



ASADES

Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente
Vol. 11, 2007. Impreso en la Argentina. ISSN 0329-5184

EFFECTOS DEL AMONIACO, SULFURO Y TANINOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE UN LODO ANAEROBICO

W. A. Tejerina¹, R. del C. Farfán., C. M. Cuevas

Laboratorio de Estudios Ambientales (Consejo de Investigación-INENCO), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta. A4402FDC Salta. Tel.: 0387-4255516; Fax: 0387-4255483; Email: lucas@unsa.edu.ar

RESUMEN: La toxicidad es un efecto adverso no necesariamente letal. Un indicador del deterioro de la actividad bacteriana que cuantifica la concentración de tóxico es el IC₅₀ (50% Inhibiting Concentration). En este trabajo, se analizan los efectos individuales de amoníaco, sulfuro y taninos sobre lodo cloacal anaeróbico con miras a su aplicación para el tratamiento de efluentes de curtiembre, determinando la Actividad Metanogénica Específica (AME) de los lodos y el IC₅₀ de cada tóxico utilizado. Los ensayos de AME se realizaron de acuerdo a DET (1994). La AME del lodo cloacal de los ensayos Control fueron de 0.0525 y 0.0827 g DQO-CH₄/g SSV.d a 20°C y 30°C. Se han determinado los IC₅₀ de amoníaco, sulfuro y taninos para lodo cloacal floculento, siendo sus valores de: 1132 mg N-NH₃/L, 154 mg S/L y 163 mg tanino/L para 20°C y 1107 mg N-NH₃/L, 269 mg S/L y 306 mg tanino/L para 30°C.

Palabras claves: Toxicidad, IC₅₀, lodo anaeróbico, amoníaco, sulfuro, taninos, curtiembre.

INTRODUCCION

La toxicidad es un efecto adverso no necesariamente letal sobre el metabolismo de las bacterias, ya que a determinadas concentraciones un compuesto puede ser solamente inhibidor del crecimiento o de la actividad microbiana. En general, pueden distinguirse tres tipos de toxicidad: 1). Toxicidad Metabólica: se refiere a una inhibición de un proceso metabólico; removiendo la sustancia tóxica, la toxicidad es completamente reversible. En este caso el tóxico sólo perturba el proceso metabólico sin causar daño a la célula, ejemplos de este tipo de inhibición son las provocadas por sales y amoníaco; 2). Toxicidad Fisiológica: causa daño a componentes subcelulares (membranas o enzimas). Removiendo la sustancia tóxica la recuperación es lenta y el reestablecimiento de la actividad es más rápido que el crecimiento de nuevas bacterias. La demora es debido al tiempo requerido por células existentes para reparar el daño de componentes celulares (síntesis de nuevas enzimas), ejemplo de este tipo de toxicidad son los compuestos fenólicos como los taninos, conocidos como potentes inhibidores de enzimas hidrolíticas; 3). Toxicidad Bactericida: donde las sustancias tóxicas causan la muerte celular, ejemplos de este tipo de toxicidad son las provocadas por cloroformo y formaldehído.

La digestión anaeróbica, como todo proceso biológico, es sensible a sustancias tóxicas. Las bacterias metanogénicas son tan sensibles como las aeróbicas a dichas sustancias, pero considerando el lento crecimiento de las anaeróbicas, es de fundamental importancia tener presente este aspecto. Dado que la digestión anaeróbica es un proceso dinámico, en muchos casos, las sustancias tóxicas serán modificadas, degradadas o eliminadas una vez que entran al sistema anaeróbico. Esta modificación lleva a disminuir la toxicidad del compuesto referido hacia una detoxificación. Los tres principales tipos de mecanismos de detoxificación son: la biodegradación, volatilización y precipitación. También debe tenerse en cuenta que la interacción mutua de varios compuestos podría dar lugar a efectos antagónicos y/o sinérgicos. Normalmente la toxicidad se refiere a una sustancia inhibitoria llamada tóxico (Field, J.A., 1989).

En la práctica, la toxicidad en un proceso anaeróbico es observada como una reducción en la producción de gas metano, ya sea por un compuesto o una mezcla de compuestos tóxicos, lo que equivaldría a bajar la eficiencia del proceso anaeróbico.

