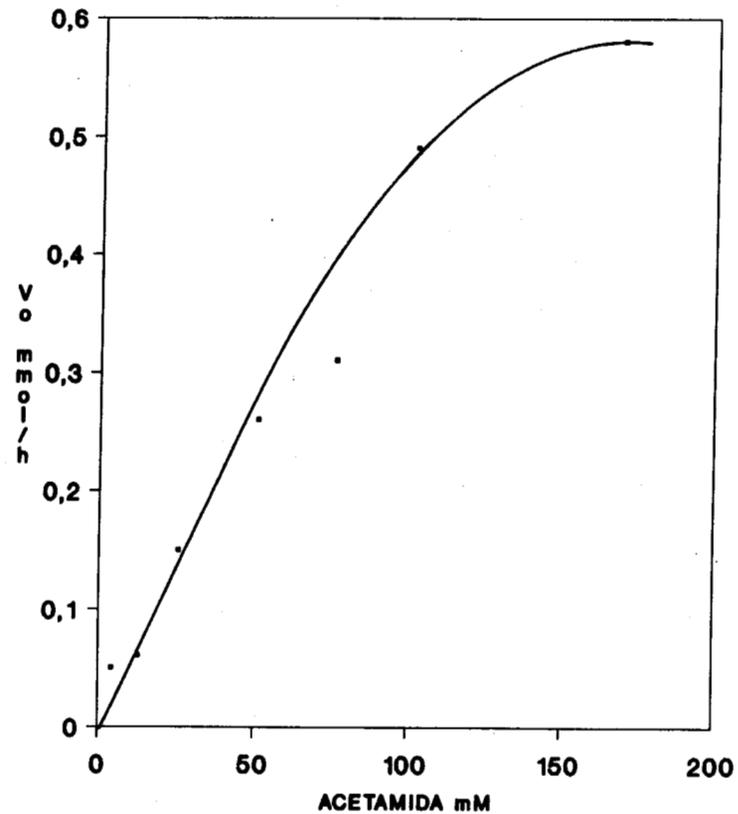


Fig. 18

medio de las pendientes se determinaron las velocidades iniciales de degradación.

En la figura 18, a partir de los datos anteriores se generó la curva de progreso ( $V_i = f[\text{acetamida}]$ ).

A partir de estos datos se generó la figura 19 utilizando la representación de Lineweaver-Burk. Se obtuvo una  $V_{\text{máx}}$  de 0.55 mmol/l/h y una  $K_s$  de 115.5 mM, este valor tan alto de  $K_s$  indica poca afinidad por el sustrato lo cuál confirma la baja actividad microbiana presente en los lodos estudiados anteriormente (Tabla X).

## 5.2. CUANTIFICACION DE LA MICROFLORA

La tabla XI nos muestra los resultados de la cuantificación de los diferentes grupos microbianos presentes en cada uno de los lodos estudiados.

Los lodos del ingenio y los sedimentos presentan numerosas bacterias hidrogenofílicas cuya presencia es difícil de explicar. Parte del acetato pudo ser transformado en hidrógeno y bióxido de carbono y este hidrógeno se utilizó por las bacterias hidrogenofílicas.

Para el caso del lodo de IMEXA, la presencia de bacterias hidrogenofílicas es menor que para los otros dos lodos, pero su presencia puede ser explicada de la misma forma que para los lodos anteriores.

En los lodos del ingenio y de IMEXA se encontró una cantidad equivalente de metanogénicas acetoclásticas, en mayor cantidad que las metanogénicas hidrogenofílicas.

El número de bacterias que utilizaron la acetamida es mayor en el lodo del ingenio. Sin embargo se detectaron en todos los lodos. Así se comprobó la presencia de las bacterias involucradas en la degradación de la acetamida.

CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
Gráfica de Lineweaver-Burk

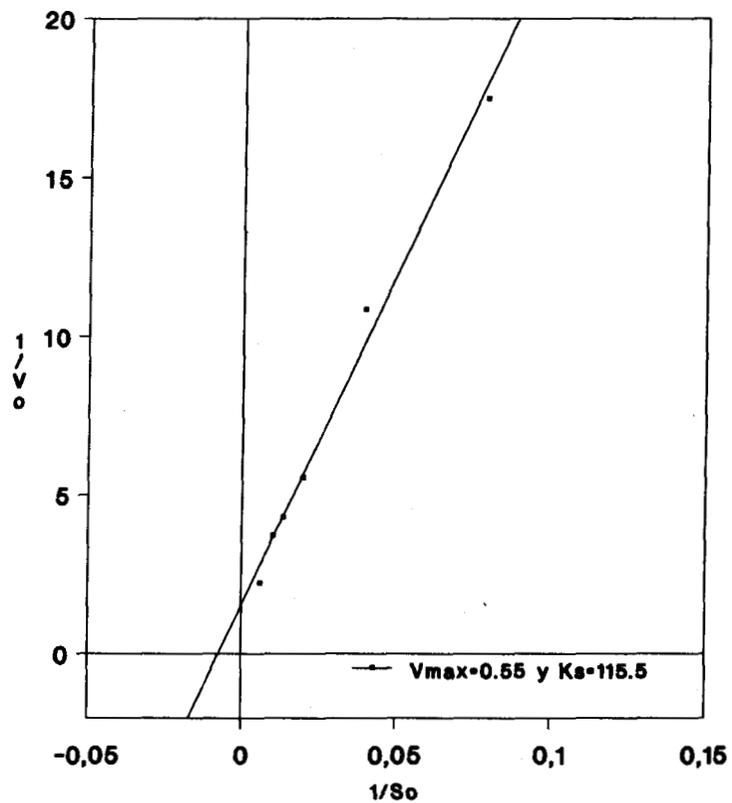


Fig. 19

CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DE LA DQO

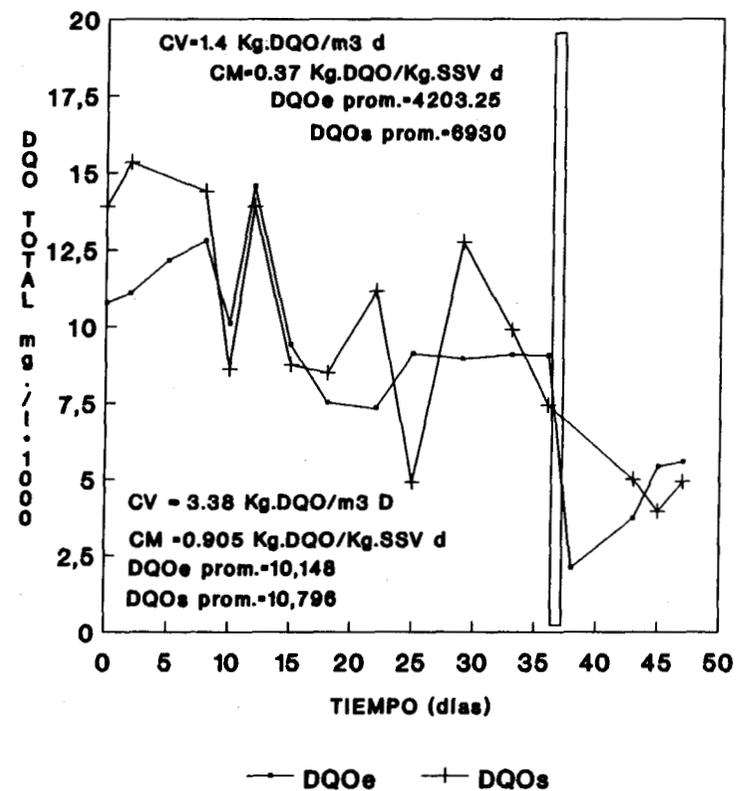


Fig. 20 Reactor UASB de 1.75 l

**TABLA XI**  
**CUANTIFICACION DE LOS DIVERSOS GRUPOS BACTERIANOS EN LOS**  
**DIFERENTES LODOS ESTUDIADOS**

GRUPO BACTERIANO	L O D O S		
	Ingenio	Sedimentos	IMEXA
BMA*	$2.5 \times 10^9$		$4.96 \times 10^9$
BMH*	$4.3 \times 10^8$		$6.3 \times 10^7$
BDA*	$9.0 \times 10^9$		$6.5 \times 10^8$
BSR*		$1.6 \times 10^8$	

\* BMA = bacterias metanogénicas acetoclásticas.

\* BMH = bacterias metanogénicas hidrogenofilicas.

\* BDA = bacterias degradadoras de acetamida.

\* BSR = bacterias sulfato-reductoras con acetamida.

### 5.3. REACTORES UASB

#### 5.3.1. Reactor UASB de 1.75 l

Las figuras 20 a 25 nos presentan los resultados de este primer reactor, operando a dos diferentes cargas volumétricas ( $Cv_1 = 3.4 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$  y  $TRH = 4$  días,  $Cv_2 = 1.4 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$  y  $TRH = 3$  días).

En la figura 20 vemos que no hay remoción de DQO.

La contaminación del medio de alimentación, debido al mal funcionamiento del cuarto de refrigeración, el cual se encontraba a  $15^\circ \text{C}$ , provocó variaciones del pH de entrada y de la concentración de DQO en el medio (Fig. 23).

Con el fin de aminorar el elevado pH del lodo, se optó por eliminar el bicarbonato de sodio del medio a los 25 días de operación, ya que los microorganismos del lodo son muy sensibles a los cambios de pH, así como disminuir el pH

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DEL pH**

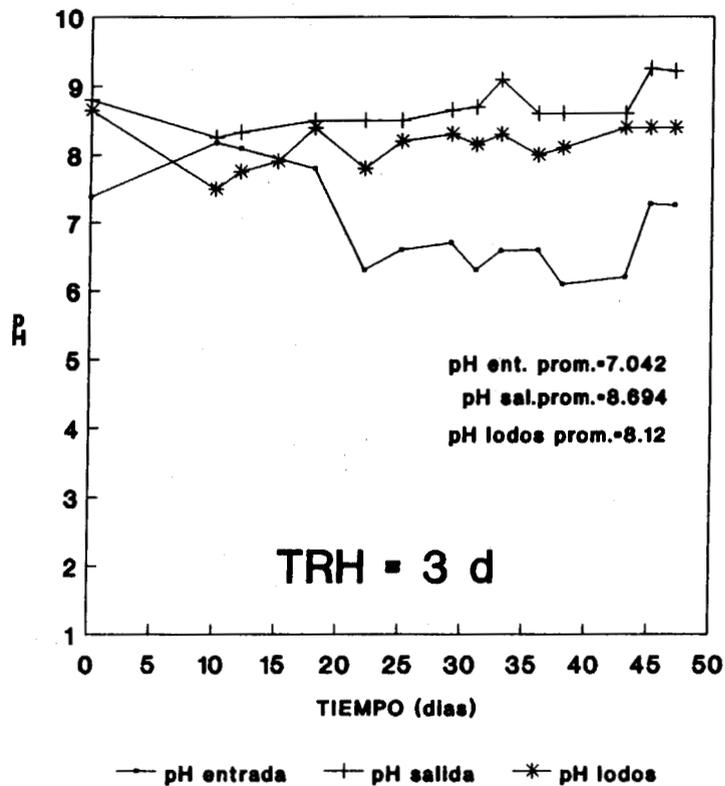


Fig. 21 Reactor UASB de 1.75 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DEL REDOX**

