

CONCENTRACIÓN DE BIOPELÍCULA Y EFICIENCIA DE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO EMPACADO CON DOS NUEVOS MATERIALES DE SOPORTE

Biofilm concentration and efficiency of a fluidised-bed reactor packed with two novel support materials

RA Saucedo ✉, LI Manzanares, VG Nevárez, RG Bautista, F Solís, L Córdoba, J Carrasco, C Andrade

(RAS) Campo Experimental Campana-Madera. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias. Ave. Homero No. 3744. Frac. El Vergel. Chihuahua, Chih., México. C.P. 31100. saucedo.ruben@inifap.gob.mx. (LTM) Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Chihuahua, Chih., México. (VGN, CA) Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih., México. (RGB) División de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tab., México. (FS, LC, JC) Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih., México

Artículo recibido: 25 de enero de 2005, **aceptado:** 22 de septiembre de 2007

RESUMEN. La estabilización de la biopelícula es clave en la operación de reactores de lecho fluidizado. Se determinaron las variaciones en la concentración de biopelícula como efecto del material de soporte en un reactor experimental y su relación con la eficiencia de tratamiento de agua residual sintética. El reactor consistió en una columna de 8.9 cm de diámetro y 90 cm de altura. Se utilizaron dos materiales de soporte: poliéster-perlita expandida y perlita vitrificada. La concentración de biopelícula se determinó mediante el monitoreo de proteínas (PR), carbohidratos (CS) y conteos de bacterias mesófilicas aeróbicas (BT), proteolíticas (BP), amilolíticas (BA), lipolíticas (BL) y formadoras de exopolisacáridos (EPS). Con un microscopio de barrido se observó la estructura de la biopelícula y los tipos de microorganismos predominantes. Se observó una importante actividad microbiológica en poliéster-perlita expandida y perlita vitrificada desde el primer día de operación. Las concentraciones de PR + CS se situaron entre 40 y 70 $\mu\text{g g}^{-1}$ de material de soporte. Las poblaciones bacterianas mostraron una alta correlación entre sí, situándose BT, BP y BA entre 7.5 y 8.5 logaritmo de unidades formadoras de colonias (log UFC) y BL y EPS entre 6.2 y 7.2 log UFC g^{-1} de biomasa húmeda. Las remociones de DQO fueron concomitantes con las concentraciones de biopelícula, sin diferencias ($p < 0.01$) entre materiales de soporte. En poliéster-perlita expandida se observaron bacterias esféricas y cilíndricas, en perlita vitrificada predominaron bacterias esféricas. El reactor operó de manera continua, eliminando el exceso de biomasa sin aplicar lavados del lecho.

Palabras clave: Agua residual, DQO, lecho fluidizado, materiales de soporte, bacterias.

ABSTRACT. Biofilm stabilisation is a key issue in the performance of fluidised-bed reactors. The effect of two support materials on variations in biofilm concentration and the relationship with synthetic wastewater treatment efficiency were determined in an experimental reactor. The reactor was made with an 8.9 cm diameter and 90 cm high acrylic column. Polyester plus expanded perlite particles, and vitrified perlite particles, were used as support materials. Biofilm growth was determined by monitoring biofilm proteins (PR) and carbohydrates (CS), and counting aerobic mesophilic (BT), proteolytic (BP), amilolytic (BA), lipolytic (BL) and exopolysaccharide forming (EPS) bacteria. Biofilm structure and the types of predominant microorganisms were observed via scanning electron microscopy. Important microbiological activity was observed from the first day of operation onwards in polyester plus expanded perlite and vitrified perlite. PR plus CS concentrations varied between 40 and 70 $\mu\text{g g}^{-1}$ of support material. Bacterial populations were highly intercorrelated. BT, BP and BA counts varied from 7.5 to 8.5 logarithm of colony forming units (log CFU), and BL and EPS counts were between 6.2 and 7.2 log CFU g^{-1} of fresh biomass. COD removal rates were not different from biofilm concentrations ($p < 0.01$) regarding the support materials. Spherical and cylindrical bacteria were observed in polyester plus expanded perlite particles, whereas spherical bacteria predominated in vitrified perlite particles. The reactor operated continuously, eliminating the excess of biomass without the need for bed backwashing.

Key words: Wastewater, COD, fluidised bed, support material, bacteria.

INTRODUCCIÓN

Los procesos de desarrollo y desprendimiento de biomasa constituyen un componente fundamental en el funcionamiento de los reactores trifásicos de lecho fluidizado. Un balance apropiado entre dichos procesos permite no sólo mantener un contenido óptimo de microorganismos en el sistema, sino también es condición necesaria para sostener el reactor en operación continua (Trinet *et al.* 1991; Larachi *et al.* 2000). La mayor eficiencia en la remoción de sustratos depende en gran medida de la obtención de la cantidad adecuada de biopelícula adherida al material de soporte. Conforme se incrementa la cantidad de microorganismos, mayor es la tasa de remoción del sustrato de acuerdo con la ecuación de Monod, pero existe un nivel crítico en el que la difusión de sustrato, nutrientes u oxígeno puede ser un factor limitante que afecta la tasa de biodegradación (Tchobanoglous & Burton 1996). La máxima tasa de remoción de sustrato ocurre justo antes de que el proceso de difusión se vea limitado (Safferman & Bishop 1996).

La aplicación de altas velocidades de recirculación favorecen el desprendimiento del exceso de biomasa y propician la fluidización del lecho (Jiménez *et al.* 1990; Ryhner *et al.* 1988; Trinet *et al.* 1991). Sin embargo, esas altas tasas de fluido crean a menudo un efecto de recorte hidrodinámico lo que conduce a una pérdida excesiva de biopelícula (Fox *et al.* 1990; Schreyer & Coughlin 1999; Tavares *et al.* 1995). Por el contrario, cuando se disminuye la velocidad de recirculación, llega un momento en que el reactor se comporta como un lecho fijo, en el que es prácticamente imposible eliminar el exceso de biomasa, conduciendo al estancamiento del lecho (Biggami *et al.* 1991; Rivas *et al.* 2001). Safferman & Bishop (1996) lograron eliminar el exceso de biomasa mediante la inducción de turbulencias periódicas, inyectando agua o aire comprimido dentro del reactor. Tavares *et al.* (1995) utilizaron un material de soporte de baja densidad, cuyo exceso de biomasa era eliminado por el choque entre partículas durante el proceso de fluidización. Lo anterior coincide con lo expresado por Trapaso (1985) quien manipuló la altura del lecho como medio para agitar las partículas en la parte alta del lecho y regresarlas a la parte baja del reactor, después del lavado del exceso de

biopelícula.