La inhibición se define como un deterioro de la función de la bacteria. Un indicador de la misma que cuantifica la concentración del tóxico es el IC₅₀ (50% Inhibiting Concentration) que representa la concentración de sustancia que causa el 50% de inhibición de la biomasa considerada (Speece, R.E., 1995).

En general, la tasa específica de crecimiento bacteriano es independiente de la concentración del sustrato, pero eventualmente puede llegar a descender por inhibición por sustrato. En términos absolutos, una sustancia puede ser un tóxico dependiendo de su concentración. Los fenómenos de antagonismo y sinergismo son importantes al hablar de toxicidad. Antagonismo es una reducción de la toxicidad. Sinergismo es un aumento del efecto tóxico de una sustancia causada por la presencia de otra. La formación de complejos resulta, también, fundamental. Si una sustancia no está en solución, no puede penetrar dentro de la célula, y por lo tanto no podrá afectar el metabolismo del organismo. La magnitud del efecto tóxico de una sustancia puede ser reducido significativamente por aclimatación de la población de microorganismos al tóxico. La aclimatación implica una reorganización de los recursos metabólicos para vencer los obstáculos metabólicos producidos por la sustancia tóxica. La

¹ Autor a quien debe enviarse la correspondencia.

magnitud de la toxicidad observada o recogida en la bibliografía es una función de diversos factores, incluyendo concentración, antagonismos, sinergismos, formación de complejos y aclimatación (Kugelman y Chin, 1971).

Aunque el nitrógeno amoniacal es un importante nutriente para el crecimiento de los microorganismos, una concentración excesivamente alta del mismo limita su crecimiento. Hashimoto (1986), encontró signos de inhibición a una concentración de nitrógeno amoniacal de 2,5 g N-NH₄⁺/L en reactores sin aclimatar, tanto en rango mesofílico como termofílico. Koster y Lettinga (1983) consiguieron que el proceso se desarrollara a concentraciones de amonio de hasta 12 g N-NH₄⁺/L con un lodo granular, aunque a partir de 2,5 g N-NH₄⁺/L se observó una disminución en la tasa específica máxima de crecimiento de los microorganismos metanogénicos, destacando la reversibilidad de la toxicidad por amonio.

El sulfuro de hidrógeno es tóxico a concentraciones relativamente elevadas para muchos grupos bacterianos. Generalmente, se acepta que la forma tóxica es la no ionizada, ya que es la que puede atravesar la membrana celular. Koster et al. (1986); Yang et al. (1979) informan un valor de 250 mg S/L para la inhibición de un 50% de las bacterias metanogénicas usando acetato como sustrato.

Los taninos son compuestos fenólicos, cuya toxicidad a las bacterias metanogénicas puede ser atribuida a su acción sobre una amplia variedad de enzimas (Thung and van der Want, 1951). Arora et al. (1975) reportan inhibición durante el tratamiento anaeróbico de aguas residuales conteniendo taninos vegetales con concentraciones superiores a 320 mg/L.

La temperatura y el pH juegan importantes papeles sobre la toxicidad de determinados compuestos como nitrógeno amoniacal, sulfuros, ácidos grasos volátiles, etc.. La forma no ionizada de estos compuestos representan toxicidad a las bacterias metanogénicas. Por tanto, manteniendo en el reactor un pH que cause un alto nivel de disociación (alto pH para SH₂ y bajo pH para NH₃) se reducirán los efectos tóxicos de estos compuestos (Field, J.A., 1989). Otro factor que afecta la toxicidad de un determinado compuesto es el tipo de agregados bacterianos, siendo más resistentes, en general, los lodos granulares que los lodos floculentos (Hwu et al., 1997).

Las curtiembres que operan en la provincia de Salta realizan curtido vegetal de cueros vacunos, presentando sus efluentes cantidades apreciables de amoniacal, sulfuros y taninos. Con el propósito de evaluar tecnologías ambientalmente sustentables para el tratamiento de efluentes industriales, en este trabajo se analizan los efectos de la aplicación de distintas concentraciones de los compuestos mencionados en forma pura e individual, sobre un lodo cloacal anaeróbico con miras a la aplicación de la tecnología UASB para el tratamiento de los efluentes de una curtiembre local, determinando la actividad metanogénica específica de los lodos y el IC₅₀ de cada tóxico utilizado.

