

**XVI CONGRESO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL AIDIS –
CHILE**
II SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE LODOS Y BIOSÓLIDOS

Viña del Mar, 23 al 26 de Octubre de 2005

**ANÁLISIS DE IMAGEN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CAMBIOS
MORFOLÓGICOS EN BIOMASA GRANULAR, INDUCIDOS POR LA
PRESENCIA DE NITRATO EN REACTORES EGSB**

P. Araya Kroff¹, A.L. Amaral², M. Mota¹, E. C. Ferreira¹ and M. M. Alves¹
¹ Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 4710-057, Braga, Portugal

² Present address: Departamento de Tecnologia Química, Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1038, 5301-854 Bragança, Portugal
E-mail: pak@deb.uminho.pt
Teléfono: +351 253604400, fax: +351 253678986

RESUMEN EXTENDIDO

Abstract Cuatro reactores EGSB (R1-R4) fueron operados a velocidades de carga orgánica de 10 kgCOD/(m³.d), tiempos de retención hidráulicos de 3.6 h, velocidades superficiales de 10 m/h y diferentes concentraciones de nitrato a la entrada, 0, 20, 60 y 100 mgN-NO₃-/L en R1, R2, R3 and R4, respectivamente. Después de 20 días de operación continua, la biomasa granular fue caracterizada en términos de: (i) morfología por análisis de imagen cuantitativo; (ii) actividad metanogénica específica en presencia de acetato, butirato, propionato, etanol y una mezcla gaseosa de H₂CO₂; velocidad de sedimentación. El parámetro LfA, definido como el cociente entre la longitud total de filamentos y el área total proyectada, fue determinado y se observó que es suficientemente sensible para la cuantificación de diferencias morfológicas inducidas por la presencia de nitrato. Aunque el crecimiento de estructuras filamentosas en la superficie de los gránulos fue evidente, no hubo una disminución notable en la velocidad de sedimentación de los gránulos, probablemente porque durante el período de operación los gránulos crecieron en tamaño. En el reactor R4 se observó un mayor *washout* que en R1, R2 y R3.

Keywords Análisis de imagen, reactores EGSB, biomasa granular, estabilidad, nitrato

Introducción

La *performance* de reactores UASB y EGSB depende en gran medida de la calidad de la biomasa granular utilizada, su actividad metanogénica específica, sus características de sedimentación y su morfología. La aplicación de este tipo de reactores a la remoción de carbono en sistemas de tratamiento de aguas residuales se ha incrementado enormemente en los últimos años en Europa, Asia y América Latina. De la misma manera se han incrementado los trabajos de investigación en el desarrollo de sistemas integrados para la remoción de nutrientes incluyendo la desnitrificación (Akunna *et al.*, 1992. Hendriksen *et al.*, 1996). Desde el punto de vista operacional, no sólo es importante tener en cuenta el aspecto de los parámetros de operación, sino que también las características morfológicas y físicas de la biomasa. Ciertamente que la deterioración de los gránulos o el crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos pueden ser un indicador de serios problemas como el *washout* o el *bulking* filamentoso. El análisis de imagen permite la cuantificación de algunos de los parámetros morfológicos más importantes, como la longitud de los filamentos y el área proyectada de los gránulos, entre otros. El parámetro LfA (definido como el cociente entre la longitud total de los filamentos y el área total proyectada de los gránulos) se ha usado para estimar el estado de la biomasa durante el proceso de granulación (Araya Kroff *et al.*, 2004). La presencia de nitrato en la alimentación de estos reactores indujo el crecimiento de bacterias desnitrificantes con características filamentosas. Estos microorganismos pueden originar gránulos con densidades menores o desestabilización de densos lechos fluidizados (Bhatti *et al.*, 2001). El objetivo de este trabajo fue usar el análisis de imagen para cuantificar los cambios morfológicos de gránulos anaerobios expuestos a nitrato en reactores EGSB. Para complementar los resultados se efectuaron mediciones de actividad metanogénica en presencia de acetato, propionato, butirato, etanol y una mezcla gaseosa de H₂/CO₂.