A pesar de los avances en el conocimiento sobre el funcionamiento de los reactores trifásicos de lecho fluidizado, una deficiencia importante en este tipo de reactores es la dificultad para operar en forma continua. Esto conduce a la necesidad de implementar diversos esquemas de lavado del lecho y emplear diferentes accesorios, como medio para propiciar la eliminación del exceso de biomasa y prevenir, de ese modo, el estancamiento del reactor. El objetivo de este trabajo fue estudiar las concentraciones de biopelícula en un reactor trifásico de lecho fluidizado empacado con dos materiales de soporte de baja densidad y determinar su efecto sobre la eficiencia del reactor para el tratamiento de agua residual sintética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del reactor

El reactor empleado en este trabajo fue hecho de una columna de material acrílico de 8.9 cm de diámetro interno y 90 cm de altura (Figura 1). Estas dimensiones son óptimas para reducir el efecto de pared y la caída de presión (Ochieng *et al.* 2002; Tsuneda *et al.* 2002). En la parte superior interna del reactor se colocó una malla de acero inoxidable de 2 mm de apertura, 6.9 cm de diámetro y 10 cm de altura, cuya función fue la de separar la biomasa e impedir el paso de las partículas de soporte, con base en el diseño de Safferman & Bishop (1996). La salida del aire fue instalada en el puerto del efluente, con el fin de desprender el exceso de biomasa adherido a la malla de acero. Como sistema de separación de sólidos se instaló un presedimentador para la colecta y purga de lodos, y un sedimentador para reducir el contenido de sólidos suspendidos en el efluente final. El sedimentador estaba conectado en su parte inferior con un tanque de recirculación, cuyo nivel de líquido era controlado a través de una válvula accionada por un flotador. Desde dicho tanque, el precipitado del efluente, sin partículas de soporte, era recirculado al reactor con una bomba centrífuga de 1/50 hp, cuyo flujo era medido con un rotámetro y controlado a través de una válvula de esfera. Este proceso tuvo el fin de recircular la biomasa del efluente así como contribuir a la fluidización del lecho. Como sistema de difusión de aire se diseñó un

plenum de 5 cm de alto ubicado en la parte inferior del reactor, en el cual se inyectaba aire a través de una boquilla de espiga de $\frac{1}{4}$ npt. El aire pasaba a la zona de reacción a través de un disco cerámico poroso compuesto de arcilla (37.5%), alúmina (15.0%), carbonato de magnesio (10.0%) y perlita expandida (37.5%), sinterizado a una temperatura de 1200 °C durante dos horas.

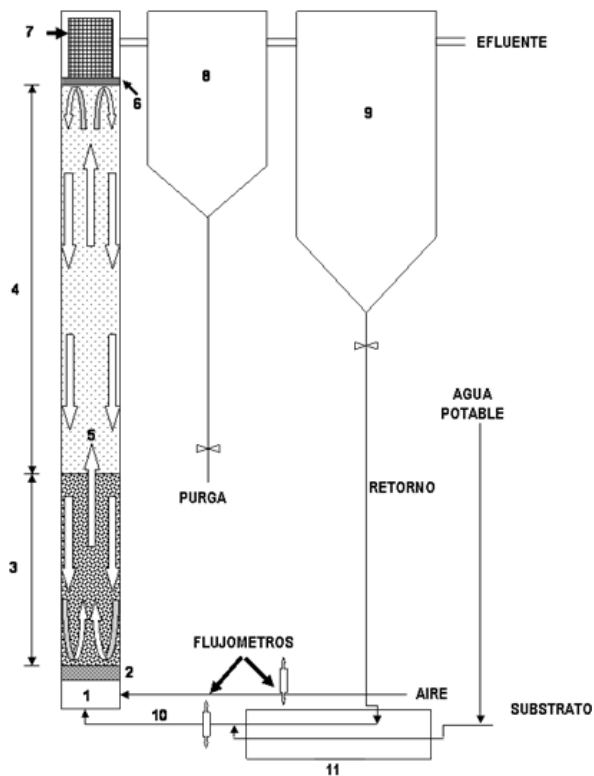


Figura 1. Diagrama del reactor trifásico de lecho fluidizado. 1 Plenum, 2 Disco cerámico, 3 Lecho fluidizado, 4 Lecho expandido, 5 Patrón de fluidización, 6 Empaque de caucho, 7 Separador de biomasa, 8 Pre sedimentador, 9 Sedimentador, 10 Línea de recirculación y 11 Tanque de recirculación.

Figure 1. Three-phase fluidised-bed reactor diagramme. 1 Plenum, 2 Ceramic disc, 3 Fluidised bed, 4 Expanded bed, 5 Fluidisation pattern, 6 Cork packing, 7 Gasket biomass separator, 8 Pre-settler, 9 Settler, 10 Recirculation line and 11 Recirculation tank.

Materiales de soporte

Dos materiales de soporte fueron utilizados: partículas de una mezcla de poliéster con perlita expandida y partículas de perlita vitrificada. El poliéster se mezcló con un 50% (volumen/volumen) de perlita expandida (Carlita M.R.). A la mezcla se agregó etil metil cetona (2% v/v) como catalizador para obtener su solidificación. Cuando la mezcla presentaba un estado gelatinoso se realizaron cortes

con navaja, generando cubos de alrededor de 0.5 cm por lado. Una vez que la mezcla se solidificó, los cubos fueron sometidos a fricción hasta obtener partículas de 2 a 4 mm de diámetro con la mayor esfericidad posible. Dicha fricción se aplicó colocando las partículas en un recipiente cilíndrico, cuyo fondo tenía un disco abrasivo rotatorio (600 rpm), accionado por un motor eléctrico de 0.5 hp. Las partículas de poliéster + perlita tenían una densidad de 1.22 g cm^{-3} . Esta densidad fue seleccionada por haber sido la mínima densidad en la que las partículas no flotaban en ausencia de fuerza de arrastre, después de cinco días de permanencia en el reactor bajo condiciones de operación. La perlita vitrificada fue triturada hasta obtener partículas de 5 a 8 mm de diámetro, mismas que también fueron esferonizadas por fricción. La densidad de las partículas de perlita vitrificada era de 1.76 g cm^{-3} .