METODOLOGIA

Las muestras de lodo cloacal floculento fueron obtenidas de un reactor UASB a escala piloto, ubicado en la Planta Depuradora de Líquidos Cloacales de la ciudad de Salta, Argentina. El lodo fue lavado con agua destilada para eliminar remanentes de Demanda Química de Oxígeno (DQO) de la fase líquida y fue utilizado sin aclimatación previa a los tóxicos.

La Actividad Metanogénica Específica (AME) se expresa como g DQO-CH₄/g SSV.d, o sea la cantidad de gas metano producida por día por cada gramo de bacterias presentes en el medio. Los ensayos de AME se realizaron en botellas de suero de 1 L de acuerdo a DET (1994), en cámara termostatazada a 20 y 30°C. Se añadió a cada botella una cantidad conocida de lodo en términos del contenido de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), agua destilada, macro y micro nutrientes, extracto de levadura y solución buffer. El sustrato utilizado fue acetato de sodio, la concentración de esta sustancia se expresa en términos de DQO. La atmósfera de las botellas se hizo anaeróbica mediante burbujeo de N₂ durante 3 min, se cerraron los frascos herméticamente y se llevó a incubación (Guerra *et al*, 2000). Los blancos se prepararon en forma idéntica sin el aporte de sustrato. El biogas producido en las botellas fue medido por desplazamiento de una solución de NaOH al 5%. El pH de las botellas se determinó periódicamente con papel indicador Neutralit – Merck.

Se inició el ensayo con una primera alimentación de acetato de sodio (0.250 g DQO/L), este periodo se asumió como de aclimatación del lodo al sustrato y se siguió el proceso de degradación a través de la producción de metano hasta consumo total del acetato. La segunda alimentación de acetato se efectuó con 1.125 g DQO /L y en esta instancia se agregaron a cada frasco los tóxicos: Cloruro de Amonio, Sulfuro de Sodio hidratado y tanino comercial de extracto de quebracho, en forma individual; y se mantuvieron controles libres de tóxicos.

Las concentraciones de los tóxicos evaluados en este trabajo (seleccionados en base a valores reportados en la bibliografía y a ensayos preliminares), se detallan en la Tabla 1.

| Tóxico | Concentración (mg/L) | | |
|-------------------|----------------------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| CINH ₄ | 500 | 1000 | 2000 |
| SNa ₂ | 100 | 300 | 500 |
| Taninos | 300 | 500 | 700 |

Tabla 1: Concentraciones empleadas de los distintos tóxicos.

Para calcular la actividad del lodo de cada experimento se seleccionó la parte de la curva de producción de metano vs tiempo tomando los datos correspondientes al 50 % del consumo total del sustrato agregado y se determinó la ecuación de regresión

(DET, 1994). Se utilizaron blancos para descontar la producción de metano proveniente de la DQO soluble que eventualmente acompaña al lodo.

El grado de toxicidad o inhibición se determinó comparando individualmente las actividades del lodo alimentado con sustrato más las concentraciones definidas de compuesto tóxico con la actividad del control, o sea, el mismo lodo alimentado únicamente con sustrato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El periodo en el cual se lleva a cabo el ensayo de actividad metanogénica es indefinido, por lo que la medición de gas metano en cada ensayo se realizó hasta que no hubo producción del mismo. Como la velocidad de degradación del sustrato es proporcional a la velocidad de producción de gas, ésta se determinó por el gradiente de la curva. El tiempo total de incubación de los ensayos fue del orden de 90 días.

Los controles, en los que se mide la AME del lodo cloacal en condiciones ideales, fueron de 0.0525 g DQO-CH₄/g SSV.d a 20°C y 0.0827 g DQO-CH₄/g SSV.d a 30°C. Los valores de AME del lodo de los distintos experimentos, empleados para el calculo de los IC₅₀, se resumen en la Tabla 2:

| Tratamiento | Concentración (mg/L) | AME (g DQO-CH ₄ /g SSV.d) | |
|-------------------|----------------------|--------------------------------------|--------|
| | | 20°C | 30°C |
| Control | 0 | 0.0525 | 0.0827 |
| CINH ₄ | 500 | 0.0447 | 0.0756 |
| | 1000 | 0.0323 | 0.0492 |
| | 2000 | 0.0173 | 0.0277 |
| SNa ₂ | 100 | 0.0416 | 0.0603 |
| | 300 | 0.0112 | 0.0352 |
| | 500 | 0.0044 | 0.0245 |
| Taninos | 300 | 0.0198 | 0.0496 |
| | 500 | 0.0053 | 0.0156 |
| | 700 | 0.0046 | 0.0092 |

Tabla 2: Valores de la actividad metanogénica obtenidos para las distintas concentraciones de tóxicos.