Materiales y Métodos

Operación de los reactores. Se llevaron a cabo cuatro experimentos en paralelo, utilizando cuatro reactores EGSB idénticos de 1.4 L (R1-R4). Los reactores fueron construidos en *plexiglas* con 2.2 m de alto, 2.8 cm de diámetro interno y una camisa exterior para mantener la temperatura a 37°C por medio de la circulación de agua caliente desde un baño termostatzado. Los cuatro reactores fueron inoculados con la misma cantidad de biomasa granular y fueron operados en las mismas condiciones orgánicas e hidráulicas: 10 kgCOD/(m³d), tiempo de residencia hidráulico de 3.6 h. La velocidad superficial fue controlada por medio de recirculación externa y mantenida a 10 m/h. La concentración en la alimentación fue de 1500 mgDQO/L y estuvo compuesta por acetato (30%), propionato (60%) y etanol (10%). La alcalinidad fue de 3000 mg/L como Na₂CO₃ y CaCO₃. En cada experimento la única diferencia recayó en la concentración de nitrato alimentada (0, 20, 60 y 100 mgN-NO₃/L en R1, R2, R3 y R4 respectivamente). Para mantener un ambiente favorable a la metanización, la relación DQO:N fue mantenida sobre el valor de 15.

Métodos analíticos. Ácidos grasos volátiles (AGS) fueron medidos por HPLC. La actividad metanogénica específica fue medida en ensayos *batch* utilizando la técnica del transductor de presión (Colleran *et al.*, 1992). Metano, CO₂ y N₂ fueron medidos por cromatografía gaseosa utilizando Helio como gas de arrastre y un detector TCD. Sólidos suspendidos volátiles (SSV) fueron determinados según *Standard Methods*. Análisis de Inyección Secuencial (*Sequential Injection Analysis*, SIA) fue utilizado para medir nitrato en todos los experimentos. La sensibilidad del método va desde los 5 mgN-NO₃- to

100 mg mgN-NO₃⁻. La velocidad de sedimentación fue medida individualmente en más de 100 partículas en una columna de 30 cm de agua a temperatura ambiente.

Adquisición de imagen y análisis. Las imágenes de filamentos, *micro* y *macroflocs* fueron adquiridas según el procedimiento desarrollado por Amaral (2003) y detallado por Araya Kroff *et al.* (2004). El parámetro LfA (definido como el cociente entre la longitud total de los filamentos y el área total proyectada de los gránulos) que ya ha sido utilizado antes para estimar el estado de granulación de la biomasa durante el proceso de granulación (Araya Kroff *et al.*, 2004), fue aplicado en este caso para la caracterización de los gránulos.

Resultados y discusiones

Durante el período de operación de R1 y R2, la eficiencia de remoción de DQO fue estable alrededor de 98% en los dos reactores, mientras que en R3 y R4 tuvo un valor ligeramente inferior para el acetato y el propionato: cerca de 85-90% en el inicio y 90% al final de la operación. Este resultado concuerda con los resultados de las mediciones de actividad metanogénica específica en presencia de acetato y propionato, que mostraron valores inferiores. La composición del biogas fue semejante en R1 y R2, pero se observó una diferencia significativa tanto en R3 como en R4, que mostraron porcentajes de nitrógeno mayores (30% y 40% respectivamente). Esto indica el desarrollo del proceso de desnitrificación en estos reactores, que fue más evidente en R4 al ser alimentado con la mayor concentración de nitrato. Más aún, esto sugiere que el proceso de desnitrificación se desarrolló en un grado diferente según la concentración de nitrato en la alimentación. Durante todo el período de operación, no se detectó la presencia de óxido nitroso en ninguno de los reactores. La actividad metanogénica específica mostró grandes variaciones en los cuatro experimentos. La Tabla 1 resume los valores de actividad metanogénica específica en de cada muestra de biomasa del inóculo y de los 4 reactores en presencia de los diferentes substratos. Los valores son presentados en mLCH₄@PTN/gVSS·d.

Tabla 1 – Valores de actividad metanogénica específica obtenidos de las muestras de biomasa del inóculo, R1, R2, R3 y R4 al final del período de operación (mLCH₄@PTN/gVSS·d).

	Acetato	Propionato	Butirato	Etanol	H ₂ /CO ₂
Inóculo	773,8±22,5	117,4±12,1	51,5±6,5	1074,3±17,0	1327,5±312,4
R1	777,3±24,6	175,5±19,1	79,4±14,1	1132,9±55,5	1184,3±35,4
R2	676,5±115,0	121,7±23,3	90,2±5,7	921,4±20,3	1119,9±31,0
R3	429,6±52,8	114,0±17,3	60,4±20,0	476,9±12,2	732,9±111,9
R4	394,8±4,0	122,0±10,8	31,7±5,2	575,3±38,4	807,2±28,8

Los cambios en los valores de la actividad metanogénica específica pueden ser relacionados con el desarrollo del proceso de desnitrificación, aunque el valor de DQO:N fue mantenido bajo 15. Los análisis con SIA revelaron una remoción de nitrato de cerca de 80% en R3 y R4 (datos no incluidos). Se observó una evidente disminución de la actividad metanogénica específica en función del aumento en la concentración de nitrato en la alimentación. Esto podría explicarse por el establecimiento de una competición por acetato entre las poblaciones denitrificantes y las metanogénicas, dando lugar a un consorcio con una menor actividad metanogénica acetoclástica específica. Algo similar fue observado para el etanol y para la mezcla de H₂/CO₂, pero no fue tan evidente en presencia de propionato y butirato.

