

Evaluación de la toxicidad de un efluente cervecero mediante ensayos de inhibición de la actividad metanogénica

Evaluating brewery wastewater toxicity using a methanogenic activity inhibition test

María Carolina García Chaves*, María Consuelo Díaz Báez**

RESUMEN

La tecnología anaerobia, como opción de tratamiento para las aguas residuales en Colombia, se inició a mediados de los años ochenta. Sin embargo, el manejo y operación de estos sistemas fue complejo y ha tenido un gran número de problemas, especialmente relacionados con el diseño, la puesta en marcha y la operación de los reactores. En la actualidad se considera que la estabilidad de un proceso anaerobio depende del balance entre las poblaciones que conforman el consorcio microbiano, cuyo equilibrio puede perturbarse por muchos factores, entre ellos las sustancias tóxicas. En el presente trabajo se evaluó el potencial tóxico de un lubricante sobre la actividad de las arqueas metanogénicas presentes en un lodo anaerobio. La toxicidad se determinó mediante la inhibición de la actividad metanogénica. Se estudió el efecto tóxico del pentaclorofenol (PCP), un lubricante de cadenas y el agua residual de una cervecería. Se estableció la relación concentración-respuesta para cada uno de ellos, la concentración inhibitoria media (CI₅₀) así como la concentración a la cual no se observa efecto (NOEC). Los resultados obtenidos mostraron que tanto el lubricante como el pentaclorofenol tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre la metanogénesis, mientras que la mayoría de las muestras de agua residual produjeron bajo efecto tóxico.

Palabras clave: Toxicidad anaerobia, metanogénesis, industria cervecera, lubricante de cadenas

ABSTRACT

Anaerobic technology has been used for more than twenty years in wastewater treatment in Colombia. However, operating these systems has been complex and problems associated with operation and reactor-design have been reported. It is currently considered that the anaerobic process' stability depends on balance amongst those populations forming the anaerobic consortia and whose equilibrium could be disturbed by many factors such as toxic compounds. The aim of this study was to establish the potential toxic effect of a synthetic lubricant on methanogenic acetodastic activity by using a brewery's anaerobic sludge. A methanogenic activity inhibition test was adapted and validated to compare lubricant, pentachlorophenol and wastewater toxicity from a brewery. The concentration-response ratio, average CI₅₀ concentration inhibition and non-observed effect concentration were established. The test showed a high level of reproducibility, the lubricant and pentachlorophenol exerted a strong inhibition of methanogenesis and a low toxic effect was observed in most wastewater samples.

Key words: anaerobic toxicity, methanogenesis, brewery, chain lubricant

INTRODUCCIÓN

Uno de los elementos clave para la eficiente remoción de la materia orgánica del agua residual en un reactor anaerobio es el equilibrio de

las poblaciones presentes en el consorcio microbiano encargado de la degradación. En la medida en que cada población mantenga su viabilidad, podrá cumplir con la función metabólica que le corresponde y el sistema se mantendrá

* Microbióloga M.Sc. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.

** Bióloga M.Sc., Ph.D. Directora. Posgrado Interfacultades Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. E-mail: mcdiazb@unal.edu.co

Recibido: Septiembre 2 de 2003. **Aceptado:** Noviembre 5 de 2003

estable, desde un punto de vista funcional (Fernández *et al.*, 1999). Uno de los factores que puede llegar a romper dicha estabilidad es la presencia de sustancias tóxicas, y cualquiera de las poblaciones del consorcio será susceptible de ser inhibida por los compuestos presentes en el agua residual. En reactores anaerobios, los efectos tóxicos más estudiadas son los generados por metales pesados, compuestos aromáticos, ácidos grasos y cationes de metales livianos (Kugelman y Chin, 1971; Lin, 1992; Sierra y Lettinga, 1991). Cualquiera que sea el caso, los eventos de toxicidad en el interior de un reactor se revelarán por la disminución en la producción de metano y una baja remoción de materia orgánica. Por tanto, conocer, entender y detectar a tiempo un problema de toxicidad es crucial para tomar las medidas necesarias que aseguren el funcionamiento óptimo de estos reactores.

Aunque en la operación de los reactores anaerobios que tratan efluentes de la industria cervecera colombiana, el fenómeno de toxicidad no se ha considerado importante dada la baja complejidad del material orgánico presente, es importante tener en cuenta que el mayor volumen de residuos líquidos se genera durante las actividades de lavado de los envases, tanques y equipos, así como en la lubricación de las cadenas transportadoras de botellas. En estas operaciones se adicionan cantidades importantes de soda cáustica, desinfectantes, detergentes y lubricantes de cadenas. Por esta razón, a pesar de que estos efluentes son típicamente biodegradables (Collazos, 2000), existen diferentes estudios en los cuales se han reportado eventos de toxicidad, generalmente asociados a los agentes de limpieza mencionados (Glas y Schmaus, 2000; Nagel *et al.*, 1999; Austermann-Haun *et al.*, 1998).