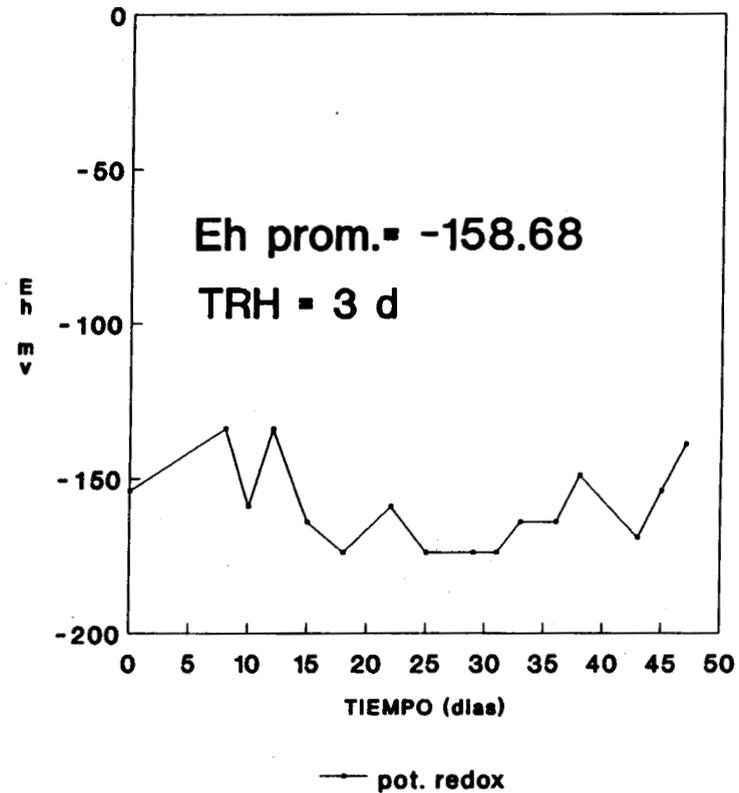


Fig. 22 Reactor UASB de 1.75 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
ACETAMIDA/ACETATO**

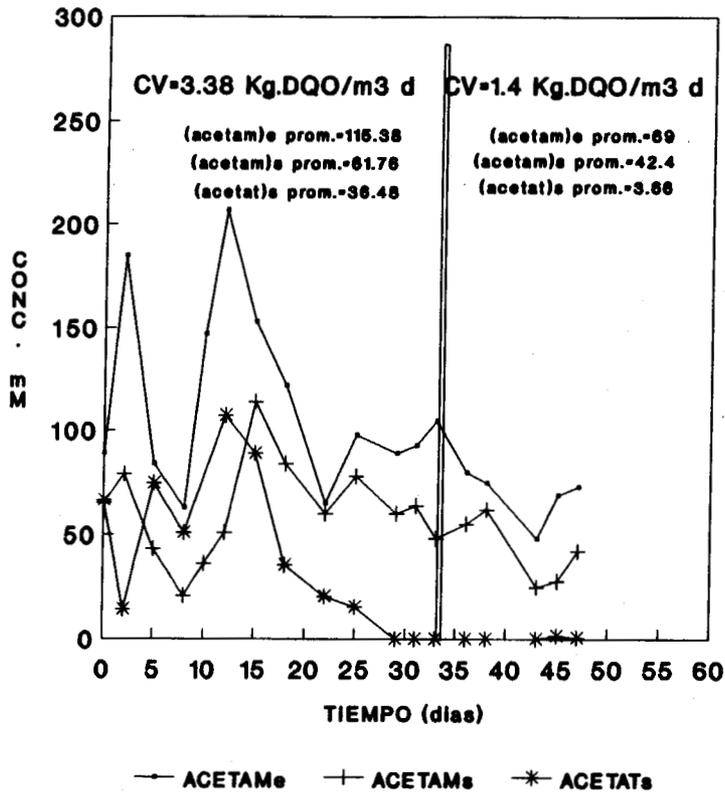


Fig. 23 Reactor UASB de 1.75 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DE LA ALCALINIDAD**

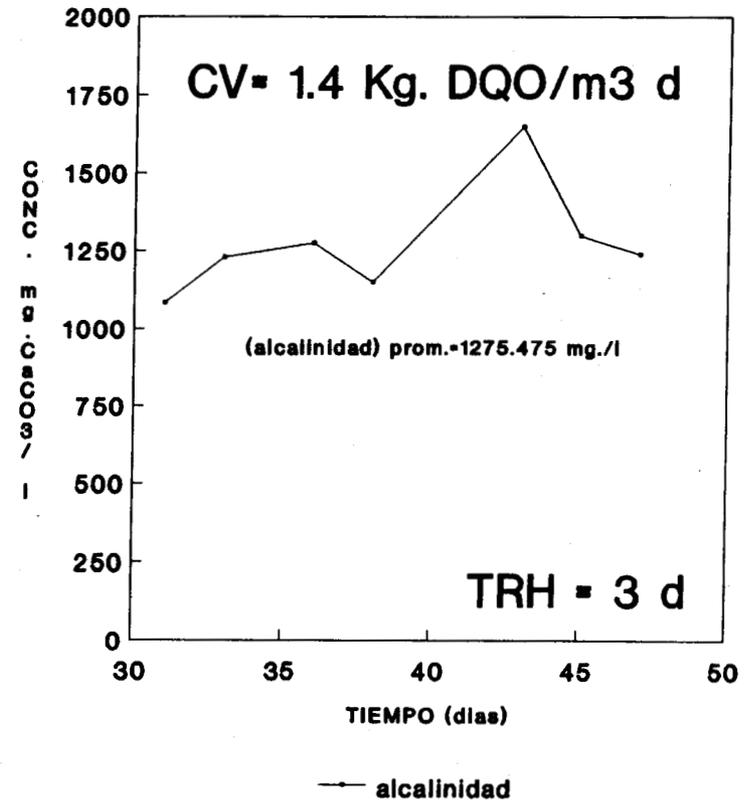


Fig. 24 Reactor de 1.75 l

final del mismo al momento de prepararlo. Con esta medida también se atacó el problema de la precipitación del sulfato ferroso. La eliminación del bicarbonato de la alimentación no influenció a la alcalinidad a la salida del reactor (Fig. 24).

La figura 25 nos muestra los perfiles de acetamida y acetato del efluente comparándolos con la producción de amonio, de donde se ve que ésta se eleva hasta un valor máximo a los 10 días para después disminuir al final de esta etapa. El amonio presente en la salida resulta: (i) de la transformación de la acetamida en acetato, pero este fenómeno es menor dado que hubo poca transformación de acetamida (Figs. 23-25), (ii) del amonio presente en la alimentación y (iii) del amonio resultado de la autólisis microbiana.

Durante la aplicación de la carga de  $3.4 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ , la acumulación de acetato en el reactor puede explicarse por las malas condiciones de conservación del medio de alimentación, pero con este lodo ya anaerobio, el acetato se hubiera utilizado. Observamos en la Figura 25 que el acetato se acumula paralelamente a la acumulación del amonio entre los días 0 y 15. Al bajar el amonio igualmente disminuye el acetato para desaparecer a partir del día 30. Durante la operación con una carga de  $1.4 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$  (Fig. 25), el nivel del amonio se quedó estable e inferior a lo obtenido en la etapa anterior, no se detectó acetato; sin duda la acumulación de amonio hasta cierto nivel (por arriba de 100 mM), pudo haber afectado la degradación del acetato. La inhibición de la metanogénesis por el amonio es un fenómeno conocido, también se sabe que las metanogénicas pueden adaptarse progresivamente a altas concentraciones de amonio, pero se requiere del tiempo necesario. Debido a los resultados anteriores, se decidió disminuir la carga orgánica hasta  $1.4 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ , bajando la concentración de acetamida en la alimentación. En estas condiciones se aplicó un TRH de 3 días. Los resultados obtenidos tampoco fueron

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
CONCENTRACIONES EN EL EFLUENTE**

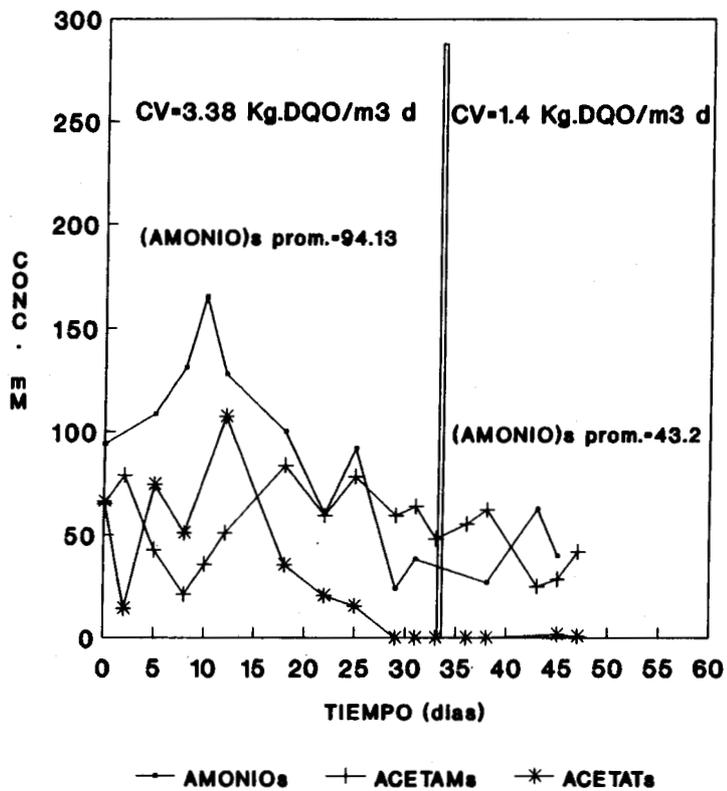


Fig. 25 Reactor UASB de 1.75 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
REMOCION DE LA DQO**

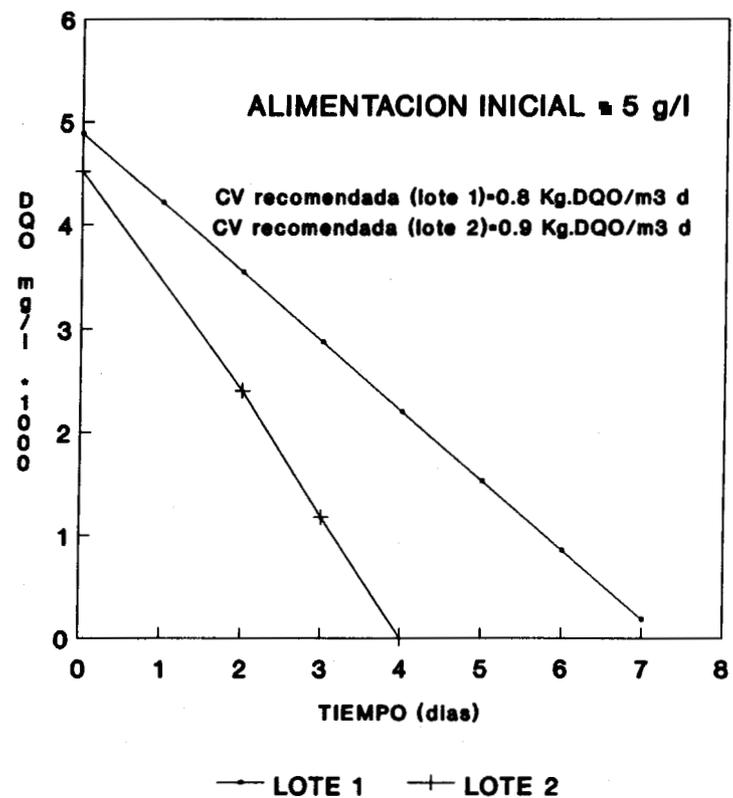


Fig. 26 Reactor UASB de 1.25 l

satisfactorios. A pesar de que los lodos estuvieron anteriormente adaptados en un digestor anaerobio que trata los efluentes de una industria que produce levaduras, no fue posible lograr una remoción satisfactoria en ninguna de las dos cargas probadas.

### 5.3.2. Reactor UASB de 1.25 l

Tomando en cuenta los resultados del reactor anterior se decidió reiniciar el experimento controlando de manera más estricta las condiciones de operación con el mismo lodo.