En la Figura 1 se presenta la evolución del volumen acumulado de metano en el tiempo para las distintas concentraciones de amoníaco a 20°C y 30°C.

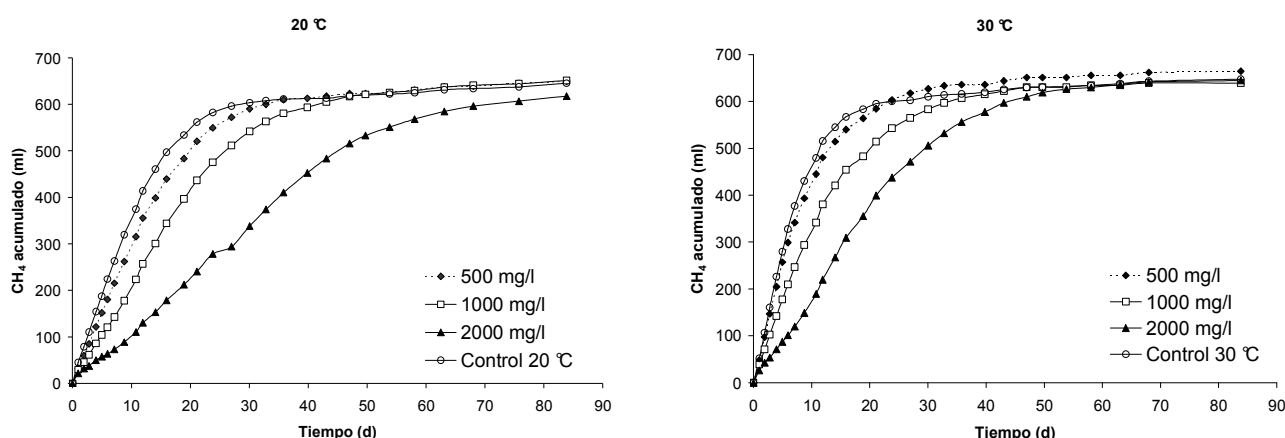


Figura 1: Evolución de la producción acumulada de metano de los ensayos con diferentes concentraciones de amoníaco a 20 y 30°C.

Como se aprecia en la Figura 1, en el rango considerado la velocidad de producción de gas es inversamente proporcional a las concentraciones de amoníaco.

La concentración correspondiente al IC₅₀ fue de 1132 mg N-NH₃/L para 20°C y 1107 mg N-NH₃/L para 30°C. Si bien estos valores de IC₅₀ están dentro del rango reportado por la bibliografía, se debe aclarar que los límites de inhibición varían mucho según el autor. Por ejemplo, Koster and Lettinga (1983) reportan una concentración responsable de un 50% de inhibición de la actividad metanogénica en un lodo granular no adaptado de 50 mg N-NH₃/L y 1.000 mg N-NH₃/L para un lodo granular

adaptado con acetato, pH 7,6-7,9, a 30°C. Van Velsen, (1979) informa un IC_{50} = 1.800 mg/l para un lodo cloacal adaptado, a 30°C utilizando sustratos de Carbono 2, 3 y 4. Mientras que Hashimoto (1986) encontró inhibición a una concentración de 20 mg N-NH₃/L en el rango mesofílico y 200 mg N-NH₃/L en el rango termofílico, sin aclimatación y 390 mg N-NH₃/L en el rango termofílico con aclimatación. Gallert et al. (1998) encontraron que los microorganismos mesofílicos son más sensibles a la inhibición por NH₃, con un valor de IC_{50} para los metanogénicos de 92 mg NH₃/L.