Los lubricantes de cadenas son productos que se rocían constantemente sobre las bandas para que el transporte de las botellas sea suave, sin interrupciones, razón por la cual estos compuestos pueden estar presentes, en cantidades significativas, en el agua residual de este tipo de industrias. En general, estos compuestos son agentes con propiedades surfactantes, y muchos de los lubricantes de última generación tienen incorporados agentes microbicidas para evitar el crecimiento de los microorganismos sobre las bandas transportadoras, por lo que su presencia en el agua residual puede producir inhibición de los microorganismos encargados de la degradación de la materia orgánica.

Con el fin de establecer la presencia de este fenómeno en las aguas residuales generadas en la industria cervecera, el presente trabajo se orientó a implementar una metodología que permitiera establecer el potencial tóxico de lubricantes de cadenas sintéticos sobre la población metanogénica acetoclástica de todos anaerobios, y utilizaría para medir la potencial toxicidad del agua residual generada en una de las plantas de tratamiento de la industria cervecera. El trabajo incluyó el montaje y la adaptación de la prueba de inhibición de la producción de metano recomendada por Owen *et al.* (1979), así como la evaluación de la toxicidad del lubricante y de muestras de agua residual generadas en una cervecería.

METODOLOGÍA

Selección y caracterización del inóculo. Para el montaje de las pruebas de inhibición, se seleccionó un lodo floculento colectado en un reactor UASB (Up Flow Anaerobio Sludge Blanket) que trataba el agua residual de una industria cervecera. La cuantificación de los principales grupos microbianos se llevó a cabo mediante la técnica de Número Más Probable (NMP) recomendada por la ORSTOM (Institut Français de la Recherche Scientifique pour la Développement en Coopération) (Alazard y Molina, 1997). Los grupos microbianos cuantificados fueron bacterias fermentativas (glucosa y lactato), bacterias acetogénicas (propionato y butirato), bacterias sulfato-reductoras (acetato y lactato) y arqueas metanogénicas (hidrógeno y acetato). Además, se determinó la concentración de sólidos totales (STT), sólidos totales volátiles (STV), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) del lodo, los cuales se realizaron siguiendo los procedimientos estándar (APHA, 1998). Igualmente, se determinó la actividad metanogénica específica del lodo, utilizando acetato como único sustrato (Alazard y Molina, 1997).

Tóxicos evaluados. Como tóxico de referencia se seleccionó el Pentaclorofenol (PCP), calidad reactivo, marca Sigma. Entre de la amplia variedad de lubricantes que existe en el mercado, se seleccionó un lubricante sintético de última generación utilizado en una de las cervecerías, cuyo consumo diario promedio era 65 kg. De acuerdo con la información consignada en la ficha técnica, el producto se caracteriza por solubilidad completa en agua, una Demanda Química de Oxígeno (DQO) de 340 g O₂/kg, y un pH

de 5.5 en solución al 1% p/p. Igualmente, se hace mención a su actividad detergente asociada a la presencia de tensoactivos catiónicos.

Prueba de inhibición de la producción de metano. Las pruebas de inhibición de la actividad metanogénica se llevaron a cabo en botellas de suero de 160 ml. Todas las pruebas se realizaron a 35 ± 2 °C en un baño con agitación y temperatura controlada. El protocolo utilizado fue el recomendado por Owen *et al.* (1979). Para cada ensayo, se utilizaron 21 botellas. En cada una se colocaban 45 ml de medio basal estéril, suplementado con vitaminas (Alazard y Molina, 1997). La reducción del medio se realizó adicionando 2.5 ml de una solución de sulfuro de sodio (0.5%). Las botellas se inocularon con 3.1 ml de lodo, lo cual permitía tener una concentración final de 2 g SSV/l (Field, 1987). A continuación, se realizó un intercambio de gases con una mezcla de N_2/CO_2 (80-20%) con lo cual se buscaba eliminar las trazas de oxígeno presente en las botellas. Antes de iniciar las pruebas definitivas, se realizó una activación del inoculo que permitiera tener una biomasa activa capaz de utilizar el sustrato con rapidez. La activación se realizó adicionando 0.1 ml de una solución 1M de acetato 12 horas antes de iniciar las pruebas. Finalizada la activación, se realizó un nuevo intercambio de gases para retirar el metano producido. Las pruebas se iniciaron adicionando 1.6 ml de una solución de acetato 1M, correspondiente a una concentración de sustrato equivalente a 2 g DQO/l. De esta forma, se mantuvo una relación alimento/microorganismo de 1:1. A continuación, se adicionó el volumen definido de la solución patrón del compuesto "tóxico" por evaluar. Para los ensayos con pentaclorofenol se preparó una solución patrón de 1.5 mM a partir de la cual se prepararon todas las diluciones ensayadas. Para el lubricante se prepararon 4 soluciones patrón en agua desmineralizada correspondientes a 1, 2, 3 y 4 % v/v.