Experimentos

Primero se efectuaron dos experimentos de 41 días (B1, B2) en los que se determinó la eficiencia de remoción de materia orgánica y la capacidad de eliminación de exceso de biomasa como respuesta a incrementos en la concentración del sustrato (210, 280 y 350 mg L^{-1} de DQO), utilizando la mezcla de poliéster + perlita como material de soporte. Posteriormente se llevaron a cabo cinco experimentos de 21 días, dos con poliéster + perlita (C1, C2) y tres con perlita vitrificada (C3-C5), en los que conjuntamente con los primeros 21 días de los experimentos B1 y B2 se estudiaron los indicadores de crecimiento de la biopelícula y su relación con la eficiencia del sistema. Finalmente se efectuaron cuatro experimentos de 21 días de duración, dos con poliéster + perlita (D1, D2) y dos con perlita vitrificada (D3, D4) en los que se efectuó un balance de biomasa en el reactor. La concentración del sustrato en los experimentos C1-5 y D1-4, fue de 210 mg L^{-1} de DQO. El sustrato utilizado consistió en agua residual sintética, la cual se elaboró a partir de la fórmula de Tavares *et al.* (1995). Esta consistió en un concentrado de dextrosa (30.3%), glicerol (30.3%), extracto de carne (30.3%), urea (6.06%) y KH_2PO_4 (3.03%). El concentrado se mantuvo bajo refrigeración (4 °C) y fue introducido al reactor por acción de una bomba de diafragma. El concentrado fue diluido antes con agua potable hasta alcanzar las concentraciones

nes deseadas de DQO. Aunque no se llevó a cabo una inoculación intencional, al inicio de las corridas experimentales había presencia de bacterias en el reactor; las provenientes del medio ambiente, del agua y del sustrato, y las remanentes en el material de soporte después de cada corrida experimental.

Condiciones de operación

La altura estática del lecho fue de 30 cm, correspondiente a un 24% del volumen de la zona de reacción. La fluidización del lecho se efectuó mediante el ajuste de la velocidad de recirculación de la fase líquida hasta llegar a un caudal final de 1.7 L min⁻¹ para el lecho de poliéster + perlita y de 1.8 L min⁻¹ para el de perlita vitrificada. El flujo del influente fue de 0.14 L min⁻¹. El tiempo de retención hidráulica fue de 30 min. La temperatura del reactor se mantuvo constante (25.7 ± 0.21 °C), colocando un calentador eléctrico con termostato en el tanque de recirculación. La oxigenación del sistema se llevó a cabo mediante la aplicación de aire comprimido bajo un caudal de 1.2 L min⁻¹ y una velocidad superficial de 10 m h⁻¹.

Variables de respuesta y técnicas de análisis

La biomasa adherida al medio de soporte se evaluó mediante el monitoreo de la concentración de proteínas y polisacáridos, principales componentes bioquímicos de la biopelícula (Characklis *et al.* 1982). Las muestras de biopartículas de un volumen aproximado de 100 ml se obtuvieron introduciendo un tubo de pvc de 1" de diámetro hasta el fondo del reactor. En la parte inferior del tubo había una tapa de caucho que se abría y se cerraba mediante una varilla de acero inoxidable. Los muestreos se efectuaron cada 48 horas y cada muestra fue analizada por sextuplicado. Las muestras fueron centrifugadas (1200 rpm) con el fin de separar la biopelícula y proceder a su análisis. Después de eliminar el sobrenadante, el precipitado fue rehidratado hasta un volumen de 1 ml. La concentración de proteínas se determinó siguiendo la técnica de Bradford (Burden & Whitney 1995). Una curva patrón se construyó usando albúmina sérica bovina (ABS) como referencia. Las lecturas de la reacción colorida se llevaron a cabo a 590 nm en un lector de microplacas (Biorad Modelo 560). Los polisacáridos se analizaron mediante la técnica de Dubois *et al.* (1956). Una curva

patrón se construyó usando glucosa como referencia. Las lecturas se llevaron a cabo a 480 nm en el lector de microplacas mencionado. Los contenidos de proteínas y carbohidratos fueron transformados a masa dividiendo ambas concentraciones entre el peso seco de las muestras de partículas.

Los conteos bacterianos se efectuaron cada cinco días, tomando una muestra de 100 ml de biopartículas de la que se obtuvo una alícuota de 1 g (peso drenado). La alícuota fue colocada en 9 ml de una solución estéril de fosfato 0.2 M, desprendiendo la biopelícula mediante agitación por vortex. De la suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta una final de 1x10⁻⁸, de la cual se usó 1 ml para cuantificación de mesofílicas totales y 0.1 ml para el resto de los tipos de bacterias, inoculando por duplicado en cajas petri desechables. Los medios de cultivo empleados fueron: Agar cuenta estándar para cuantificación de bacterias mesofílicas totales (Ben-Omar & Ampe 2000), agar de leche descremada para proteolíticas (Anónimo 1992), agar de hidrólisis de almidón para amilolíticas (Atlas 1997), agar de tributirina para lipolíticas (Atlas 1997) y medio para productoras de exopolisacáridos (Ben-Omar & Ampe 2000). Las placas se incubaron a temperatura ambiente (20 a 30 °C) por 48 horas, procediendo a su conteo mediante un contador de colonias.

Las determinaciones de DQO se efectuaron siguiendo la técnica normalizada de oxidación de dicromato de potasio (Ramalho 1996). Los sólidos suspendidos volátiles se determinaron en muestras del licor mezclado, en biopartículas y en el efluente final, siguiendo las técnicas convencionales (Anónimo 1989). En las biopartículas, los sólidos se determinaron a partir de la biopelícula adherida a ellas, la cual fue extraída y cuantificada siguiendo la misma metodología empleada para la determinación de proteínas y carbohidratos. Las observaciones microscópicas se efectuaron en 10 muestras de biopartículas, mismas que fueron tratadas con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio. Luego fueron cubiertas con papel aluminio para evitar el paso de la luz y almacenadas en refrigeración durante dos horas; después se lavó dos veces consecutivas con cacodilato de sodio 0.1 M, continuando almacenadas con cacodilato de sodio y en refrigeración hasta la preparación final para su observación en el microscopio, de acuerdo a las técnicas descritas por

Dykstra (1993) y Stewart *et al.* (1995). La observación se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-5410LV.