Durante el periodo de análisis, el pH de los ensayos se mantuvo entre 6.7 y 7.5 para las dos temperaturas evaluadas en el rango mesofílico. Los resultados muestran claramente la inhibición por amoníaco, observándose una inmediata recuperación de la actividad en todas las concentraciones analizadas; por lo que se infiere que el amoníaco presenta una toxicidad del tipo metabólico. Diversos autores, indican que la inhibición por amonio parece ser causada por el amoníaco libre (NH₃), el efecto inhibitorio del amonio aumenta a pH alcalinos y a altas temperaturas.

En lo que respecta a los valores de AME obtenidos en los ensayos con sulfuro, los resultados mostraron que la inhibición aumenta con la concentración del tóxico. Se observó una fase de retardo pronunciada a 20°C para las concentraciones 2 y 3, como se puede ver en la Figura 2. Para las dos temperaturas ensayadas, el comportamiento del pH fue similar, con valores iniciales de 6.4, posteriores oscilaciones entre 8 y 9, estabilizándose hacia el final alrededor de 7.2.

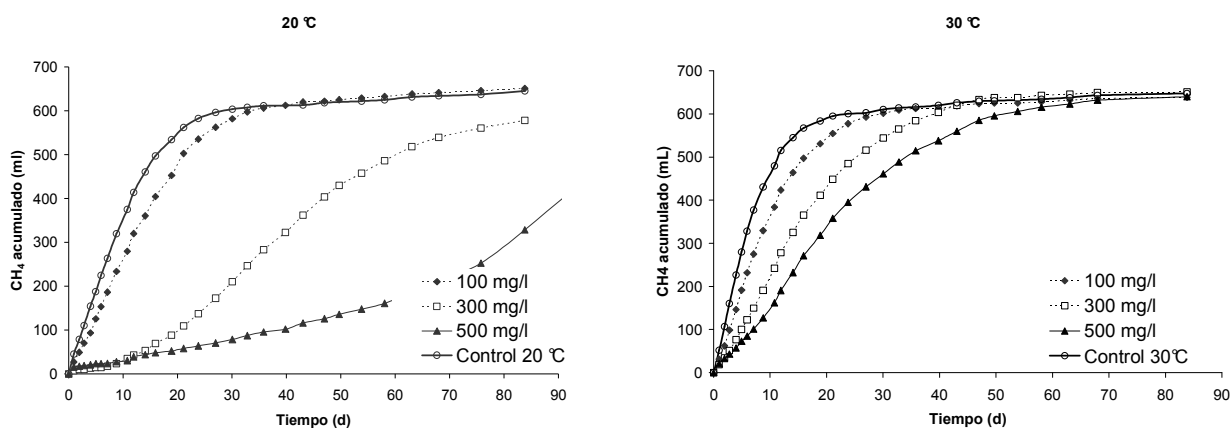


Figura 2: Evolución de la producción acumulada de metano de los ensayos con diferentes concentraciones de sulfuro a 20 y 30°C.

Los IC_{50} obtenidos para las temperaturas de 20°C y 30°C fueron de 154 mg S/L y 269 mg S/L, respectivamente. Estas concentraciones son similares a los valores reportados en la bibliografía.

En general, los organismos metanogénicos son más sensibles que los acetogénicos y los acidogénicos a este tóxico. Los niveles de concentración de H₂S a los cuales se produce la inhibición del 50% varían en función del pH y la temperatura, pero oscilan entre 50 y 530 mg/L. En el rango termofílico se encontró que concentraciones de solamente 23 mg S/L, pueden producir inhibición del proceso metanogénico cuando simultáneamente existe alto contenido de nitrógeno amoniacal (Hansen et al., 1998).

El lento reestablecimiento de la actividad metanogénica a 20°C puede atribuirse a que el tóxico afecta en mayor medida el tiempo de retardo en el crecimiento a la temperatura subóptima de 20°C, límite inferior aceptado para los organismos mesofílicos; siendo más rápida la recuperación de las células a 30°C, dadas las mejores condiciones fisiológicas en la que se encuentran (Figura 2 y 3).

La concentración máxima de taninos empleada fue de 700 mg/L; sin embargo se realizaron ensayos preliminares que mostraron que niveles de 3.000 mg/L, inhiben totalmente la actividad metanogénica, no obteniéndose recuperación aún después de 96 días de digestión.

En la Figura 3 se presenta la evolución del volumen acumulado de metano en el tiempo para las distintas concentraciones de taninos a 20°C y 30°C.