En la figura 26 se presentan los resultados de dos experimentos en cultivo por lote en un reactor de 1.25 l con una concentración de acetamida inicial de 5 g/l. Estos perfiles cinéticos obtenidos nos permitió determinar las velocidades de degradación de la acetamida en el reactor: 0.8 y 0.9 KgDQO/m<sup>3</sup>·d, respectivamente. Lo que indica que la carga volumétrica no debe ser superior a estos valores.

La operación en continuo del reactor se inició con una alimentación de 3.4 g/l de acetamida a pH controlado y a un TRH de 4 días. Durante 35 días de operación a un TRH de 4 días la carga volumétrica promedio fué de 0.875 KgDQO/m<sup>3</sup>·d, monitoriéndose los siguientes parámetros: DQO soluble, DQO total, amonio, alcalinidad, acetamida/acetato, biogas (% de metano), SST/SSV, pH y Eh.

En la figura 27 se presentan los resultados de la evolución de la DQO a lo largo de experimento, la DQO promedio de entrada fué de 3.481 g/l, y la DQO promedio de salida fué de 0.146 g/l para la fracción soluble. La eficiencia de remoción en promedio fué de 96.18% para la DQO soluble y de 73.32% para la total (Fig. 28). La diferencia encontrada entre estas dos mediciones se debió a un lavado de los lodos en la salida (Fig. 29). Esta vez se logró una buena eficiencia de remoción de DQO, indicando que con el experimento anterior no se tenían las condiciones adecuadas de operación.

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DE LA DQO**

CV prom.- 0.875 y 1.13 Kg. DQO/m3 d

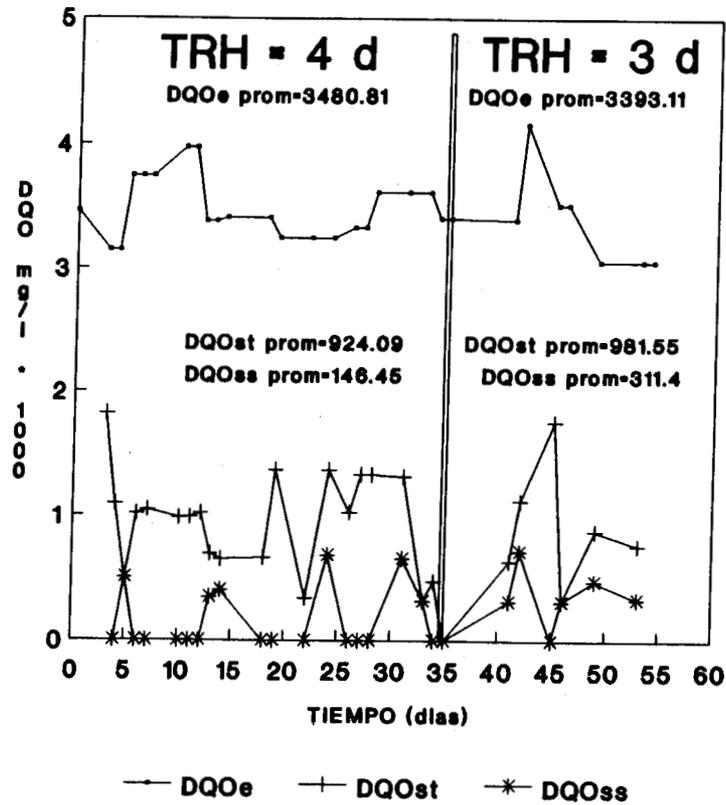


Fig. 27 Reactor UASB de 1.25 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
REMOCION DE LA DQO**

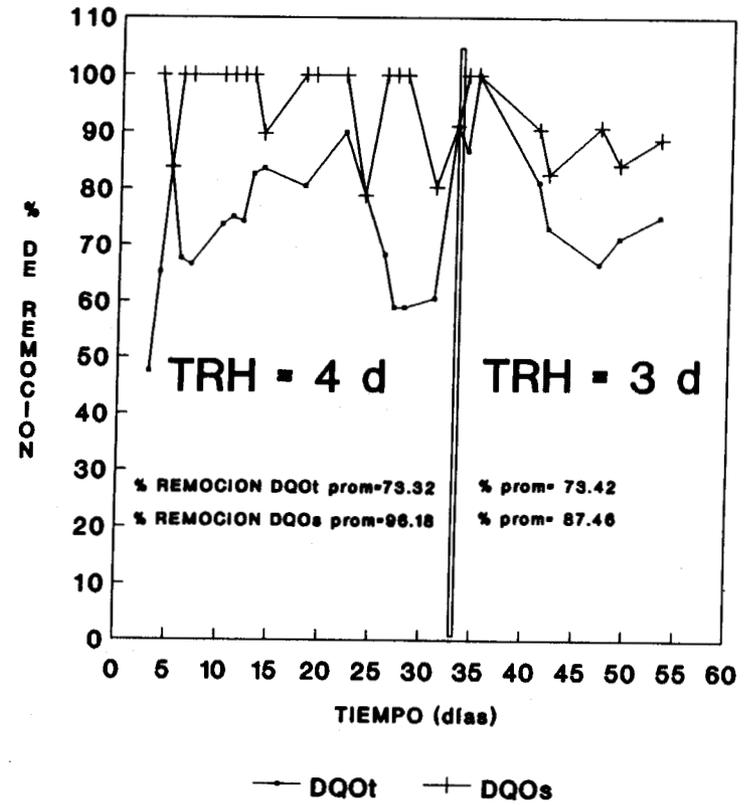


Fig. 28 Reactor UASB de 1.25 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
CONCENTRACION DE SOLIDOS EN EL EFLUENTE**

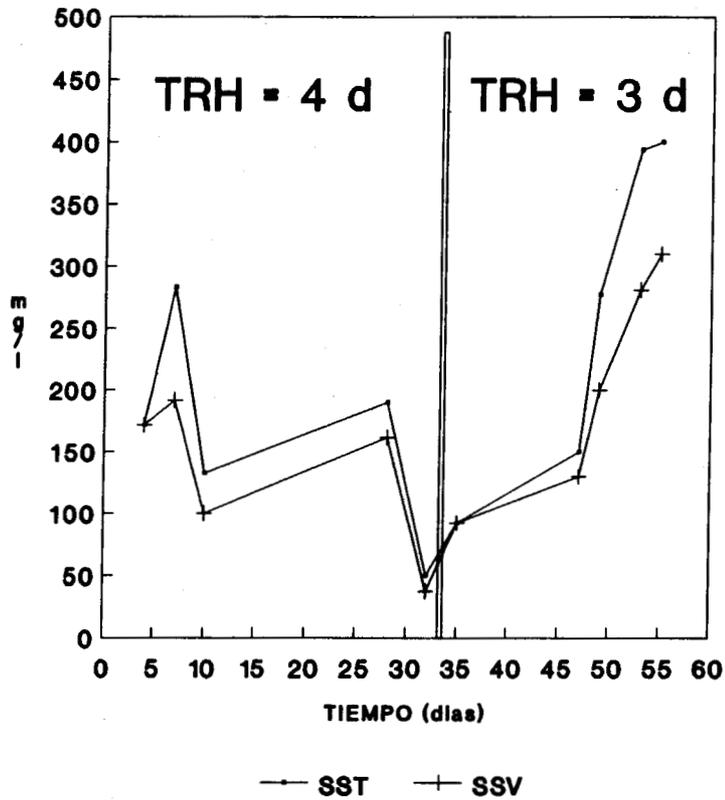


Fig. 29 Reactor UASB de 1.25 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
PRODUCCION DE BIOGAS**

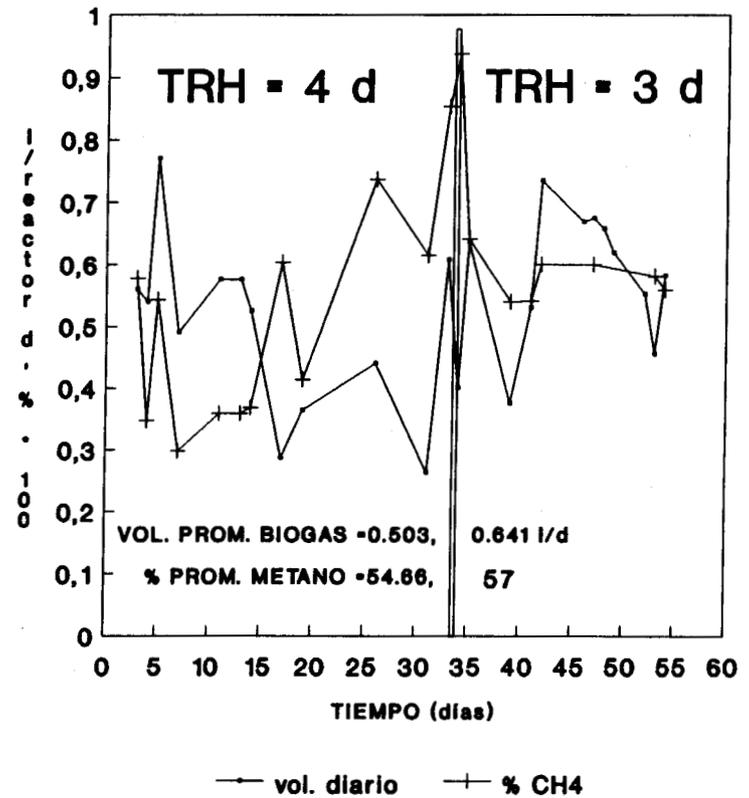


Fig. 30 Reactor UASB de 1.25 l

En la figura 30 se presentan los resultados de la producción de biogas la cuál fué en promedio de 500 ml/d con un porcentaje de metano en promedio de 55%. Sin embargo puede verse que el volumen diario producido no fue constante lo que indicó que el sistema de recolección de biogas no era del todo eficiente.

La figura 31 muestra los perfiles de acetamida (53 mM en promedio a la entrada) y de acetato en la salida, los cuales coinciden con los altos porcentajes de remoción obtenidos, y la concentración de amonio producido (56 mM en promedio), que corresponde a lo que se esperaba obtener.

La figura 32 muestra los resultados de alcalinidad que fueron de 2850 mg/l en promedio. Comparando estos resultados con los del primer reactor se ve que hubo un incremento notorio.

El Eh disminuyó a un valor promedio de -191 mV (Fig. 33), y el pH de los lodos se mantuvo en el rango óptimo para la actividad metanogénica de 7.45 (Fig. 34).

Después de haber caracterizado satisfactoriamente la operación del reactor, a esta carga orgánica, se decidió incrementarla a  $1.13 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$  disminuyendo el TRH a tres días, en estas condiciones se mantuvo por 15 días, tiempo equivalente, a una serie de 5 TRHs.

Los resultados de este experimento se encuentran en las mismas figuras que para 4 días de TRH (Figs. 27-34).

La evolución de la DQO para el influente y el comportamiento es similar al experimento con 4 días de TRH. El porcentaje es de remoción de DQOs disminuyó de 96.18 a 87.46 %. Así a una carga superior a la anterior observamos que empieza a disminuir el rendimiento de remoción de DQOs.

Con la nueva carga orgánica, la producción diaria de biogas se vio incrementada, alcanzando un promedio de 641 ml/reactor·d, de manera simultánea aumentó el contenido de metano en el biogas hasta un promedio de 57%. Como era de esperarse con la disminución del TRH, se elevaron las concentraciones de sólidos suspendidos en el efluente (Fig.