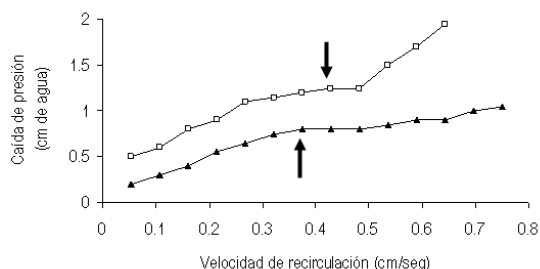


Figura 2. Desempeño del lecho en un reactor trifásico de lecho fluidizado empacado con dos materiales de soporte, bajo diferentes velocidades de recirculación de la fase líquida. Las flechas indican la zona de fluidización. □ Perлита vitrificada ▲ Poliéster + perлита

Figure 2. Bed performance in a three-phase fluidised-bed reactor packed with two support materials with different recirculation speeds for the liquid phase. □ Vitrified perlite, ▲ Polyester+perlite.

La información fue analizada estadísticamente con base en un diseño completamente al azar y un arreglo factorial de mediciones repetidas (Winer 1971). La comparación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de Student. El estudio de la relación entre la eficiencia del reactor y los cambios en los indicadores de crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante la determinación de coeficientes de correlación de Pearson (Steel & Torrie 1985).

RESULTADOS

Los dos materiales de soporte evaluados fueron fácilmente fluidizables, aún con velocidades de recirculación por debajo de las registradas para materiales de soporte de baja densidad (Tavares *et al.* 1995). La fluidización del lecho se obtuvo a partir de una velocidad de recirculación de 0.45 cm seg^{-1} para el lecho de poliéster y de 0.55 cm seg^{-1} para el de perлита vitrificada (Figura 2). La fluidización del lecho ejerció un papel fundamental en la prevención del estancamiento del reactor, dado que propició un movimiento de las biopartículas con la suficiente fuerza de arrastre para evitar la coagulación del lecho por la adhesión de biomasa. La fluidización obtenida consistió en un flujo ascendente por el centro del reactor causado por el efecto sinérgico de arrastre de la recirculación de la fase líquida y las

burbujas de aire, seguido de un flujo descendente por las paredes hasta llegar al fondo del reactor.

Desde las primeras 24 horas de operación se observó una importante actividad microbológica, tanto en términos de cantidad de biopelícula como en la disminución del contenido de DQO en el efluente, independientemente del material de soporte. La cantidad de biopelícula adherida al material de soporte durante el segundo día de operación, expresada por el contenido de proteínas + carbohidratos, mostró valores aproximados de 40 y $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de material de soporte en el lecho de poliéster + perлита y en el de perлита vitrificada, respectivamente (Figura 3). Durante el transcurso del trabajo se observaron importantes variaciones en las concentraciones de biopelícula, correspondiendo al lecho de perлита vitrificada las mayores concentraciones y las mayores variaciones en las mismas, aunque tales concentraciones se situaron la mayor parte del tiempo entre 70 y $40 \mu\text{g g}^{-1}$ de material de soporte en ambos materiales. Al igual que en las concentraciones de proteínas y carbohidratos, en los conteos bacterianos también se encontraron variaciones importantes con respecto al tiempo, mostrando cierta tendencia de estabilización hacia el final de los experimentos. Una alta correlación se estimó entre las poblaciones de gremios bacterianos a través del período de operación, cuyos valores se situaron mayormente entre las seis y las siete $\log \text{ UFC g}^{-1}$ de biomasa húmeda (Figuras 4 y 5). Las bacterias lipolíticas y las productoras de exopolisacáridos mostraron menores poblaciones en comparación al resto de los consorcios, observándose un decremento durante el 10° día de operación, seguida por una tendencia asintótica hacia el final de los experimentos.

Como efecto de la abundante población de bacterias, la DQO presentó una disminución de 90 mg L^{-1} desde el primer día de operación (Figura 6). Posteriormente, la tasa de remoción de DQO presentó un incremento, que alcanzó un punto máximo en el 13° día, a partir del cual se observó un ligero decremento. Las máximas tasas de remoción de materia orgánica (79% de la DQO) se obtuvieron de los 23 a los 29 días de operación, cuando la concentración de la DQO en el influente se incrementó a 280 mg L^{-1} . Esta última concentración resultó muy próxima a la máxima carga orgánica bajo la cual los reactores de lecho fluidizado alcanzan su

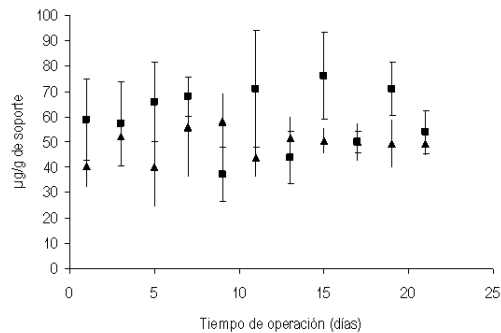


Figura 3. Concentraciones de proteína+carbohidratos como indicadores de crecimiento de la biopelícula en un reactor trifásico de lecho fluidizado empacado con dos materiales de soporte, usando agua residual sintética como sustrato a una temperatura de 25 °C. Las barras indican el error estándar de las medias dentro de tratamientos. ▲ Poliéster + perlita □ Perlita vitrificada.
Figure 3. Protein+carbohydrate concentrations as indicators of biofilm growth in a three-phase fluidised-bed reactor packed with two support materials using synthetic wastewater as substrate at 25 °C. The bars indicate the mean standard error within treatments. ▲ Polyester+perlite, □ Vitrified perlite.

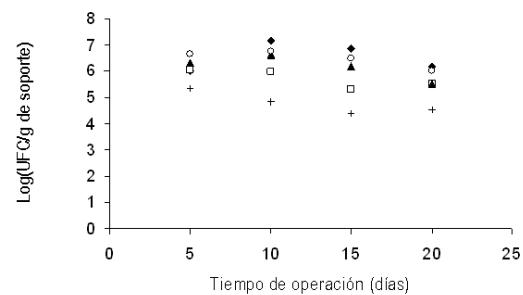


Figura 5. Cambios en la población de consorcios bacterianos en un reactor trifásico de lecho fluidizado empacado con partículas de perlita vitrificada, usando agua residual sintética como sustrato a una temperatura de 25 °C. ◆ Totales □ Lipolíticos ▲ Proteolíticos ○ Amilolíticos + Exopolisacáridos.
Figure 5. Changes in the populations of bacterial guilds in a three-phase fluidised-bed reactor packed with vitrified perlite using synthetic wastewater as substrate at 25 °C. Bacteria: ◆ Total, □ Lipolitic, ▲ Proteolytic, ○ Amilolytic, + Exopolysaccharide forming.