En este caso también se observa un efecto pronunciado en la fase de retardo para la temperatura inferior ensayada, efecto que es más acentuado para los niveles elevados de taninos.

Los IC_{50} obtenidos fueron 163 mg tanino/L y 306 mg tanino/L para las temperaturas de 20°C y 30°C, respectivamente. En la bibliografía se informan valores de IC_{50} de 350 – 700 mg/l para sustratos de Carbono 2, 3 y 4, siendo los taninos oligoméricos como los galotaninos, los responsables de dicha inhibición (Field and Lettinga, 1987). Los IC_{50} determinados en este trabajo, realizado con lodo de características floculentas, son menores que los reportados por dichos autores que emplearon lodo de carácter granular, confirmándose observaciones realizadas por Hwu et. al.

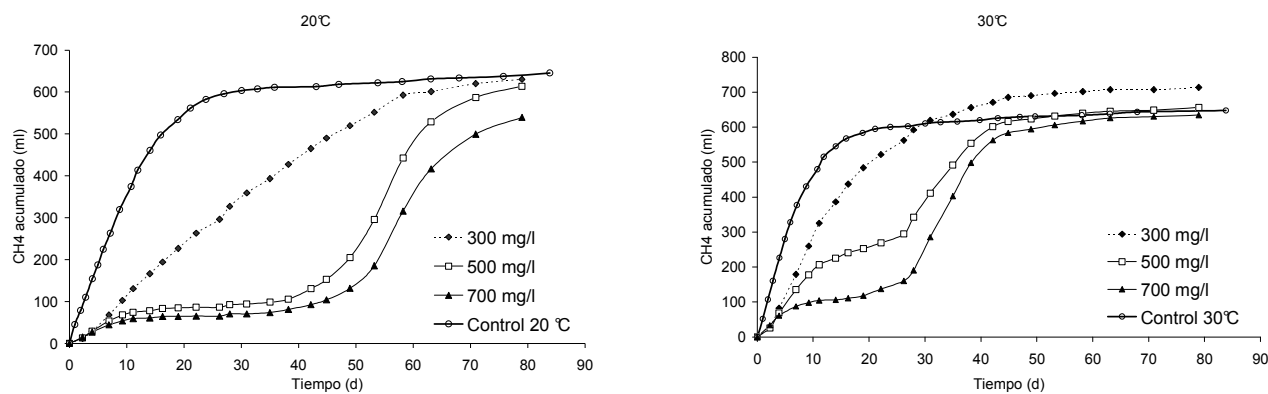


Figura 3: Evolución de la producción acumulada de metano de los ensayos con diferentes concentraciones de taninos a 20 y 30°C.

Se debe destacar que a 30°C, los ensayos con menores niveles de taninos (Concentración 1 y Concentración 2) presentaron producciones de metano superiores a las correspondientes a la conversión total del sustrato o Control, debido presumiblemente a la degradación biológica parcial de una fracción de los taninos utilizados.

Todos los ensayos detallados anteriormente, permitieron estimar los rangos de concentración para sustancias tóxicas a partir de los cuales se pueden esperar disminuciones en la eficiencia de remoción de un sistema de tratamiento anaeróbico. Se debe tener presente que esta predicción, solo será válida siempre y cuando se trate de lodos cloacales con características similares y cuando en el efluente a tratar se encuentren presentes los tóxicos en forma individual.

Con el propósito de analizar el comportamiento del lodo en presencia de los tres constituyentes mencionados en forma simultánea, se encuentran en ejecución bioensayos empleando una muestra de efluente de una curtiembre local con diferentes grados de dilución; o lo que es lo mismo, diferentes concentraciones de amoníaco, sulfuro y taninos.

CONCLUSIONES

- Se ha determinado la inhibición en lodo cloacal floculento provocada por tres tóxicos: Amoníaco, Sulfuros y Taninos de extracto de quebracho. En todos los casos la Actividad Metanogénica Específica (AME) es inversamente proporcional a la concentración del tóxico.
- Se han determinado las concentraciones de amoníaco, sulfuro y taninos que causan el 50% de inhibición del lodo cloacal floculento (IC₅₀), siendo sus valores de: 1132 mg N-NH₃/L, 154 mg S/L y 163 mg tanino/L para 20°C y 1107 mg N-NH₃/L, 269 mg S/L y 306 mg tanino/L para 30°C.
- En todos los casos, para las concentraciones evaluadas, se logró recuperación de la actividad metanogénica inicial del lodo cloacal ensayado, demostrando que el mismo puede adaptarse para su empleo como inóculo en tratamiento anaeróbico de efluentes de curtiembre.
- Los ensayos realizados con taninos muestran que habría degradación biológica parcial de una fracción de los mismos.