En cada prueba se valoraron 5 concentraciones del compuesto "tóxico", cada una por triplicado. Además, se incluyeron dos controles, cada uno por triplicado, los cuales correspondían: 1) al control de la actividad endógena, y 2) al control negativo. Para el primero, las botellas no contenían ni sustrato ni la sustancia "tóxica". En el segundo, las botellas contenían todos los elementos adicionados en cada tratamiento, excepto el compuesto tóxico. Todas las botellas fueron incubadas en agitación a 35 °C.

La producción de metano se cuantificó por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo Varían 3600 equipado con una columna empacada en acero inoxidable Molecular Sieve 5A 45/60, marca Varían, de 2m de longitud y 3 mm de diámetro interno. La temperatura de la columna, del inyector y del detector de conductividad térmica fue 50, 50 y 250 °C respectivamente. Como gas de arrastre se utilizó helio, con una tasa de flujo de 30 ml/min. Se realizaron tres mediciones durante las primeras 12 h y dos veces más a las 24 y 48 h.

Para las pruebas de inhibición con el agua residual, se utilizó la muestra directamente sin diluir (100%). Para cuantificar la producción de metano a partir de los sustratos presentes en la muestra de agua, se incluyó un control que contenía solamente el lodo y el agua residual.

Los resultados de producción de metano se graficaron en función del tiempo, y se calculó el valor de la pendiente máxima de la curva, correspondiente a la tasa máxima de producción de metano (TMPM). La Actividad Metanogénica Específica (AME) del lodo se calculó utilizando el valor (TMPM) obtenido con el control negativo mediante la siguiente expresión:

$$\frac{AME}{gDQO_{CH_4} / gSSV * d} = \frac{R * 24 h / d}{(FC * V * SSV)}$$

donde

R = pendiente máxima de la gráfica (ml de CH_4/h)
 FC = factor de conversión de ml de metano a g DQO
 V = volumen efectivo de lodo (l)
 SSV = concentración de sólidos suspendidos volátiles en el lodo (g SSV/l).

El porcentaje de la tasa máxima de producción de metano para cada tratamiento (M_T) se calculó como una fracción del control negativo (M_C) de la siguiente forma:

$$M_T = (TMPM_T / TMPM_C) \times 100$$

donde,

$TMPM_T$ = tasa máxima de producción de metano en el tratamiento.

$TMPM_C$ = tasa máxima de producción de metano en el control negativo.

Para cada tratamiento, el porcentaje de inhibición (I) se calculó de la siguiente forma:

$$I = 100 - M_T$$

Ensayos de inhibición con pentaclorofenol Para valorar la reproducibilidad de la prueba, así como la estabilidad de la respuesta tóxica del lodo a través del tiempo, se llevaron a cabo ensayos de inhibición con PCP. Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando las siguientes concentraciones: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 mM, cada una con tres réplicas. Se realizaron 10 ensayos. Con los porcentajes de inhibición (I) para cada concentración, se calculó la concentración de PCP capaz de inhibir en un 50% la producción de metano (C_{I50}). Para este cálculo se utilizó el método Probit, mediante un programa de computador (USEPA Probit Analysis, versión 1.5). Con los valores de C_{I50} obtenidos, se elaboró la carta de control de calidad de la prueba.

Ensayos de inhibición con el lubricante. Siguiendo el mismo procedimiento descrito, se realizaron las pruebas con el lubricante. Con los resultados de ensayos preliminares, se seleccionó un intervalo de concentración entre 0.03 y 0.15 % v/v. Las concentraciones utilizadas fueron 0.03, 0.06, 0.09, 0.12 y 0.15% v/v, cada una por triplicado. Se realizaron 10 ensayos. Con los porcentajes de inhibición obtenidos para las diferentes concentraciones, se calculó el valor de la C_{I50} utilizando el método Probit. La curva concentración/respuesta se elaboró utilizando los datos de inhibición promedio obtenidos en los 10 ensayos.