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
ACETAMIDA/ACETATO**

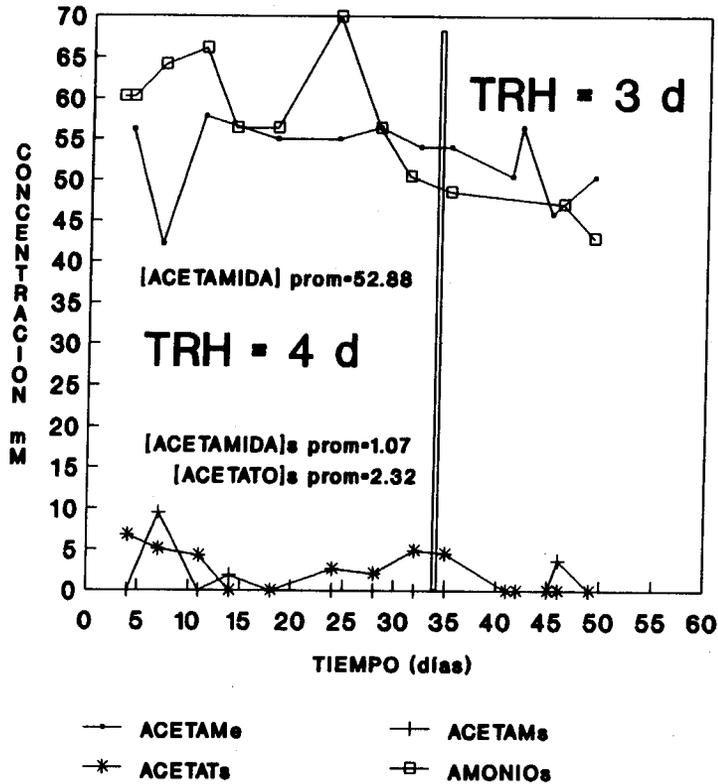


Fig. 31 Reactor UASB de 1.25 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DE LA ALCALINIDAD**

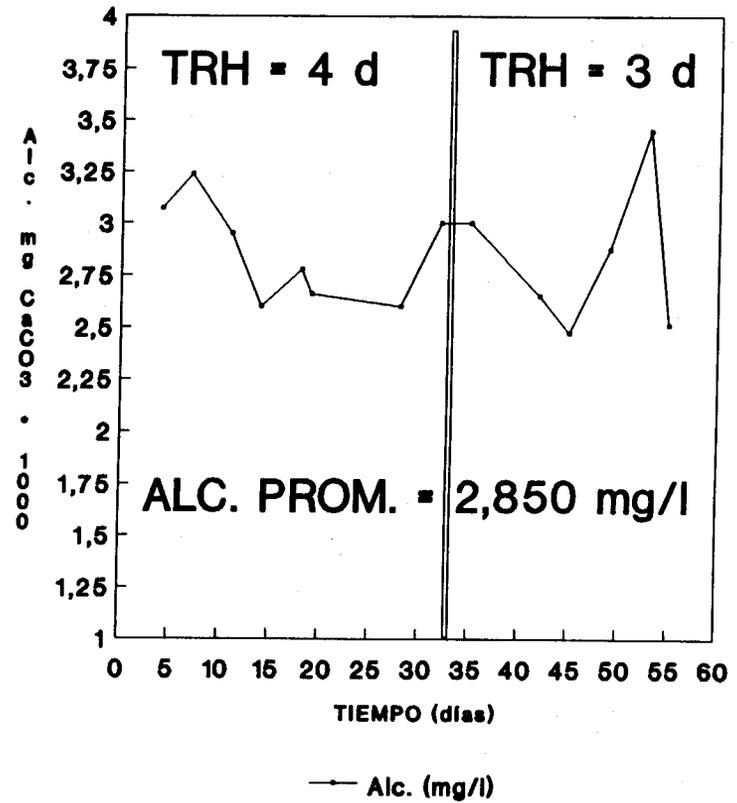


Fig. 32 Reactor UASB de 1.25 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DEL REDOX**

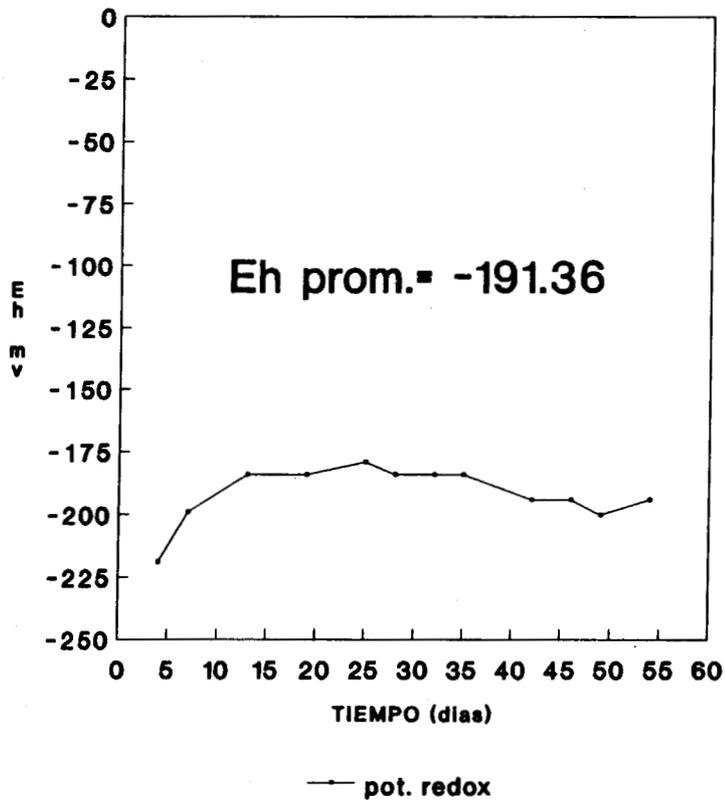


Fig. 33 Reactor UASB de 1.25 l

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
EVOLUCION DEL pH**

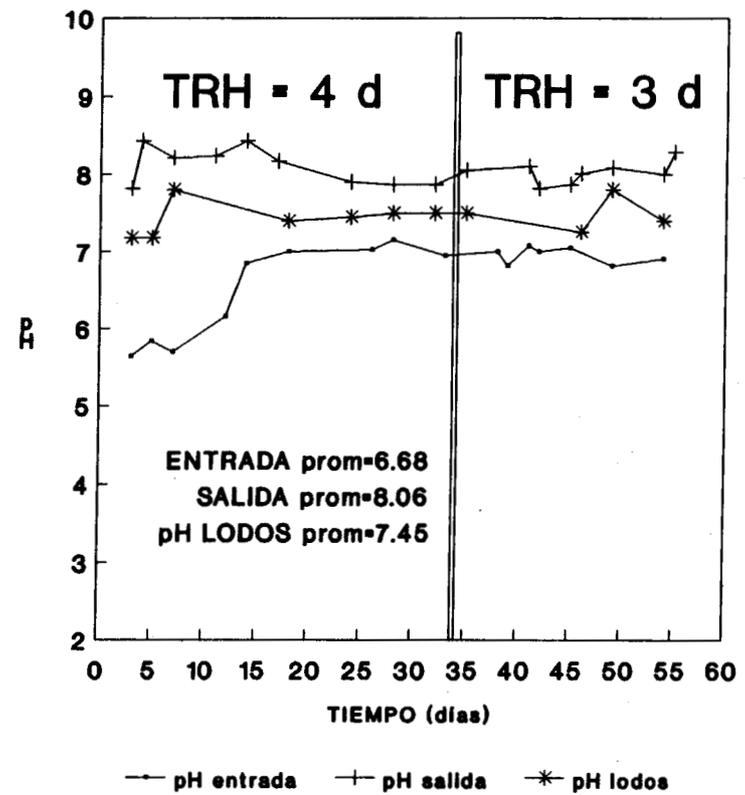


Fig. 34 Reactor UASB de 1.25 l

29). Sin embargo, por medio de estos resultados se pudo saber que este tipo de reactores pueden degradar efluentes que contengan acetamida con altos porcentajes de remoción, se tendrá que continuar con el estudio para determinar el efecto de cargas mayores.

El Eh y pH permanecieron estables. Cabe señalar que a ambas cargas casi no se detectó acetamida en el efluente, aún cuando se aumentó la carga a  $1.13 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ , dado que se disminuyó la eficiencia de remoción de DQOs. Tal como lo habíamos mencionado en los experimentos anteriores con los diferentes lodos, es probable que una fracción de acetamida se quedó absorbida en los lodos.

Cuando el reactor se encontraba bajo condiciones controladas y estables se decidió determinar la actividad microbiana de estos lodos para compararla con la actividad que presentaron los lodos anteriores (Tabla X).

El control sin sustrato como lo indica la figura 35 contenía un residual de acetamida casi nulo, por lo que la producción de metano en este estudio se debe a la autólisis bacteriana como ya lo hemos explicado en los experimentos anteriores y a la acetamida absorbida en los lodos.

La figura 36 presenta los resultados de la actividad metanogénica de estos lodos con una concentración de acetamida de 10 mM. En esta cinética tenemos el perfil que anteriormente observamos:

- 1 Degradación rápida de la acetamida.
- 2 Acumulación del acetato.
- 3 Degradación de acetato y producción de metano.

La velocidad de degradación de acetato ( $0.08 \text{ mmol/l/h}$ ) es inferior al de la acetamida ( $1.35 \text{ mmol/l/h}$ ). En la tabla X se observa que los lodos del reactor tienen una actividad mucho mas alta que los otros lodos estudiados, a pesar de que estos lodos no estuvieron en contacto con la acetamida tanto tiempo. Este experimento se realizó con  $2.6 \text{ g/l}$  de SSV por botella (por duplicado), si este resultado se compara con los datos obtenidos de la figura 19 con el lodo antes de

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Control lodos reactor UASB)

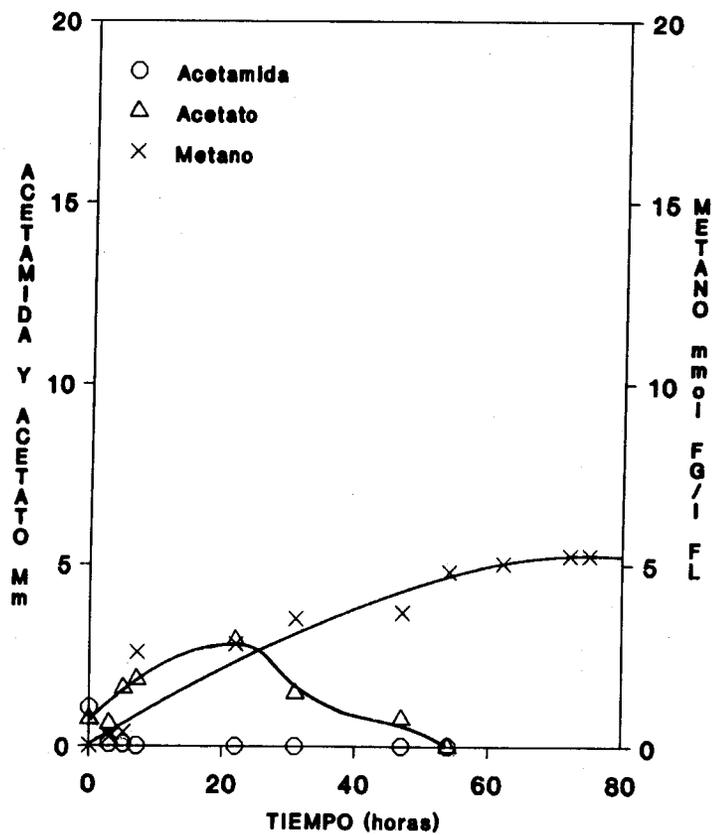


Fig. 35

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos reactor UASB)