REFERENCIAS

- Arora, H.C. y et. al. (1975) Treatment of vegetable tanning effluent by anaerobic contact filter process. Wat. Pollut. Control (UK), 74: 584-596.
- DET (Department of Environmental Technology), (1994). Manual laboratory methods and procedures for anaerobic wastewater treatment. Wageningen Agricultural University. 20pp.
- Field, J. A. (1989). The Effect of Tannic Compounds on Anaerobic Wastewater Treatment. Doctoral Thesis. Wageningen Agricultural University. Wageningen, The Netherlands.
- Field, J.A. y Lettinga, G. (1987). The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolyzable tannin. Water Res. 21: 367-374.
- Gallert, C. y et. al. (1998) Effects of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population, J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 495-501.
- Guerra, R.G. y et. al. (2000). Perfiles de actividad metanogénica específica en un reactor UASB utilizado para el tratamiento de líquidos cloacales presedimentados. Revista de la Asociación Argentina de Energías Renovables y Ambiente, ASADES 2000, 4(2): 06.25-06.30.
- Hansen, K. y et. al. (1998) Anaerobic Digestion of Swine Manure Inhibition by Ammonia. Water Research, 32(1), 5-12.
- Hashimoto, A. (1986) Ammonia Inhibition of Methanogenesis from Cattle Wastes. Agricultural Wastes, 17, 241-261.
- Hwu, C.S. y Lettinga, G. (1997) Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. Enzyme Microb. Technol. 21: 297-301.
- Koster, I.W. y Lettinga, G. (1983) Ammonium toxicity in anaerobic digestion. Proceeding of the Anaerobic Wastewater Treatment Symposium, Noordwijkerhout. Pp. 553. TNO Corporate Communication Dept., the Hague, The Netherlands.

- Koster, I.W. y et. al. (1986) Sulphide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH levels. *Water Res.* 20: 1561-1567.
- Kugelman, I.J. y Chin, K.K. (1971). Toxicity, Synergism, and Antagonism in Anaerobic Waste Treatment Processes. *Advances in Chemistry Series.* 105, 55-90.
- Speece, R.E. (1995). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater.* Vanderbilt University.
- Thung, T.H. y van der Want, J.P.H. (1951) Viren en looistoffen. *Tijdschrift Over Plantenziekten*, 57(4): 173-174.
- Van Velsen, A.F.M. (1979) Adaption of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations. *Water Res.* 13: 995-999
- Wiemann, M. y et. al. (1998). Anaerobic Treatment of Tannery Wastewater with simultaneous sulphide elimination. *Wat. Res.*, 32 (3), 774-780.
- Yang, J. y et. al. (1979). Recovery of anaerobic digestion after exposure to toxicants. Final Report prepared for the US dept. of Energy, Contract no. EC-77-S-02-4391.

ABSTRACT: Toxicity is an adverse effect not necessarily lethal. The deleterious action of a toxic substance on bacterial activity can be quantified by measuring IC_{50} , i.e. the toxic concentration which causes fifty per cent inhibition of biomass activity. This paper deals with evaluation of toxic action of ammonia, sulfide and tannins on anaerobic domestic sludge in order to the potential application of its results to tannery wastewater treatment. Specific Methanogenic Activity (SMA) of sludge and IC_{50} of each toxic substance were measured. SMA assays were carried out according to DET (1994). The SMA values of sludge control tests were 0.0525 y 0.0827 g COD- CH_4 /g VSS.d, at 20°C and 30°C. The IC_{50} of ammonia, sulfide and tannins were determined for flocculent sludge, being its values 1132 mg N-NH₃/L, 154 mg S/L y 163 mg tannins/L at 20°C and 1107 mg N-NH₃/L, 269 mg S/L and 306 mg tannins/L at 30°C.

Keywords: Toxicity, IC_{50} , anaerobic sludge, ammonia, sulfide, tannins, tannery.