Ensayos de inhibición de la producción de metano con el agua residual. Para estos ensayos, se colectaron cuatro muestras de agua residual de una cervecería que utiliza el lubricante de cadenas del tipo mencionado. Las muestras se tomaron a la salida del tanque de equalización. A cada muestra se le determinó la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), la concentración de materia orgánica (DQO) y el pH. Como las muestras tenían un pH inferior a 7, y era necesario evitar el efecto inhibitorio por este factor, las muestras fueron neutralizadas adicionando bicarbonato de sodio. Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo con el agua residual sin diluir. Cada prueba incluyó 4 réplicas por muestra, y los controles antes mencionados.

Procesamiento de la información. Para calcular los valores de C_{I50} y el intervalo de confianza asociado del 95% en las pruebas con PCP y el lubricante, se utilizó el método estadístico paramétrico Probit (USEPA 1991).

Los resultados obtenidos con el PCP, ajustados al modelo lineal (Probit), fueron utilizados para construir la carta control. La elaboración de esta carta se realizó graficando los valores obtenidos de C_{I50} en función de los ensayos realizados a lo largo del tiempo. Con base en este gráfico, se calculó el valor promedio de la C_{I50} y su respectiva desviación estándar (S). Con esos valores se determinó el intervalo en el que debería mantenerse la C_{I50} (Media \pm 2S) para garantizar una precisión dentro de un límite de confianza del 95%.

Igualmente, se calculó el valor de la concentración de PCP y de lubricante que no produce un efecto observable en la población metanogénica acetoclástica (NOEC). El valor se logró a partir de la ecuación obtenida en el análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta.

Para definir si el porcentaje de inhibición encontrado en el agua residual era significativo o no, se siguió el procedimiento de Pasa/Falla propuesto por la USEPA (1991) para ensayos con una sola concentración. Este procedimiento requiere la evaluación previa de la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos del grupo control y los del tratamiento. Mediante la prueba de hipótesis de Wilcoxon, se compara si existe o no una diferencia significativa entre el tratamiento y el control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características del lodo anaerobio. En la tabla 1 aparece la concentración de los sólidos presentada por el lodo seleccionado. Como puede observarse, la relación SSV/SST señaló una elevada concentración de biomasa medida indirectamente por la concentración de sólidos suspendidos volátiles. Estos valores fueron más altos que los reportados por Espitia (1999) para cinco lodos provenientes de otros reactores de cervecerías. Teniendo en cuenta los valores recomendados para ensayos de actividad metanogénica, los valores encontrados tenían la proporción adecuada de un lodo, para ser utilizado como inóculo.

Tabla 1. Concentración de sólidos en el lodo anaerobio.

| Parámetro | Concentración (g/l) |
|-------------------------------------|---------------------|
| Sólidos Totales (STT) | 99.33 |
| Sólidos Totales Volátiles (STV) | 61.3 |
| Sólidos Suspendidos Totales (SST) | 51.85 |
| Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) | 32.14 |
| Relación SSV/SST | 0.62 |

Estos parámetros fueron evaluados repetidamente durante un año, y los resultados permitieron verificar que bajo condiciones de almacenamiento la concentración de sólidos no varió (%C.V_{SSV}= 1%). Como se esperaba que tampoco disminuyera la actividad bacteriana, se hicieron mediciones mensuales de la actividad metanogénica, las cuales se presentan en la figura 1. Como puede observarse, la

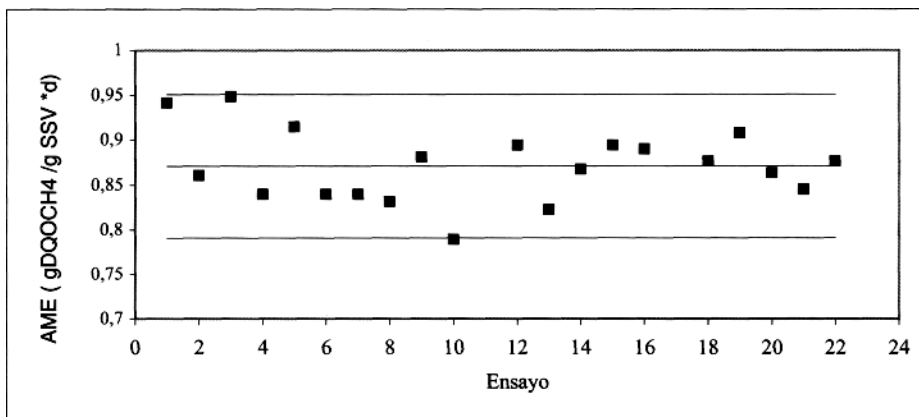
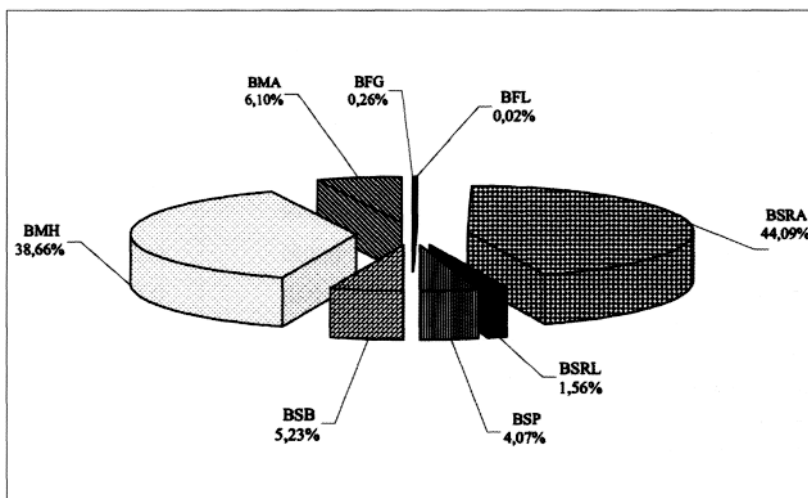