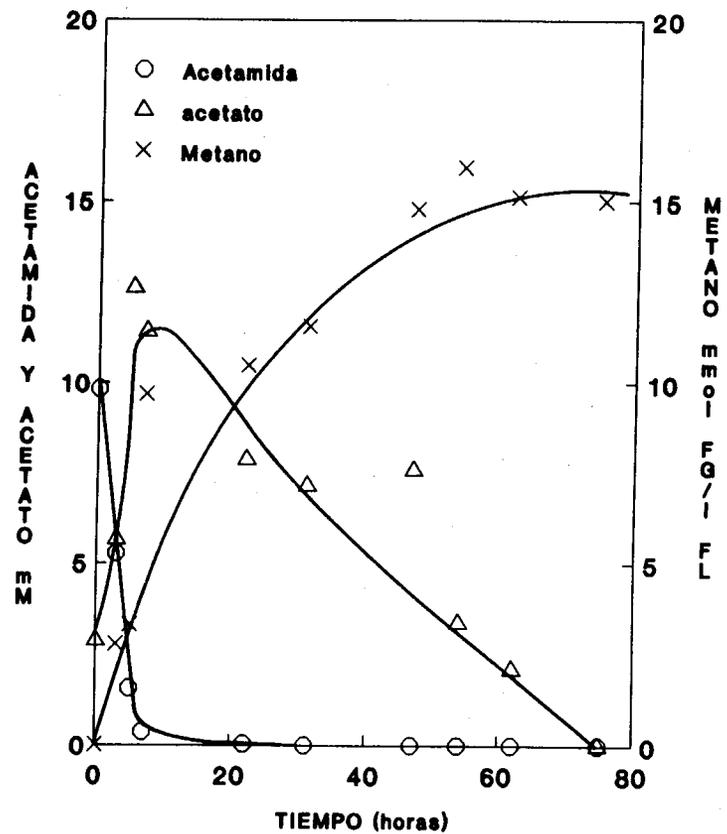


Fig. 36

inocular el reactor, con 2.4 g/l de SSV en las botellas, observamos que la velocidad de degradación de acetamida aumentó considerablemente, lo que se traduce en una adaptación del lodo en el reactor o un incremento de la población microbiana responsable de la degradación de la acetamida. Por medio de estos resultados podemos esperar que un lodo como el del ingenio, puesto en condiciones de operación similares a las del reactor podría alcanzar mejores características.

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos esterilizados del ingenio)

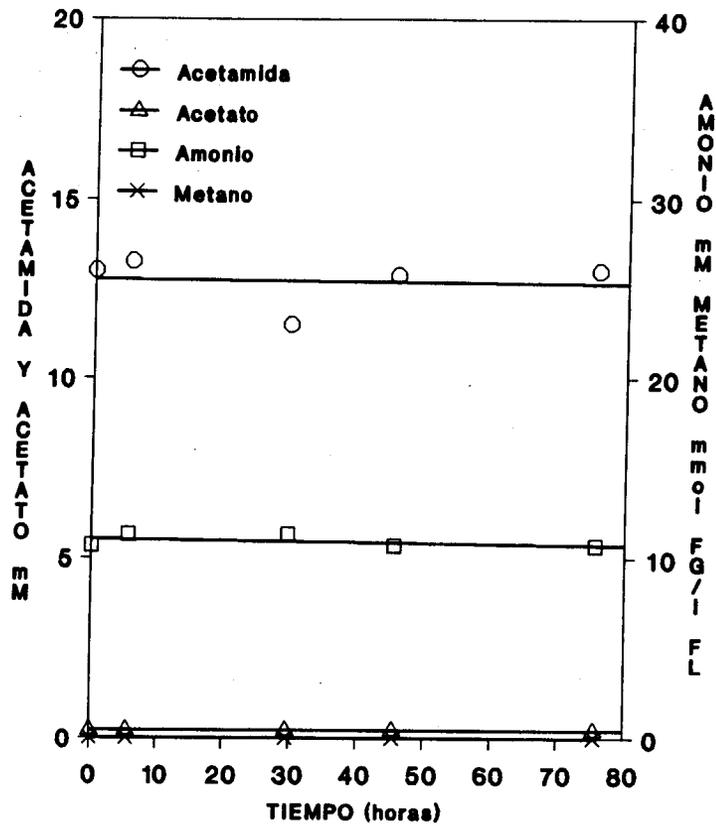


Fig. 37

**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA**  
(Lodos esterilizados de sedimentos)

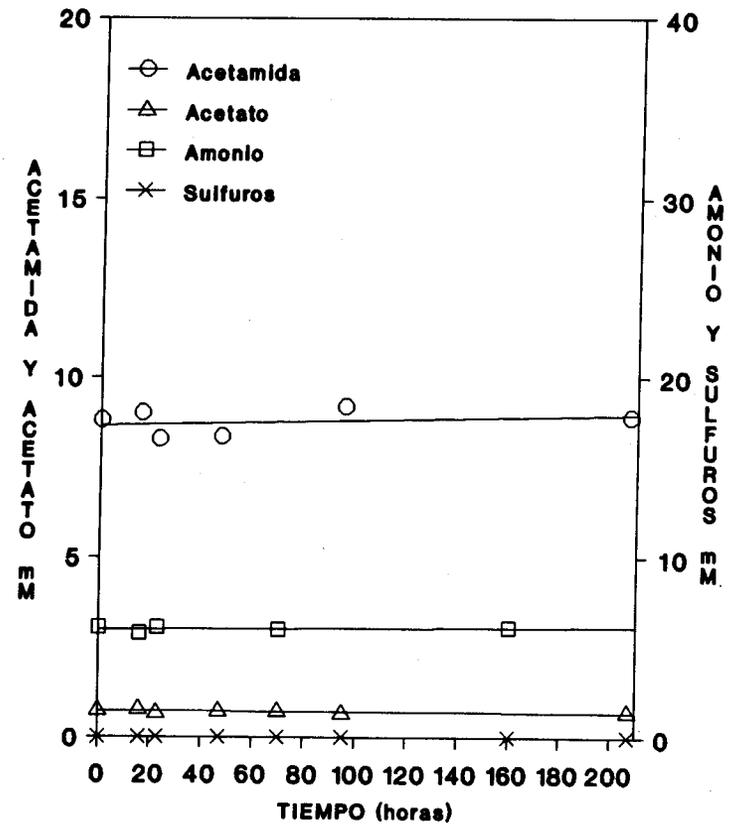


Fig. 38

---

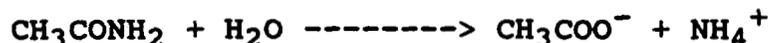
## ***6. CONCLUSIONES***

## 6. CONCLUSIONES

De los estudios realizados para encontrar las rutas de degradación de la acetamida podemos concluir:

- La degradación anaerobia de la acetamida por medio del lodo del ingenio se llevó a cabo por metanación indirecta:

Etapa de detoxificación:

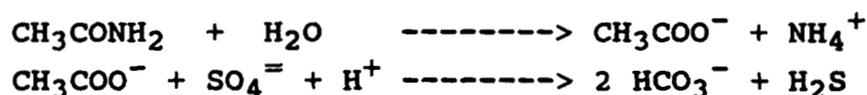


Etapa de metanogénesis:



- Dado la toxicidad de la acetamida su transformación en condiciones anaerobias en acetato demuestra que se puede detoxificar un efluente que contenga este sustrato.

- La degradación de la acetamida por el lodo de los sedimentos se llevó a cabo por sulfato-reducción, vía la producción de acetato:



- Es factible tratar por vía anaerobia un efluente con acetamida empleando un inóculo no adaptado a este sustrato.

- La acumulación de amonio mayores de 100 mM afecta la degradación del acetato, lo que implica que será difícil trabajar con efluentes que contengan altas concentraciones de acetamida.

- Un sistema anaerobio de metanización de acetamida tiene características cinéticas desfavorables, porque además de

las bajas afinidades y actividades de la población bacteriana, hay que agregar también los fenómenos de transformación del acetato en metano que es un paso difícil y lento, al menos que el inóculo esté en cantidades suficientes.

- El empleo de reactores UASB es una buena opción para el tratamiento de estos efluentes, pero su uso se limitará en este caso a bajas cargas (inferiores a  $1.5 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ ). Sin embargo, para el tratamiento de efluentes industriales de este compuesto, se requiere caracterizar la eficiencia del sistema para cargas mayores, dado que vimos que a cargas superiores a  $0.8 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$ , la eficiencia empieza a disminuir.

---

## ***7. BIBLIOGRAFIA***

## 7. BIBLIOGRAFIA

- APHA/AWWA/WPCF, (1989). **Standard Methods for the examination of water y wastewater**. 17Th Edition, Joint Editorial Board.
- Balch, W.E., and Wolfe, R.S., (1976). New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanolsulfonic acid(HS-CoM)-dependent growth *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:781-791.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., and Wolfe, R.S., (1979). Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. *Microbiol. Rev.*, 43:260-296.
- Boone, D.R. and Bryant, M.P., (1980). Propionate degrading bacterium *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:626-632.
- Boone, D.R., Johnson, R.L., and Lin, Y., (1989). Diffusion of the interspecies electron carriers H<sub>2</sub> or formate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1735-1741.
- Bryant, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A., and Crabil, R., (1977). Growth of *Desulfovibrio* en lactate or ethanol media lowin sulfate in association with H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:1162-1169.
- Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J., and Wolfe, R.S., (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.*, 59:20-31.
- Eichler, B., and Schink, B., (1984). Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.*, 140:147-152.
- García, J.L., (1983). La fermentation methanique. Raport ORSTOM.
- García, J.L., (1991). Ecología de inóculos anaerobios específicos en el tratamiento de aguas residuales. Memorias del II Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria cafetalera. Manizales, Colombia.

- Gorris, L.G.M., de KOK, T.M., Kroon, B.M., van der Drift, C., and Vogels, G.D., (1988). Relationship between methanogenic cofactor content and maximum specific methanogenic activity of anaerobic sludges. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1126-1130.
- Guyot, J.P., (1985). Role of formate in methanogenesis from xylan by *Cellulomonas* sp. associated with methanogens and *Desulfovibrio vulgaris*: inhibition of the acetoclastic reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, 34:149-153.
- Guyot, J.P., (1988). Introducción a la Microbiología de la Digestión Anaerobia. Apuntes del curso sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales. Microbiología y Bioquímica. Medellín Colombia. pp. 1-87.
- Guyot, J.P., and Browman A., (1986). Methane production from formate by syntrophic association of *Methanobacterium bryanti* and *Desulfovibrio vulgaris* j.j. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:1436-1437.
- Guyot, J.P., Noyola, A., Ramírez, F., (1988). Actividades metanogénicas de lodos granulares de un digestor de lecho de lodos. Memorias del I Simposio sobre Ingeniería Ambiental. UNAM. pp. 179-197.
- Hungate, R.E., (1969). A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: Norris, J.R., and Robond, D.W. (Eds.). *Methods in Microbiology*. Academic Press Inc. New York, Vol. 33. pp. 117-132.
- Jarrel, and Saulnier, (1987). Inhibition of Methanogenesis in pure cultures by ammonia; fatty acids, and heavy metals and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. *Can. J. Microbiol.*, 33:551-554.
- Khan, A.W., and Trottier, T.M., (1978). Effect of sulfur containing compounds on anaerobic degradation of cellulose to methane by mixed cultures obtained from sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:1027-1034.
- Khan, A.W., Trotier, T.M., Patel, G.B., and Martin, S.M., (1979). Nutrient requirement for the degradation of cellulose to methane by a mixed population of anaerobes. *J. Gen. Microbiol.*, 112:15-37.
- Kirk-Otmer, (1978). *Encyclopedia of Chemical Technology*. Third edition. Wiley interscience publication. vol 1:148-150.