El hecho de que los valores de la actividad metanogénica específica cambien de esta forma sugiere que el fenómeno es más complejo que una simple competición por sustrato. Posiblemente exista una inhibición por nitrato, nitrito u otro intermediario (aunque no haya sido detectado).

Aunque no se observaron grandes alteraciones en las características morfológicas en los gránulos de R1 y R2 o en su *performance*, si se detectaron diferencias considerables en la superficie de los gránulos de R3 y R4: la superficie de los gránulos pasó de ser lisa y definida (Figura 1A), a ser completamente irregular (Figura 1B) debido al crecimiento de estructuras filamentosas (Figura 1C). Los resultados del análisis de imagen mostraron un incremento de las estructuras filamentosas en R3 y R4. Este incremento fue mucho más acentuado en R4, donde la carga de nitrato fue mayor. El crecimiento de estas estructuras filamentosas provocó cambios en los valores de LfA: de 32.1 mm^{-1} del inóculo, a 138.6 mm^{-1} y 77.1 mm^{-1} para el lodo de la muestra del final del período de operación en R3 y R4 respectivamente. También fueron detectados cambios en el valor del área total proyectada y en la longitud total de los filamentos, que variaron en forma diferente en R3 y R4. Estos dos reactores mostraron un incremento en el diámetro de los gránulos. El parámetro LfA fue un buen indicador de los cambios inducidos en la biomasa durante la operación de los reactores.

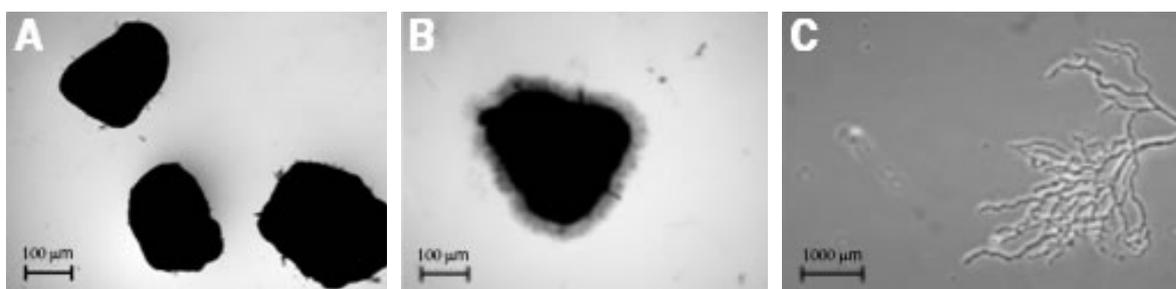


Figura 1 – (A) Imagen del stereomicroscopio (15x) de gránulos del inóculo utilizado para todos los reactores. (B) Imagen del stereomicroscopio (15x) de un gránulo de R4. (C) Imagen de microscopio en contraste de fase (100x) de las estructuras filamentosas que crecieron en la biomasa de R4.

Aunque en el efluente de R1 y R2 el contenido de SSV fue mínimo, en R3 y R4 varió entre 0.02 hasta un máximo de 0.07 gSSV/L y entre 0.02 hasta un máximo de 0.14 gSSV/L, respectivamente. Los valores de LfA mostraron un incremento acorde al incremento de SSV en el efluente de R2 y R3. Sin embargo en R4 este incremento no se verificó. Si se analizan los datos por separado (datos no incluidos) se puede ver que la tendencia del aumento del valor de la longitud de los filamentos se mantuvo desde R2 hasta R4. Lo mismo se observó en el valor del área total proyectada en R2 y R3, pero no en R4. En R4 los gránulos no aumentaron tanto de tamaño como en R3 (pero más que R2), lo que se tradujo en un aumento menor de LfA comparado con el valor del inóculo. En la Tabla 2 se resumen los valores promedio de las concentraciones de SSV en cada reactor, así como también los valores de LfA y las correspondientes velocidades de sedimentación. Los perfiles de velocidades de sedimentación para R1, R2 y R3 no fueron muy diferentes del perfil del inóculo. R4, además de mostrar un perfil diferente, también mostró un perfil con valores menores para el máximo y el promedio de la velocidad de sedimentación. También mostró una reducción en el porcentaje de gránulos con mayores velocidades de sedimentación, probablemente debido al cambio en la densidad de los gránulos provocada por las estructuras filamentosas. La Figura 2 muestra los histogramas de la velocidad de sedimentación del inóculo y del lodo de R4 al final del período de operación.