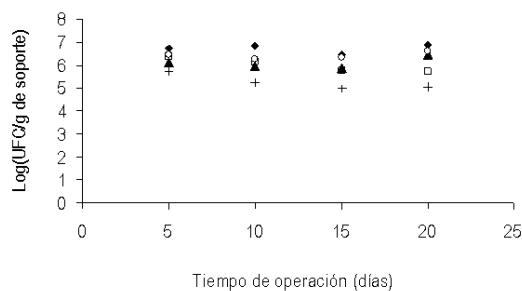


Figura 4. Cambios en la población de consorcios bacterianos en un reactor trifásico de lecho fluidizado empacado con partículas de poliéster + perlita, usando agua residual sintética como sustrato a una temperatura de 25 °C. ◆ Totales □ Lipolíticos ▲ Proteolíticos ○ Amilolíticos + Exopolisacáridos.
Figure 4. Changes in the populations of bacterial guilds in a three-phase fluidised-bed reactor packed with polyester+perlite using synthetic wastewater as substrate at 25 °C. Bacteria: ◆ Total, □ Lipolitic, ▲ Proteolytic, ○ Amilolytic, + Exopolysaccharide forming.

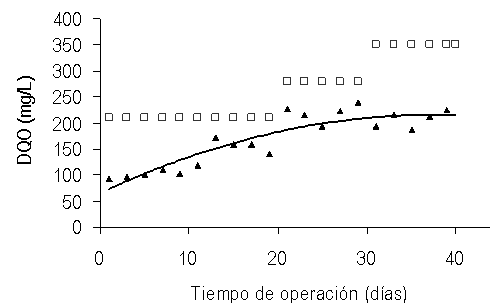


Figura 6. Efecto de la concentración de DQO en el influente sobre la eficiencia del sistema. Los valores son promedios de dos experimentos en los que se utilizó la mezcla poliéster+ perlita como material de soporte. □ Influyente ▲ Removida.
Figure 6. Effect of influent COD concentration on system efficiency. The values are averages for two experiments where polyester+perlite particles were used as support material. □ Influent, ▲ Removed.

óptimo de operación, aunque la capacidad de tratamiento se puede incrementar al emplear mayores tiempos de retención hidráulica (Sutton & Mishra 1990; Ochieng *et al.* 2002). Después del 30° día, a partir del cual se aplicó la mayor concentración de DQO en el influente, la tasa de remoción de DQO disminuyó, alcanzando niveles de eficiencia menores a los obtenidos en los días anteriores.

Los dos materiales de soporte evaluados mostraron niveles de eficiencia similares, resultando li-

geramente superior la mezcla de poliéster+perlita hacia el final de las corridas experimentales (Figura 7). No obstante, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el efecto de los materiales de soporte ni en su interacción con el tiempo de operación. Desde el primer día de operación se observó una importante eficiencia de remoción de materia orgánica, habiéndose removido alrededor del 60% de la DQO en ambos materiales. El reactor empacado con poliéster+perlita mostró

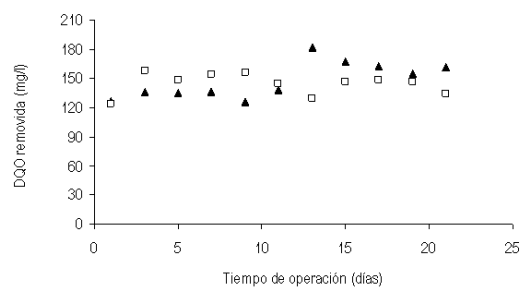


Figura 7. Eficiencia en la remoción de DQO en un reactor trifásico de lecho fluidizado empacado con dos materiales de soporte. □ Perlita vitrificada ▲ Poliéster + perlita.
Figure 7. COD removal efficiency in a three-phase fluidised-bed reactor packed with two support materials. □ Vitrified perlite, ▲ Polyester+perlite.

niveles de eficiencia de alrededor del 65 % durante los primeros 13 días de operación, los cuales se incrementaron ligeramente en el décimo tercer día a partir del cual el promedio de remoción de DQO fue de alrededor de 80 %. En cuanto a la perlita vitrificada, su eficiencia se incrementó ligeramente con respecto al primer día de operación, y mostró una eficiencia aproximada de 70 % de remoción de DQO a lo largo del estudio.

La eficiencia del reactor no mostró una correlación significativa con alguno de los indicadores de concentración de biomasa. No obstante, en términos descriptivos, la mayor eficiencia del reactor estuvo relacionada con valores de medios a altos de concentración de biopelícula. Por otro lado, la capacidad de remoción de materia orgánica nunca se vio limitada por la presentación de un exceso de biopelícula en el reactor, lo que confirma la buena eficiencia del sistema para eliminar la biomasa excedente.

Las mayores concentraciones de sólidos volátiles y las mayores variaciones en tales concentraciones se observaron en el lecho de poliéster + perlita. Sus máximos de concentración se situaron entre 50 y 70 mg L⁻¹ y alcanzaron un máximo de más de 100 mg L⁻¹ en el 19° día de operación (Figura 8). Al igual que en el reactor con lecho de poliéster+perlita, en el reactor empacado con perlita vitrificada los sólidos volátiles tendieron a incrementarse durante los primeros 15 días de operación, alcanzando una concentración máxima de alrededor de 40 mg L⁻¹ hacia el final del tiempo de operación del reactor.

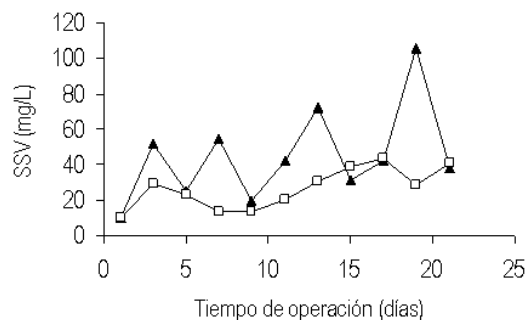


Figura 8. Cambios en la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el reactor empacado con dos materiales de soporte. ▲ Poliéster + perlita □ Perlita vitrificada.
Figure 8. Changes in the concentration of volatile suspended solids in a reactor packed with two support materials. ▲ Polyester+perlite, □ Vitrified perlite.