Figura 1. Variación en el tiempo de la actividad metanogénica del lodo anaerobio.

actividad se mantiene relativamente constante con un promedio de 0.87 ± 0.04 g $DQO_{CH_4}/gSSV*d$ y un coeficiente de variación de 4.6%.

El análisis de la composición microbiana mostró una estructura en la cual predominaron metanógenos utilizadores de hidrógeno (BMH) y sulfato reductores del acetato (BSA), y en menor número las bacterias fermentativas de la glucosa y del lactato (figura 2). Este fenómeno está acorde con el tipo de sustratos presentes en aguas residuales de cervecerías, utilizados como donadores de electrones (Wu *et al.*, 1991). La predominancia de las arqueas metanogénicas hidrogenófilas puede explicarse por la necesidad de mantener una presión parcial de hidrógeno en un nivel que permita la degradación sintrófica del etanol y propionato (Wu *et al.*, 1991). El alto recuento de bacterias sulfatorreductoras en sistemas con bajo contenido de sulfates está relacionado con la habilidad de

este grupo para crecer utilizando el metabolismo acetogénico, a través de la oxidación incompleta de etanol (Scholten, 1999). Además, como el lodo provenía de un reactor de fases separadas, en el cual las etapas iniciales de degradación (fermentación y acidogénesis) se llevan a cabo en un tanque acidogénico, es de esperar que la concentración de glucosa y lactato en el reactor metanogénico sea muy baja para soportar un alto número de bacterias fermentativas.



Inhibición de la producción de metano con pentaclorofenol. El efecto inhibitorio del PCP sobre la producción de metano se presenta

Figura 2. Distribución porcentual de las poblaciones microbianas presentes en el lodo anaerobio. Bacterias fermentativas de la glucosa y del lactato (BFG, BFL), bacterias sulfatorreductoras del acetato y del lactato (BSRA, BSRL), bacterias sintróficas del propionato y del butirato (BSP, BSB) y arqueas metanogénicas del hidrógeno y del acetato (BMH, BMA).

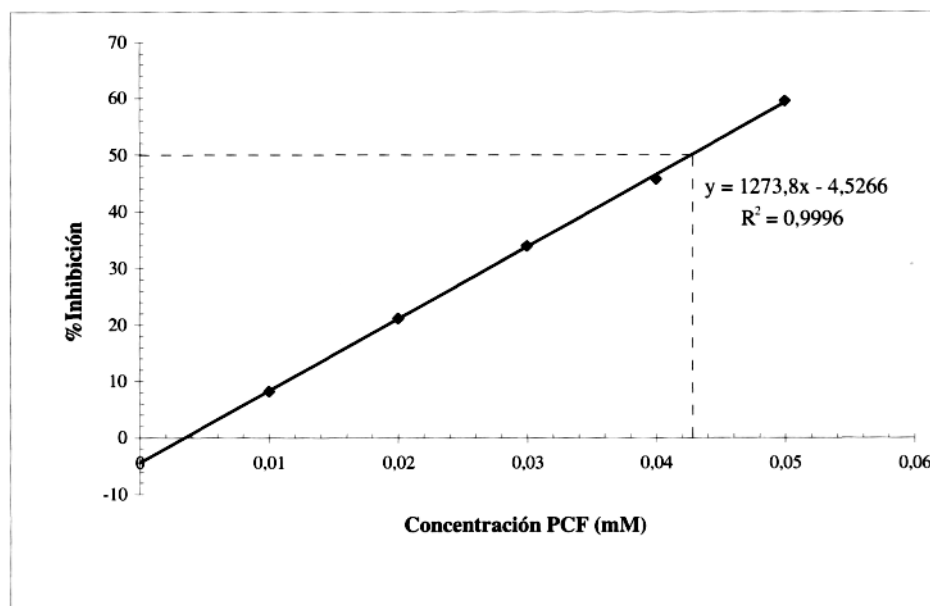


Figura 3. Curva concentración-respuesta para el pentaclorofenol.