Tabla 2 – Concentración de nitrato, valores de LfA, rangos de concentración de SSV y valores máximos, mínimos y promedio de la velocidad de sedimentación.

Reactor	Nitrato (mg/L)	LfA (mm ⁻¹)	SSV out (gSSV/L)	V _{sedim} (m/h)		
				Promedio	Max	Min
Inóculo	-	32,1	-	51,5	107,8	12,0
R1	0	42,0	-	52,0	103,3	14,8
R2	20	102,6	-	52,7	114,2	17,3
R3	60	138,6	0.02-0.07	55,6	107,9	15,5
R4	100	77,1	0.02-0.14	45,9	97,5	13,0

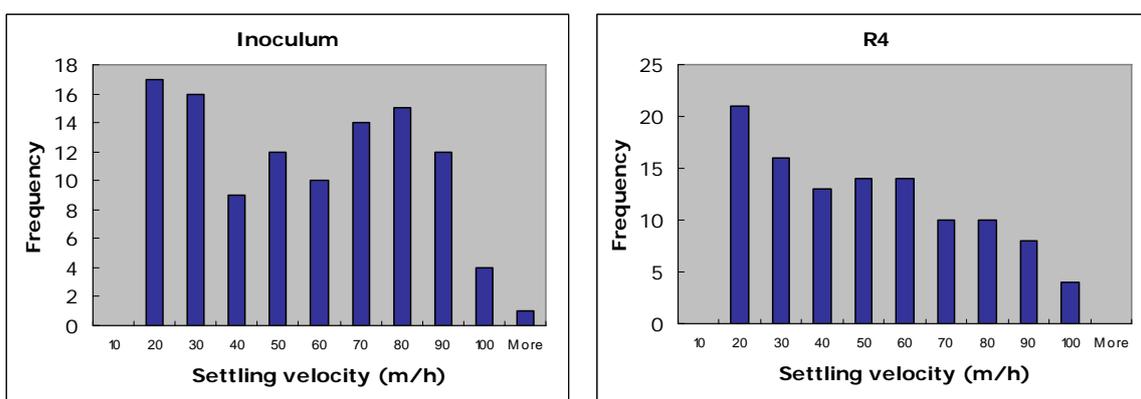


Figura 2 – Histogramas de velocidades de sedimentación del inóculo y de R4 al final del período de operación.

Conclusiones

Las mediciones de actividad metanogénica específica mostraron que la presencia de nitrato afectó en diferentes niveles a los diferentes grupos tróficos del consorcio anaerobio.

El parámetro LfA mostró ser suficientemente sensible para detectar cambios morfológicos en la biomasa granular inducidos por la presencia de nitrato a diferentes concentraciones.

Aunque el crecimiento de estructuras filamentosas en la superficie de los gránulos fue evidente, no hubo una disminución notable en la velocidad de sedimentación de los gránulos, probablemente porque durante el período de operación los gránulos crecieron en tamaño. En el reactor R4 se observó un mayor *washout* que en R1, R2 y R3.

Agradecimientos: P. Araya Kroff y A.L. Amaral fueron financiados por becas de doctorado SFRH/BD/3187/2000 y PRAXIS XXI/BD/20325/99 de la Fundação para a Ciência e Tecnologia do Ministério para a Ciência e Tecnologia de Portugal, respectivamente.

Referencias

Amaral, A.L. (2003) Image Analysis in Biotechnological Processes: Applications to Wastewater Treatment. PhD thesis, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Araya-Kroff, P., Amaral, A.L., Neves, L., Ferreira, E.C., Pons, M.-N., Mota, M., Alves, M. M. 2004. Development of image analysis techniques as a tool to detect and quantify morphological changes in anaerobic sludge: I. Application to a granulation process. *Biotechnology and Bioengineering* 87:2, 184-193, 2004.

Colleran, E., Concannon, F., Goldem, T., Geoghegan, F., Crumlish, B., Killilea, E., Henry, M., and Coates, J. (1992) Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Wat. Sci. Technol.*, 25, 31-40.