Las micrografías de las partículas de los dos materiales de soporte permitieron observar la presencia de importantes cantidades de bacterias desde los primeros cinco días de operación (Figuras 9 y 10). En las partículas de perlita vitrificada se observó que la colonización por bacterias se llevó a cabo principalmente en grietas y concavidades, quedando sin colonizar las partes más expuestas como protuberancias y superficies lisas. A 40 días del inicio de la operación del reactor, la colonización se extendió cubriendo casi la totalidad de la superficie de las partículas de poliéster+perlita. En las micrografías destacaron también diferencias importantes en la superficie de los materiales de soporte. La mezcla de poliéster + perlita mostró una superficie más irregular, con concavidades numerosas y pequeñas, a diferencia de la perlita vitrificada cuya superficie estuvo mayormente constituida por cráteres de entre 50 y 200 μm de diámetro así como por importantes áreas de superficie lisa.

Otro aspecto importante de la distribución de las bacterias sobre las partículas fue su carácter segregacionista (Figura 9), ya que se observaron áreas con presencia de bacterias de forma esférica (cocos) o de forma cilíndrica (bacilos y espirilos) pero nunca aparecieron mezcladas. De hecho, resultó fácil identificar los límites entre una y otra comunidad, existiendo también extensas áreas de la partícula en que sólo están presentes bacterias esféricas, sobre todo en aquellas áreas de biopelícula mas gruesa, formada por capas múltiples de bacterias. Contrastando con lo observado en las partículas de poliéster+perlita,

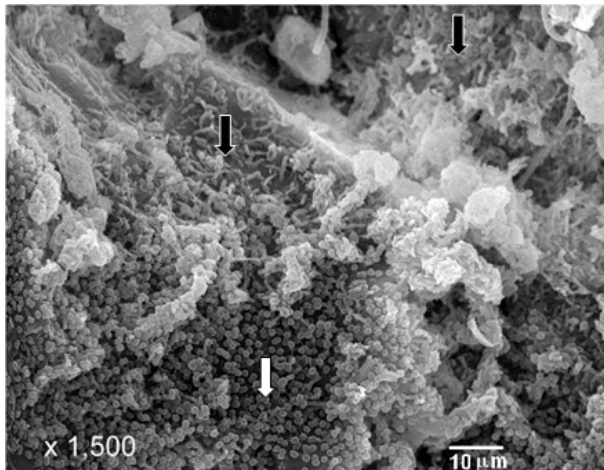


Figura 9. Micrografías de partículas de poliéster + perlita colonizadas por bacterias. Flechas blancas y negras indican comunidades de cocos y bacilos, respectivamente. ▲ Poliéster + perlita □ Perlita vitrificada.

Figure 9. SEM micrographs of polyester+perlite particles colonised by bacteria. White and black arrows indicate spherical and cylindrical bacteria communities, respectively.

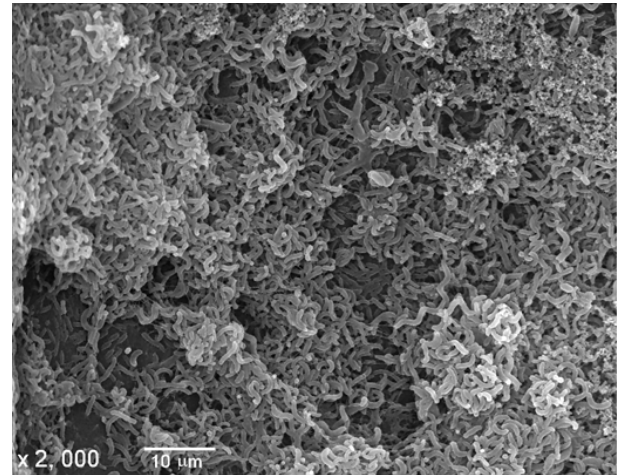


Figura 10. Micrografías de partículas de perlita vitrificada colonizadas predominantemente por bacilos y espirilos.

Figure 10. SEM micrographs of polyester+perlite particles colonised by bacteria. SEM micrographs of vitrified perlite particles predominantly colonised by communities of cylindrical bacteria.

en las partículas de perlita vitrificada predominaron las bacterias de forma cilíndrica, principalmente bacilos y espirilos (Figura 10).

DISCUSIÓN

Las velocidades de recirculación requeridas para obtener la fluidización del lecho resultaron teóricamente mayores que la mínima velocidad de fluidización; de acuerdo con la caída de presión en el reactor, la mínima velocidad de fluidización para las partículas de poliéster+ perlita y para las de perlita vitrificada fue de 0.35 cm seg^{-1} y de 0.45 cm seg^{-1} , respectivamente. Durante la fluidización, las biopartículas perdían parte de su biopelícula al llegar a la parte superior del reactor por efecto de la turbulencia creada por las burbujas de aire, por la fricción contra la malla de acero, así como por la abrasión causada por la colisión entre partículas. Este último fue el mecanismo clave para el desprendimiento del exceso de biopelícula, de acuerdo con lo citado por Nicoletta *et al.* (1997).

Las menores poblaciones de bacterias lipolíticas puede deberse a que este gremio es por lo general menos abundante. Pudiera también haber influido el hecho de que el contenido de grasas en el sustrato fue considerablemente menor que el resto

de los componentes, aunque es sabido que un mayor o menor contenido de componentes bioquímicos no repercute en los gremios bacterianos, ya que si bien es cierto que cada tipo de bacteria tiene una actividad metabólica preferencial, esto no significa que la bacteria en particular sea estrictamente lipolítica o proteolítica (White *et al.* 1997; Caldwell *et al.* 1997). En lo que respecta a las productoras de exopolisacáridos, la literatura señala que este tipo de microorganismos juega un papel fundamental en la formación de la matriz de la biopelícula durante las primeras etapas de colonización (Bakke *et al.* 2001). Esa puede ser la razón de la disminución en su población observada en el transcurso de las corridas experimentales, ya que a pesar de que durante los períodos posteriores a la estabilización de la biopelícula la actividad de productoras de exopolisacáridos continúa, dicha actividad debe ser menor a la de las etapas de colonización, la cual normalmente se lleva a cabo durante los primeros cuatro días de operación (Davey & O'Toole 2000; Costerton *et al.* 1994).