- Krisjansson, J.K., Schonheit, P., and Thauer, R.K., (1982). Different  $K_s$  values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenic by sulfate. *Arch. Microbiol.*, 131:313-318.
- Lettinga, G., de Zeeuw, W.J., Hulshoff, P.L.H., Hobma, S.W., Grin, P.C., Weigant, W.M., Van Velsen, A.F.M., and Koster, I.W., (1982). Anaerobic Wastewater Treatment Using the UASB Treatment Process. *Memorias del 28<sup>o</sup>. Simposio Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación. UAMI-ICAITI, Guatemala.*
- Lettinga, G., Van Velsen, A.F.M., Hobman, S.W., de Zeeuw W., and Klapwijk, A., (1980). Use of upflow Sludge Blanket Reactor concept for Biological wastewater Treatment especially for Anaerobic Treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 22(4):699-734.
- Lovley, D.R., and Ferry, J.G., (1985). Production and consumption of  $H_2$  during growth of *Methanosarcina* sp. on acetate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:247-249.
- Lovley, D.R., Dwyer, D.F. and Klug, M.J., (1982). Kinetics analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:1373-1379.
- Mah, R.A., (1980). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei*. *Curr. Microbiol.*, 3:321-326.
- Mc. Inerney, M.J., and Bryant, M.P., (1981). Anaerobic degradation of lactate by syntrophic association of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of  $H_2$  on acetate degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:346-354.
- Mc. Inerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B., and Costerton, J.W., (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:1029-1039.
- Mohamed, S.N., Kirit, D.C., and James, H.W., (1989). Degradation of Acetonitrile by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(9):2267
- Naguib, M., (1988). Kinetics of acetate and methanol conversion into methane in eutrophic sediments and its application in anaerobic systems. *Water Sci. Technol.*, 20(11/12):61-67.

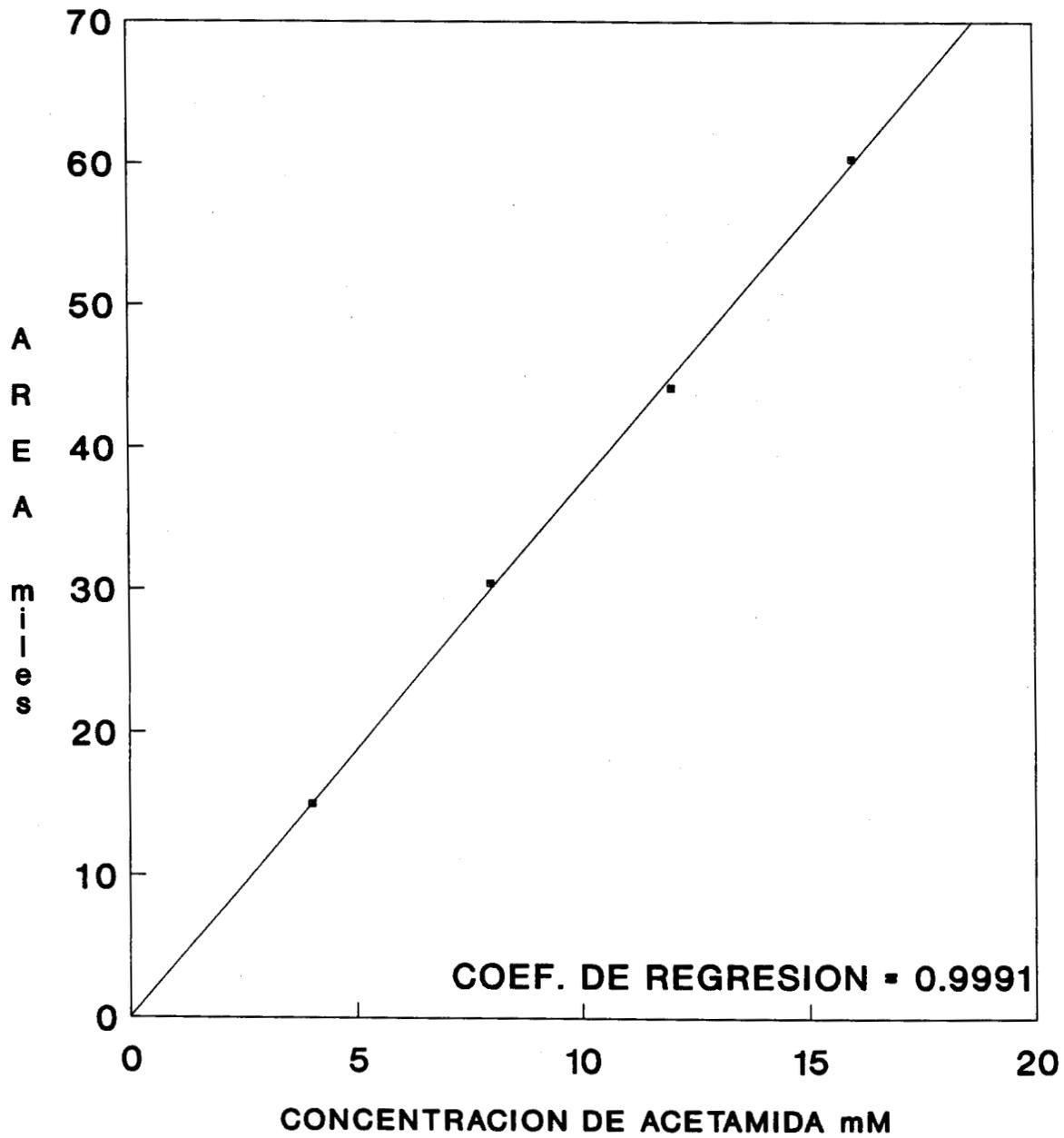
- Noyola, A., (1990). Tratamiento anaerobio de aguas residuales: una experiencia de adaptación de tecnología en México. Conferencia sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales en América Latina. UNAM. pp. 337-357.
- Noyola, A., Guyot, J.P., and Monroy, O., (1988). Comparación experimental de dos tipos de reactores anaerobios avanzados. Memorias del I Simposio Nacional sobre Ingeniería ambiental. UNAM. pp. 179-197.
- Poggi-Varaldo, H.M., (1991). Inhibition of growth and acetate uptake by ammonia in Batch Anaerobic Digestion. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 52:135-143.
- Rodier, J., (1978). *Análisis de aguas*. Editorial OMEGA S.A. pp 145-147.
- Ruwisch, C.R., (1986). *Facultative and partial interspecies hydrogen transfer competition for reducing equivalents. Biology and anaerobic bacteria*. Pergamon Press. The Netherlands. pp. 16-22.
- Ruwisch, C.R., (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 4:33-36.
- Schobert, S.M., (1982). Methanogenic flora and their metabolic routes. Memorias del 28<sup>o</sup>. Simposio de Avances en digestión anaerobia. UAMI-ICAITI.
- Van den Berg, L., Lamb, K.A., Murray, W.D., and Armstrong, D.W., (1980). Effects of sulphate, iron and hydrogen on the microbiological conversion of acetic acid to methane. *J. Appl. Bacteriol.*, 48:437-447.
- Woese, C., (1977). Archaeobacterias. *Ciencia*. 44:48-61.
- Zehnder, A.J.B., (1978). Ecology of methane formation. In: R. Mitchell. *Water pollution Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 349-378.

# ***ANEXO***

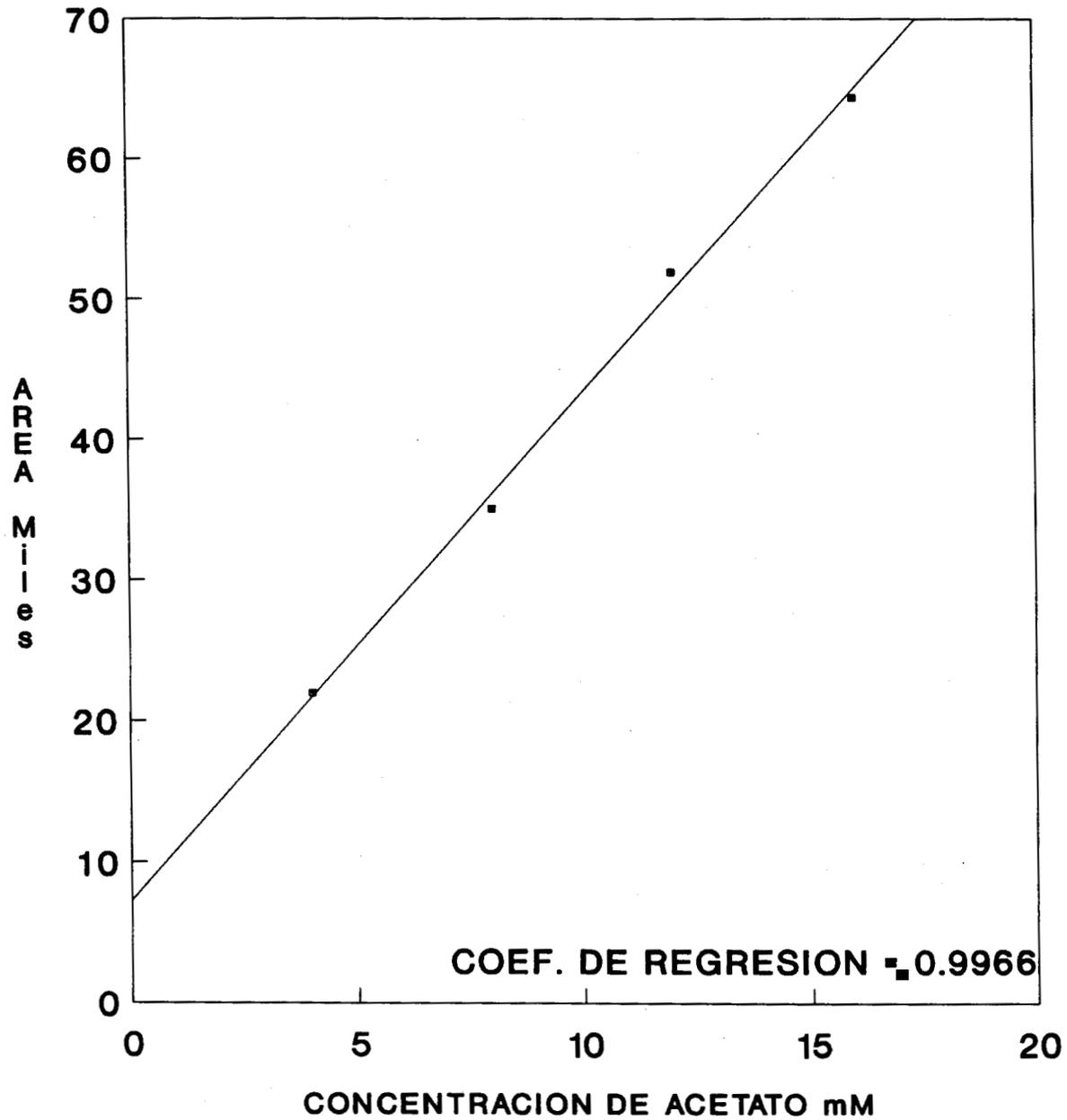
## ANEXO

Curva estándar de acetamida	87
Curva estándar de acetato	88
Curva estándar de metano	89
Curva estándar de amonio	90
Curva estándar de sulfuros	91
Curva estándar de DQO	92
Cuantificación de bacterias anaerobias por el número más probable (NMP)	93