en la curva concentración-respuesta (figura 3). Como puede observarse, la inhibición aumenta proporcionalmente con el incremento de la concentración. El análisis de regresión reveló que el comportamiento observado se ajustaba a un modelo lineal descrito por la ecuación: $Y(\%) = 1273.8 X(\text{mM PCP}) - 4.52$. Con base en esta ecuación, el valor calculado para la NOEC fue 0.003 mM.

El valor promedio de la C_{50} a 48 horas para el PCP fue 0.043 mM con un coeficiente de variación del 17.85%. Aunque parecería que la variabilidad entre los diferentes ensayos es alta si se compara con una determinación química, el valor encontrado está dentro de los límites aceptables para ensayos biológicos, los cuales pueden llegar a 25% (Bertoletti, 1992). En estos bioensayos, no sólo se mide la variabilidad de un organismo, sino la de consorcio bacteriano, que por la cantidad de factores que pueden afectarlo, son una fuente importante de variación.

El valor encontrado para la C_{50} del PCP fue similar (0.03mM) al reportado por Sierra y Lettinga (1991), y se ubica dentro del intervalo de confianza (95%) obtenido para la $C_{50} = 0.043$ mM encontrada en este trabajo [0.028-0.058]. Los resultados muestran no sólo la reproducibilidad de los ensayos realizados, sino también la posibilidad de incorporar esta metodología para estudiar el efecto tóxico de diferentes sustancias sobre poblaciones anaerobias.

En la tabla 2 se puede observar que concentraciones bajas (0.043 mM) de PCP son capaces de inhibir la producción de metano en un 50%. Sin embargo, su actividad puede variar con los diferentes tipos de bacterias. Ruckdeschel *et al.* (1987) evaluaron la acción del PCP y de vanos de sus metabolitos con 30 diferentes cepas bacterianas. Los resultados mostraron que, para las especies de los géneros *Clostridium*, *Mycobacterium* y *Streptomyces*, la Concentración Mínima Inhi-

bitoria (CMI) oscilaba entre 0.03 y 0.06 mM. No se encontró una diferencia clara entre la susceptibilidad de las bacterias gram negativas y las gram positivas, ni entre cocos y bacilos, ni entre bacterias aerobias y anaerobias. La alta solubilidad del PCP solventes orgánicos y su carácter lipofílico facilita su unión a los lípidos de la membrana, lo cual desencadena eventos de toxicidad.

Tabla 2. Valores de C_{50} obtenidos para el pentaclorofenol en los diferentes ensayos de inhibición de la producción de metano.

| Ensayo | C_{50} mM confianza 95% | Intervalo |
|--------------------|------------------------------|--------------|
| 1 | 0.052 | 0.044-0.067 |
| 2 | 0.035 | 0.032-0.039 |
| 3 | 0.043 | 0.039-0.050 |
| 4 | 0.034 | 0.030-0.039 |
| 5 | 0.049 | 0.044-0.057 |
| 6 | 0.036 | 0.029-0.050 |
| 7 | 0.048 | 0.043-0.055 |
| C_{50} Promedio: | | |
| 0.043mM | S = 0.0075 | %C.V = 17.58 |

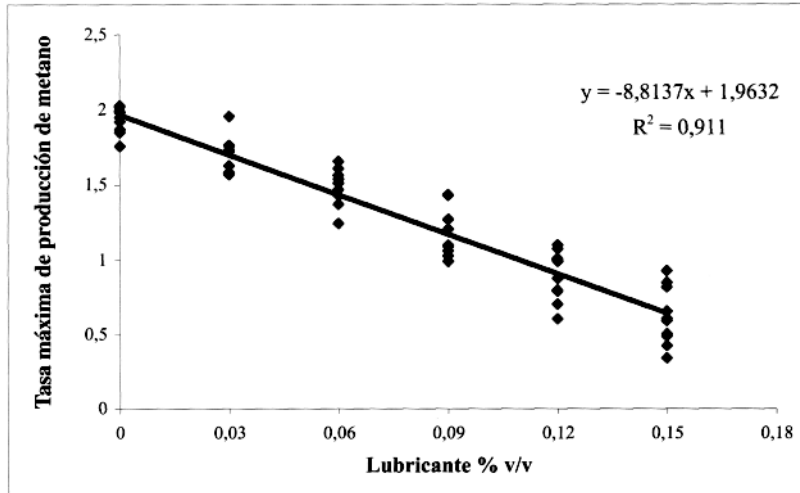


Figura 4. Tasa máxima de producción de metano en función de la concentración de lubricante.