La disminución en la tasa de remoción de la DQO registrada a partir del trigésimo día de operación puede atribuirse a la presentación de una segunda fase de adaptación de los microorganismos por el cambio en la concentración del sustrato. En

ese sentido, no se descarta un efecto inhibitor del sustrato, de acuerdo con lo expresado por Tavares *et al.* (1995). Por otro lado, las tendencias en la población microbiana y en las tasas de remoción de DQO mostraron que la eficiencia del reactor tuvo un desempeño estrechamente relacionado con la actividad microbiana. Por otro lado, en este tipo de reactores es común la variación en la concentración de biomasa. Al término de los primeros 10 días se presenta la etapa conocida como falso estado de condiciones estables, caracterizada por una aparente estabilidad en la actividad microbiana biopelicular. No obstante, tanto la densidad como el espesor de la biopelícula continúan incrementándose hasta llegar a un estado verdadero de condiciones estables, el cual aparece de los 18 a los 21 días (Bakke *et al.* 2001, Lewandowski *et al.* 1999).

En la eficiencia de los reactores de lecho fluidizado influyen tanto los altos como los bajos contenidos de biopelícula. Bajo condiciones de biopelícula abundante se presentan limitaciones en la difusión de nutrientes y oxígeno. Cuando la biopelícula es escasa, también lo es la población de microorganismos consumidores. Por otro lado, en estos reactores actúan de manera conjunta la biomasa adherida al material de soporte y la suspendida en la fase líquida (Jeris *et al.* 1977; Stathis 1980; Shieh *et al.* 1981). Por lo tanto, la biomasa suspendida, cuya concentración no fue cuantificada en este trabajo, juega también un papel importante en la degradación de la materia orgánica y confunde los efectos de las variables estudiadas. Así mismo, resulta importante señalar que, en los trabajos consultados, la relación de la eficiencia con los indicadores de biomasa se establece en términos descriptivos, careciendo del uso de parámetros estadísticos indicadores del grado de precisión, sólo en un trabajo se mencionó que la remoción de DQO no se correlacionó bien con el espesor de la biopelícula (Safferman & Bishop 1996).

De la similitud en las tendencias de las concentraciones de sólidos suspendidos volátiles se puede afirmar que prácticamente las mismas cantidades de sólidos volátiles que se producían en el reactor, y por lo tanto de biopelícula, eran eliminadas del reactor, contribuyendo a la estabilidad del sistema sin la necesidad de aplicar labores de lavado del lecho lo que significa una importante contribución al mejoramiento del desempeño de los reactores aerobios de

lecho fluidizado. Comúnmente, el exceso de biomasa se elimina mediante agitación mecánica aplicando corrientes de agua a alta presión o aire comprimido dentro del reactor o bien, en un reactor complementario (Sutton & Mishra, 1990; Safferman & Bishop 1996). Lo anterior, además de mayores consumos de energía, representa también una disminución en la eficiencia del reactor, dados los tiempos muertos que se presentan en cada ciclo de lavado.

Las menores concentraciones de sólidos volátiles en el lecho de perlita vitrificada pueden atribuirse al hecho de que este material tuvo una mayor velocidad de recirculación, lo que pudo causar un mayor desprendimiento de biopelícula. Aunque estadísticamente no se encontraron diferencias en la remoción de DQO entre los materiales de soporte, las diferencias en términos descriptivos pudieron ser el reflejo de la cantidad de sólidos volátiles encontrada en cada material de soporte. Los sólidos suspendidos volátiles corresponden a lodos biológicos, razón por la cual son ampliamente utilizados como indicadores de crecimiento bacteriano (Ramalho 1996; Tchobanoglous & Burton 1996; Tsuneda *et al.* 2002).

Durante las primeras etapas de colonización en la formación de la biopelícula, la fijación de bacterias se lleva a cabo principalmente en concavidades, grietas y en las partes más rugosas de la superficie de las partículas de soporte, donde la biopelícula se ve más protegida del efecto de afeitado causado por la fluidización del lecho (Massol-Deya *et al.* 1995; Safferman & Bishop 1996). De acuerdo con Nicolella *et al.* (1997) la biopelícula se acumula por adsorción, adhesión, crecimiento y desprendimiento. El desprendimiento es causado por procesos ligados al movimiento del lecho como erosión y abrasión. Respecto a las diferencias en el tipo de bacterias, los principales factores determinantes son la composición química de las aguas residuales, la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH del agua (Brock 1993; Tchobanoglous & Burton 1996). Una diferencia importante en las condiciones de operación fue la mayor velocidad de recirculación aplicada a la perlita vitrificada y quizá este fue el factor determinante de las diferencias en el tipo de bacterias presentes en ambos materiales de soporte. En ese sentido, se ha encontrado que la estructura de las biopelículas se altera bajo diferentes regímenes hidrodinámicos. Bajo un flujo laminar, las biopelículas forman par-

ches de agregados de células rugosas y redondas; en flujos turbulentos, las células también se disponen en parches pero su forma es mayormente elongada (Stoodley *et al.* 1998).

Con base en los resultados de este estudio se concluye que los mayores niveles de eficiencia del reactor estuvieron relacionados con las más altas concentraciones de biopelícula. Los dos materiales de soporte evaluados favorecieron la obtención de un régimen de fluidización altamente eficiente en la eliminación del exceso de biomasa. Como consecuencia de lo anterior, el reactor funcionó en forma continua hasta por 41 días, sin la necesidad de efectuar lavados del lecho y sin demérito de la eficiencia