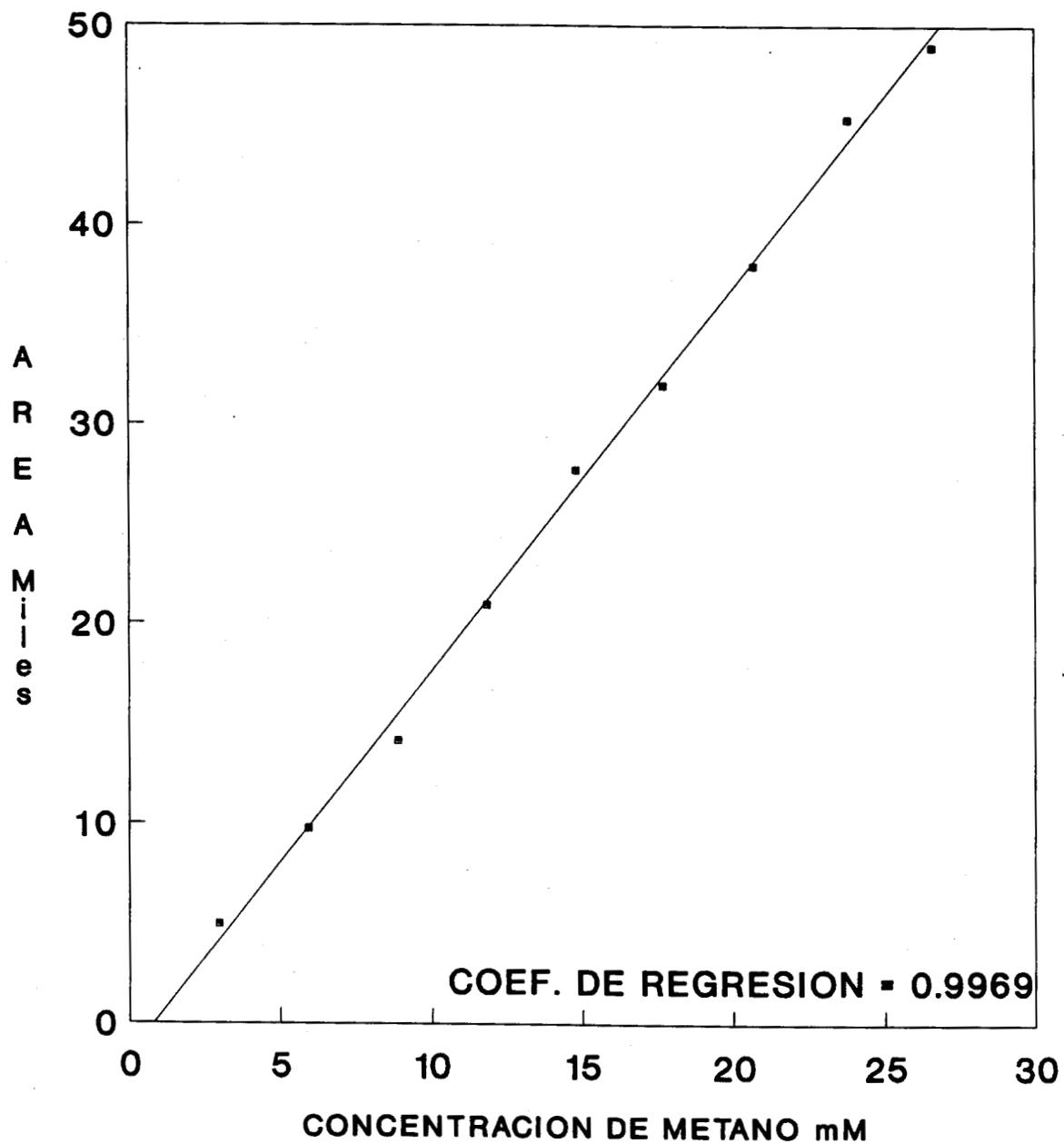
**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
CURVA ESTANDAR DE ACETAMIDA**



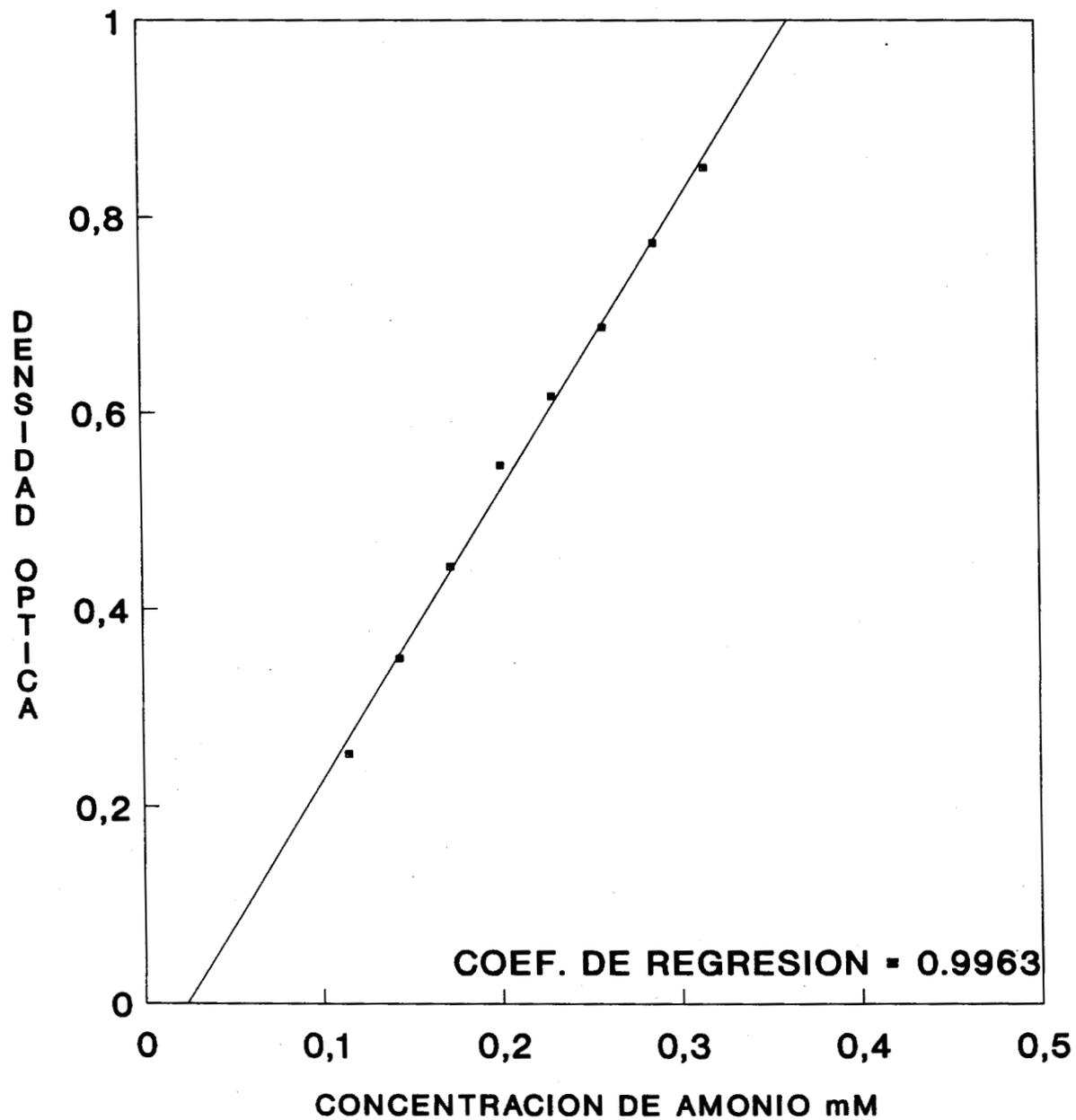
**CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA  
DE ACETAMIDA  
CURVA ESTANDAR DE ACETATO**



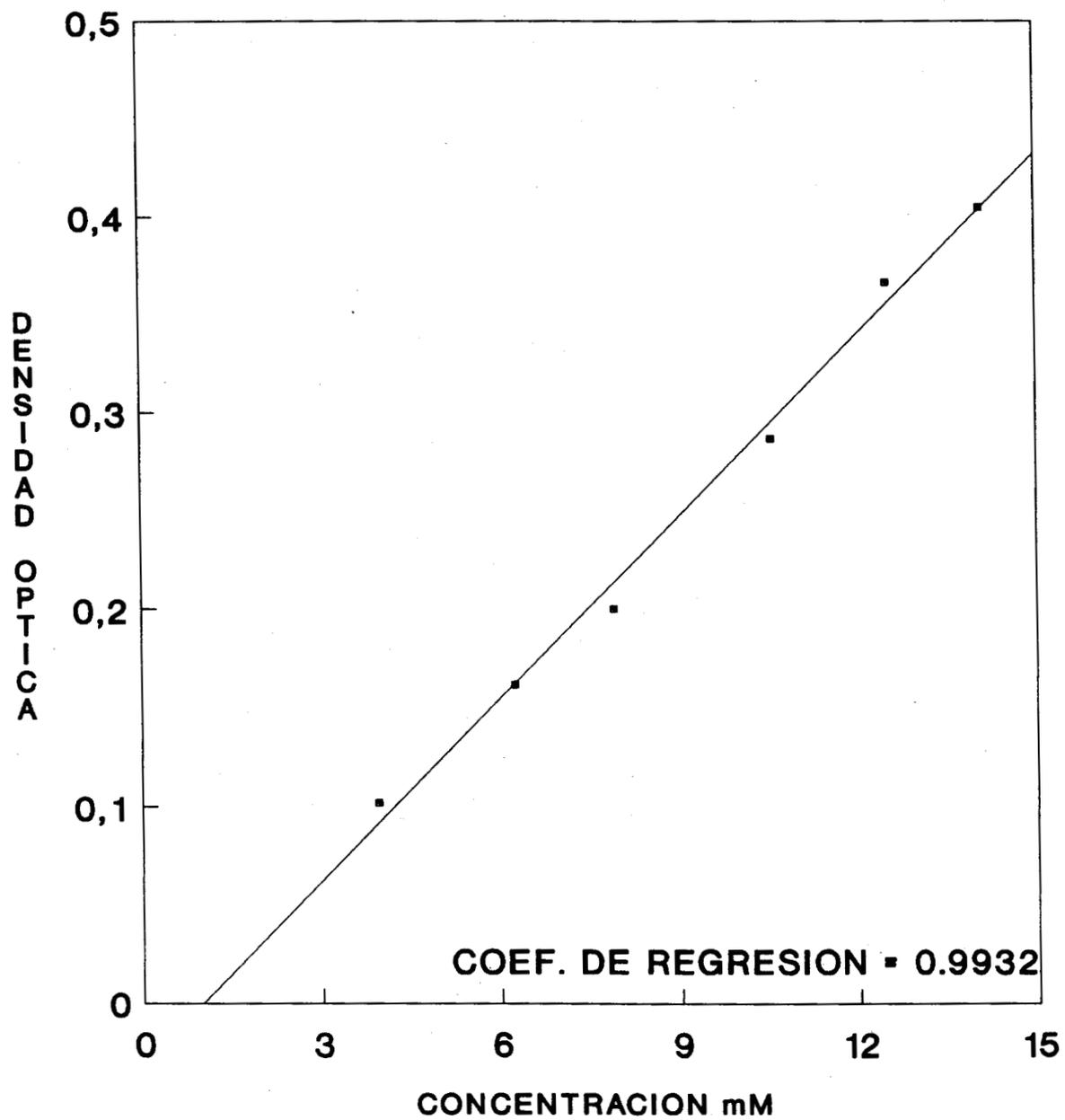
# CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA DE ACETAMIDA CURVA ESTANDAR DE METANO



# CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA DE ACETAMIDA CURVA ESTANDAR DE AMONIO

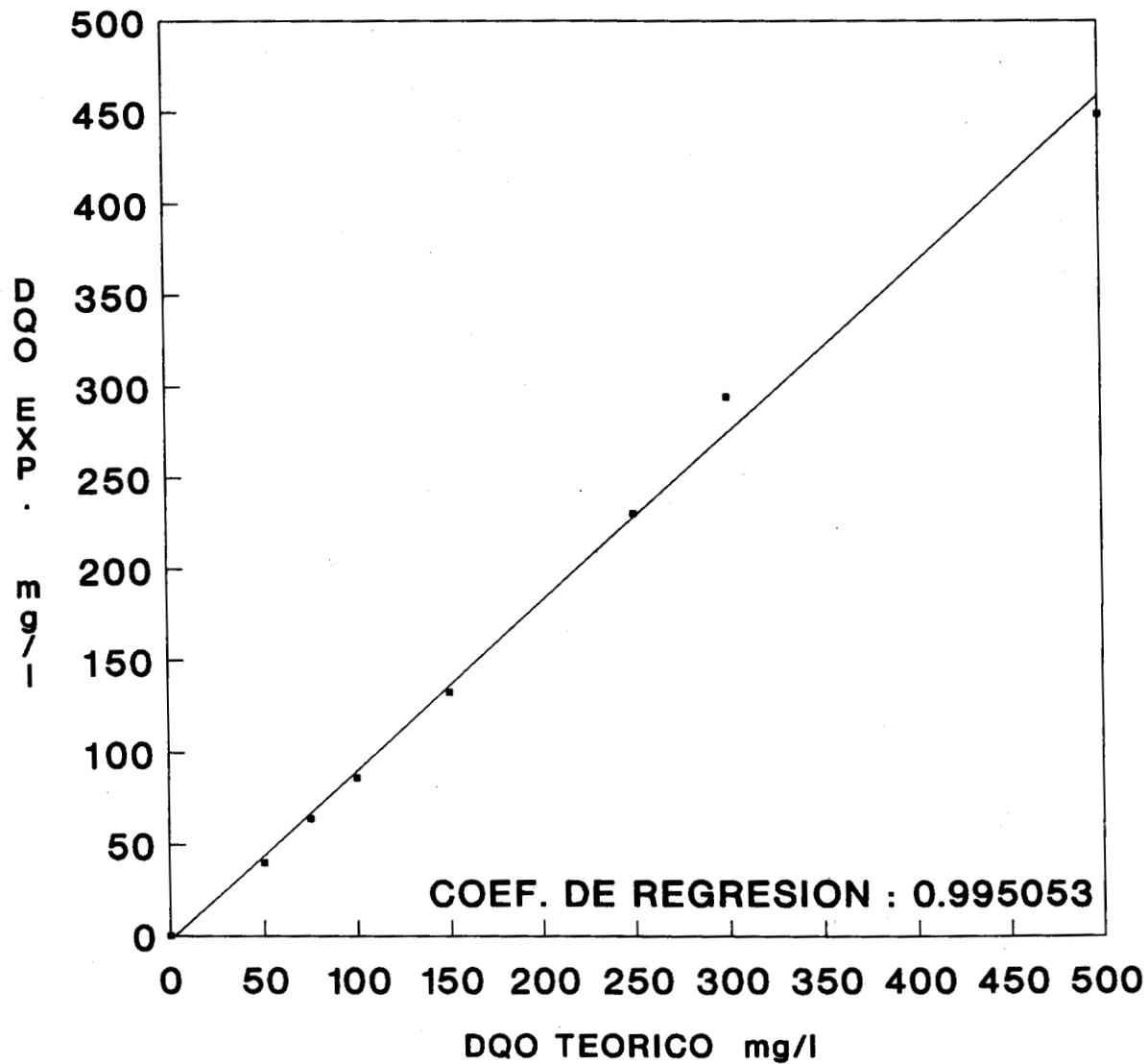


# CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA DE ACETAMIDA CURVA ESTANDAR DE SULFUROS



# CINETICA DE DEGRADACION ANAEROBIA DE ACETAMIDA

## CURVA ESTANDAR DE DQO (Micrométodo)



—•— DQO

**CUANTIFICACION DE BACTERIAS ANAEROBIAS POR EL NUMERO MAS  
PROBABLE**

**INTRODUCCION**

La cuantificación de las bacterias presentes en un lodo, es de gran importancia ya que nos indica cual es el grupo bacteriano predominante en la degradación de cierto compuesto. Esta técnica fue descrita por García y col. (1982), y la transferencia de sustratos, preparación de medios de cultivo y la inoculación fueron tomadas de Hungate (1969), y Balch y col. (1979).

**SOLUCIONES**

**Solución mineral 1 (g/l)**

Fosfato dibásico de potasio ( $K_2HPO_4$ )            6.00

**Solución mineral 2 (g/l)**

Fosfato monobásico de potasio ( $KHPO_4$ )            6.00

Cloruro de amonio ( $NH_4Cl$ )                            2.40

Cloruro de sodio ( $NaCl$ )                                12.00

Cloruro de magnesio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )            2.10

Cloruro de calcio ( $CaCl_2 \cdot H_2O$ )                0.16

**Solución de oligoelementos**

Preparar una solución con 1.5 g de ácido nitrilo triacético en 950 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.5 con una solución de KOH y aforar a un litro.

Agregar (g/l):

Sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )            3.00

Sulfato manganoso ( $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.50
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	1.00
Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.10
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ )	0.10
Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ )	0.10
Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.01
Sulfato de aluminio y potasio ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ )	0.01
Acido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.01
Molibdato óxido de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.01

**Solución de vitaminas (g/l)**

Biotina	0.0020
Acido fólico	0.0020
Piridoxina	0.0100
Tiamina	0.0050
Riboflavina	0.0050
D.L. ácido pantoténico	0.0050
Vitamina B12	0.0001
Acido p-amino benzoico	0.0050
Acido lipóico	0.0050

**Solución de resarsurina**

Pesar 1 g de resarsurina y disolverla en 100 ml de agua destilada.

**Solución de cloruro de níquel**

Cloruro de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) 0.005 g/100 ml de agua destilada.

**Solución de sulfato ferroso**

Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2 g / 100 ml de agua destilada.

### **Solución de sulfuro de sodio**

Sulfuro de sodio 2.5 g /100 de agua hervida más  $\frac{1}{2}$  lenteja de NaOH (lavar los cristales de sulfuro antes de pesar con agua hervida). Con esta solución llenar tubos de hungate dentro de la cámara anaerobia y esterilizar.

### **Solución de azul de bromotimol**

Azul de bromotimol	0.2 g
Hidróxido de sodio (0.1 M)	5.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

### **Solución Stock de glucosa**

Glucosa anhidra 2.5 g/10 ml de agua hervida.

## **MEDIOS DE CULTIVO**

### **Medio Basal**

Solución mineral 1	50.0 ml
Solución mineral 2	50.0 ml
Solución de oligoelementos	10.0 ml
Solución de vitaminas	10.0 ml
Solución de cloruro de níquel	10.0 ml
Solución de sulfato ferroso	1.0 ml
Solución de resarsurina	1.0 ml
Extracto de levadura	0.1 g
Peptona de caseína	0.1 g
Agua destilada	1000.0 ml

**Medio para bacterias anaerobias totales (AT)**

Medio basal	250.00	ml
Solución de azul de bromotimol	2.40	ml
Bicarbonato de sodio	0.500	g
cisteína	0.125	g

**Medio para bacterias Hidrogenofilicas (BMH)**

Medio basal	250.00	ml
Bicarbonato de sodio	0.500	g
Cisteína	0.125	g

**Medio para bacterias acetoclásticas (BMA)**

Medio basal	250.00	ml
Acetato de sodio	0.250	g
Bicarbonato de sodio	0.500	g
Cisteína	0.125	g

**Medio para bacterias metanogénicas totales (BMT)**

Medio basal	250.00	ml
Acetato de sodio	0.250	g
Bicarbonato de sodio	0.500	g
Cisteína	0.125	g

**Medio para bacterias degradadoras de propionato**

Medio basal	250.00	ml
Bicarbonato de sodio	0.500	g
Propionato de sodio	0.250	g
Cisteína	0.125	g

### **Medio para bacterias degradadoras de butirato**

Medio basal	250.00 ml
Bicarbonato de sodio	0.500 g
Butirato de sodio	0.250 g
Cisteína	0.125 g

### **Medio para bacterias sulfatorreductoras (BSR)**

Medio basal	250.00 ml
Sulfato de sodio	0.150 g
Sulfato ferroso	0.125 g
Cisteína	0.125 g
Ajustar el pH a 9 con NaOH antes de hervir	

### **Medio de dilución**

El medio basal necesario dependiendo de las diluciones que se hagan.

### **PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Después de preparado cualquier medio de cultivo, agregar al matraz una tercera parte mas del volúmen de agua destilada, poner a hervir bajo una corriente de nitrógeno hasta que el color del medio cambie de azul a rosa y se llegue al volúmen de aforo; enfriar bajo corriente de nitrógeno y agregar la cisteína, tapar, e introducir los medios junto con todo el material a utilizar en la pre-cámara de acceso a la cámara anaerobia y realizar tres vacíos de 20 mmHg con nitrógeno.

Colocar en cada uno de los tubos de Hungate 5 ml de medio, tapar los tubos y sacar de la cámara. Fuera de la cámara realizar cambios de atmósfera con N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) durante 2 minutos o el tiempo necesario para tener un pH cercano a 7.

Para el medio de BSR el cambio se hace unicamente con N<sub>2</sub>.

Esterilizar los medios por 15 minutos a 20 lb/in<sup>2</sup>.

## **INOCULACION**

### **Diluciones de la muestra**

Preparar 10 tubos de Hungate con 9 ml de medio basal cada uno y hacer 10 diluciones de cada muestra. Flamear los tapones de los tubos con alcohol.

Inocular por cada dilución 4 o 5 tubos, con un volúmen de inóculo de 0.2 ml por tubo, con jeringas de insulina bajo condiciones estériles y purgando el aire de las jeringas 3 veces con N<sub>2</sub>.

Para los medios para bacterias hidrogenofílicas y metanogénicas totales alimentar con una corriente de H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) durante un minuto.

A los medios para bacterias anaerobias totales agregar a cada tubo 0.1 ml de solución de glucosa antes de inocular.

Incubar por 3 semanas a 35° C y determinar metano por cromatografía de gases.

### **CALCULOS**

Se determina metano de cada tubo inoculado de la dilución mas baja a la mas alta. El resultado que se toma en cuenta es la dilución mas alta que presente todos los tubos positivos y las dos siguientes diluciones. Con estos tres números se busca en las tablas de Mac Grady (NMP) (García, 1983), el valor que se obtenga multiplicado por el inverso de la dilución mas baja nos dará la cantidad de bacterias presentes en la muestra.

Para los inóculos con medio para anaerobias totales y sulfato-reductoras, se toma en cuenta unicamente la turbidez del medio (sin medición de metano).

Es importante que al hacer las diluciones se determine a la muestra los SSV.

***GLOSARIO Y  
ABREVIATURAS  
UTILIZADAS***

## GLOSARIO

**Biotopo.** ecosistema natural.

**Lodo.** inóculo mixto heterogéneo con materia orgánica.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

**AGV:** ácidos grasos volátiles.

**BMA:** bacterias metanogénicas acetoclásticas.

**BMH:** bacterias metanogénicas hidrogenofílicas.

**BDA:** bacterias degradadoras de acetamida.

**BSR:** bacterias sulfato-reductoras.

**DQOs:** demanda química de oxígeno soluble.

**DQOt:** demanda química de oxígeno total.

**SST:** sólidos suspendidos totales.

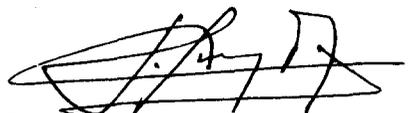
**SSV:** sólidos suspendidos volátiles (biomasa).

**TRH:** tiempo de retención hidráulico.

**UASB:** Up flow Anaerobic Sludge Blanket.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud aprobó esta tesis el día 5 de junio de 1992.

T u t o r :



Dr. Jean Pierre Guyot

A s e s o r e s :



M. en C. Jorge Gómez H.



Dr. Francisco Cruz S.