Inhibición de la producción de metano con el lubricante. Al igual que con el PCP, el lubricante mostró un efecto inhibitorio proporcional a la concentración (figura 4). La tasa máxima de producción de metano disminuye al aumentar la concentración del lubricante, y el comportamiento se ajusta a un modelo lineal descrito por la ecuación: $Y(\text{ml CH}_4/\text{h}) = -8.8 X(\%v/v \text{ lubricante}) + 1.96$ ($r^2 = 0.91$). Al escribir la ecuación en términos de las variables, el modelo permite predecir que la inhibición del lubricante sobre la población metanogénica sería: $\text{TMPM}(\text{ml CH}_4/\text{h}) = \text{TMPM}_c(\text{ml CH}_4/\text{h}) + \beta * [\text{lubricante } \%v/v]$, donde el valor TMPM_c corresponde a la tasa máxima de producción de metano en el control negativo (1.96) y β a la pendiente de la gráfica, una medida del potencial inhibitorio del lubricante, que para este caso fue -8.8.

Estudios realizados sobre el efecto de surfactantes aniónicos del tipo alquil-benceno-sulfonato lineal (LAS), en poblaciones acidogénicas y metanogénicas acetoclásticas de lodos termofílicos (García-Morales *et al.*, 2001), mostraron que existe una relación lineal entre la tasa de producción de metano y la concentración del surfactante, con un valor p de -0.033, menor que el obtenido en este trabajo. Esto indicaría que el lubricante de tipo catiónico podría tener un potencial tóxico mucho mayor que los surfactantes aniónicos. Por tanto, la toxicidad observada no sería solamente el resultado de la actividad surfactante del lubricante, sino de otras propiedades químicas que podrían contribuir a generar el efecto tóxico observado.

A pesar que desde 1935 se conoce el potencial microbida de los surfactantes de tipo catiónico (Schuartz y Perry, 1949), no es claro el mecanismo por medio del cual estos compuestos ejercen su actividad tóxica. En general, dicha actividad se relaciona con la estructura química de los surfactantes catiónicos, y la presencia de grupos hidrofóbicos, capaces de reducir la tensión superficial. Estos compuestos se adsorben a la superficie de las bacterias, impidiendo la interacción de las células con el medio circundante, lo que conlleva la interrupción de muchas funciones metabólicas. Sin embargo, no se descarta que otros factores contribuyan a la toxicidad de estos compuestos.

Con base en la curva concentración-respuesta (figura 5), se obtuvo la ecuación: $I(\%) = 479.82 X(\%v/v \text{ lubricante}) - 4.275$, a partir de la cual se calculó el valor de la NOEC (0.009 % v/v). La CI_{50-48h} promedio fue de 0.11% v/v (tabla 3). El coeficiente de variación encontrado fue 15.4 % del mismo orden al obtenido en los ensayos con PCP. El valor de la CI_{50} fue 10 veces mayor que el reportado por Nagel *et al.* (1999) para un lubricante sintético no iónico (0.018% v/v).

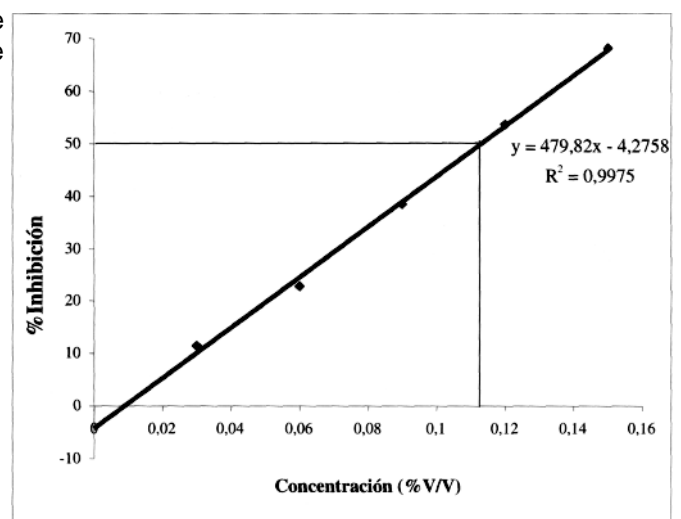


Figura 5. Curva concentración-respuesta para el lubricante.