de tratamiento. Es necesario complementar los estudios de crecimiento de la película con la determinación de propiedades electrostáticas y de tensión superficial de los materiales de soporte evaluados.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Rubio Arias, por sus atinados comentarios sobre el manuscrito, así como a Abril Paloma Carrasco, Amarabi Cano Jiménez, José Alberto Moreno Baca y Jorge Sáenz Peinado, por su invaluable colaboración en el desarrollo de los análisis de laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Anónimo (1989) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater., 17th Ed., American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.: 2.78-2.88.
- Anónimo (1992) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Washington, D.C. 702 pp.
- Atlas RM (1992) Handbook of microbiological Media. CRC Press (ed). Boca Ratón. 1760 pp.
- Bakke R, Kommendal SR, Kalvenes S (2001) Quantification of Biofilm Accumulation by an Optical Approach. *Journal of Microbiological Methods* 44: 13-26.
- Ben-Omar N, Ampe F (2000) Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied Environmental Microbiology* 66 (6): 3664-3673.
- Bignami L, Eramo B, Gavasci R, Ramadori R, Rolle E (1991) Modelling and experiments on fluidized-bed biofilm reactors. *Water Science and Technology* 24: 47-58.
- Brock TD (1993) *Microbiología*. Prentice May. D.F. 956 p.
- Burden DW, Whitney DB (1995) *Biotechnology: Proteins to PCR*. Birkhauser, Boston: 54-57.
- Caldwell ED, Wolfaardt GM, Korber DR, Lawrence JR (1997) Cultivation of Microbial Consortia and Communities. En: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst ChJ (ed) ASM Press. Washington, D.C: 79-90.
- Characklis WG, Trulear MG, Bryers JD, Zelven N (1982) Dynamics of Biofilm Processes: Methods. *Water Research* 16: 1207-1216.
- Costerton JW, Lewansowski Z, de Beer D, Caldwell D, Korber D, James G (1994) Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176: 2137-2142.
- Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiological And Molecular Reviews* 64 (4): 847-867.
- Dubois M, Giles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-356.
- Dykstra MJ (1993) *A Manual of Applied Techniques for Biological Electron Microscopy*. Plenum Press. Nueva York. 257 pp.
- Fox P, Suidan MT, Bandy JT (1990) A Comparison of Media Types in Acetate Fed Expanded-Bed Anaerobic Reactors" *Water Research* 24 (7): 827-835.
- Jeris JS, Owens RW, Hickey R, Flood F (1977) Biological fluidized-bed treatment for bod and nitrogen removal. *J. WPCF*: 816-831.

- Jiménez B, Becerril E, Scola I (1990) Denitrification in a Fluidized Bed System Using Low Cost Packing Material. *Environmental Technology* 11: 409-420.
- Larachi F, Iliut I, Rival O, Grandjean BPA (2000) Prediction of Minimum Velocity in Three- Phase Fluidized-Bed Reactors. *Industrial Engineering Chemistry Res.* 39 (2): 563-572.
- Lewandowski Z, Webb D, Hamilton M, Harkin G (1999) Quantifying Biofilm Structure. *Water Science and Technology* 39 (7): 71-76.
- Massol-Deyá, AD, Whallon J, Hickey RF, Tiedje JM (1995) Channel Structures in Aerobic Biofilms of Fixed-Film Reactors Treating Contaminated Groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2): 769-777.
- Nicolella C, Chiarle S, Di Felice R, Rovatti M (1997) Mechanisms of biofilm detachment in fluidized bed reactors. *Water Science and Technology* 36: 229-235.
- Ochieng A, Ogada T, Sisenda W, Wambua P (2002) Brewery wastewater treatment in a fluidized bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials* 90: 311-321.
- Ramalho RS (1996) Tratamiento de Aguas Residuales. Editorial Reverté. Barcelona. 705 pp.
- Rivas LBA, Nevárez MG, Saucedo TRA, Bautista MRG (2001) Simultaneous Aerobic and Anaerobic Degradation of Wastewater in a Fixed-Bed Reactor. *Ex situ Biological Treatment Technologies. Proceedings of the Sixth International Symposium of in Situ and On-Site Bioremediation.* Batelle Press. San Diego. Vol. 6: 361-368.
- Ryhner G, Petrozzi S, Dunn IJ (1988) Operation of a Three-Phase Biofilm Fluidized Sand Reactor for Aerobic Wastewater Treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 32: 677-688.
- Safferman SI, Bishop PL (1996) Aerobic Fluidized Bed Reactor With Internal Media Cleaning. *Journal of Environmental Engineering* 122 (4): 284-291.
- Schreyer HB, Coughlin RW (1999) Effects of Stratification in a Fluidized Bed Bioreactor During Treatment of Metalworking Wastewater. *Biotechnology and Bioengineering* 63 (2):129-140.
- Shieh WK, Sutton PM, Kos P (1981) Predicting reactor biomass concentration in a fluidized-bed system. *Journal of Water Pollution Control Federation.* 53: 1574-1584.
- Stathis TC (1980) Fluidized bed for biological wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering Division:* 227-241.
- Steel RGD, Torrie JH (1985) Bioestadística: Principios y Procedimientos. McGraw-Hill. México. 622 pp.
- Stewart PS, Murga R, Srinivasan R, De Beers D (1995) Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Research* 29: 2006-2009.
- Stoodley PJ, Boyle D, Dodds I, Lappin-Scott HM (1998) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology.* 85: 19S-28S.
- Sutton PM, Mishra PN (1990) Fluidized bed biological wastewater treatment: effects of scale-up on system performance. *Water Science and Technology* 22: 419-430.
- Tavares CRG, Sant'Anna GL Jr, Capdeville B (1995) The Effect of Air Superficial Velocity on Biofilm Accumulation in a Three-Phase Fluidized-Bed Reactor. *Water Research* 29 (10): 2293-2298.
- Tchobanoglous G, Burton FL (1996) Ingeniería de Aguas Residuales: tratamiento, vertido y reutilización. Metcalf and Eddy Inc. McGraw-Hill. México. 752 pp.
- Trapaso RGA (1995) The optimal design of fluidized bed bioreactors. *Journal of Water Pollution Control Federation* 57:143-150.
- Trinet F, Heim R, Amar D, Chang H (1991) Study of Biofilm and Fluidization of Bioparticles in a Three-Phase Liquid Fluidized-Bed Reactor. *Water Science and Technology* 23: 1347-1354.
- Tsuneda S, Auresenia J, Inoue Y, Hashimoto Y, Hirata A (2002) Kinetic model for dynamic response of three-phase fluidized bed biofilm reactor for wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal* (10): 31-37.
- White DC, Pinkart HC, Ringelberg DB (1997) Biomass measurements: Biochemical Approaches. En: Hurst ChJ (ed) *Manual of Environmental Microbiology.* ASM Press, Washington, D.C.: 91-101.
- Winer BJ (1971) *Statistical Principles in Experimental Design.* McGraw-Hill. New York: 261-305.