Tabla 3. Valores de CI_{50} obtenidos para el lubricante en los ensayos de inhibición de la producción de metano.

| Ensayo | CI_{50} % v/v | Intervalo 95% confianza |
|--|-----------------|-------------------------|
| 1 | 0.105 | 0.095-0.116 |
| 2 | 0.105 | 0.097-0.114 |
| 3 | 0.09 | 0.082-0.1 |
| 4 | 0.095 | 0.087-0.103 |
| 5 | 0.111 | 0.1-0.127 |
| 6 | 0.1 | 0.091-0.109 |
| 7 | 0.142 | 0.122-0.179 |
| 8 | 0.134 | 0.107-0.191 |
| 9 | 0.107 | 0.091-0.131 |
| 10 | 0.136 | 0.118-0.165 |
| Promedio: 0.11 % v/v S = 0.017 %C.V = 15.39 | | |

Los resultados sugieren que, en las condiciones del ensayo, cualquier concentración del lubricante por encima de 0.009 % v/v (NOEC) podría ejercer un efecto adverso sobre la población metanogénica acetoclástica. Sin embargo, es necesario hacer determinaciones experimentales con concentraciones entre 0.009 y 0.03% v/v que permitan confirmar o rechazar esta extrapolación. Además, en condiciones reales de operación, el lubricante no sólo está muy diluido sino que además existen factores como pH, concentración de gran cantidad de materia orgánica y la presencia de otros compuestos químicos, que pueden afectar la actividad tóxica del lubricante puro.

Inhibición de la producción de metano con el agua residual. El efecto tóxico medido en las cuatro muestras de agua residual se consigna en la figura 6. En ella se presenta el valor de la tasa máxima de producción de metano obtenido con cada una de las réplicas así como en las del control negativo. Los valores más bajos se observaron en la muestra 1 (1,7-1,81 mi CH_4/h). El resultado del procedimiento del análisis Pasa/Falla propuesto por la USEPA para ensayos de toxicidad con una sola concentración, mostró que el efecto inhibitorio era significativo para las muestras 1, 2 y 4 ($\alpha = 0.05$).

Aunque los valores de inhibición encontrados son relativamente bajos, 11.4%, 7.7% y 8.1% para las muestras 1, 2 y 4, respectivamente, este hecho

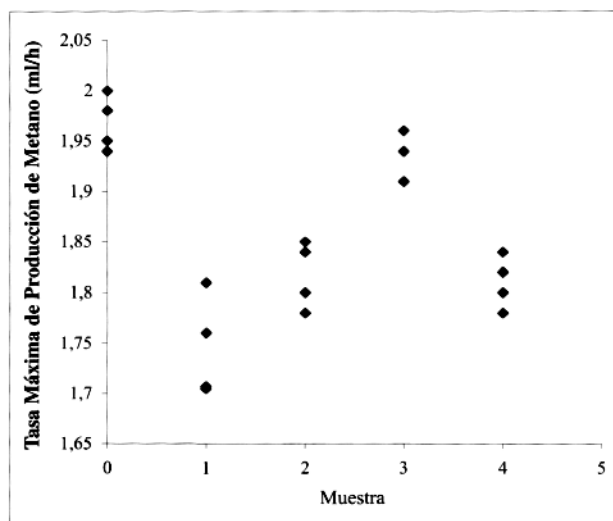


Figura 6. Tasa máxima de producción de metano en el control negativo y en las muestras de agua residual.

puede considerarse como una alerta sobre la posible presencia de sustancias que pueden desencadenar eventos de toxicidad.

Con el fin de estimar la concentración del lubricante en el agua residual, dada la dificultad para cuantificarlo mediante análisis químico, se llevó a cabo un balance de masa. Para ello, se tomó como base en el consumo diario promedio de lubricante (65 kg/d) los datos horarios del caudal de entrada a la planta de tratamiento para un período de 15 días (García, 2003), y se asumió que el lubricante no se biodegradaba. Los resultados obtenidos muestran que la concentración estimada de lubricante en el agua residual estaría entre 0.00061 y 0.0017% v/v. Este valor está muy por debajo del valor calculado de la NOEC (0.009% v/v). Por esta razón, se consideró que la toxicidad detectada podría no estar asociada al lubricante, ya que la concentración estimada no sería suficiente para causar el efecto inhibitorio observado.

Por lo anterior es claro que, a partir de los resultados obtenidos con el balance de masas, no se puede hacer una asociación entre la inhibición observada y la presencia del lubricante en el agua residual. Por tanto, para hacer este tipo de asociación será necesario llevar a cabo un procedimiento de identificación química acoplado con técnicas de fraccionamiento. A pesar de lo anterior, los resultados señalan que la metodología utilizada permite detectar eventos tóxicos, lo cual puede contribuir a mejorar la operación de estos reactores.

CONCLUSIONES

Los ensayos de inhibición de la producción de metano permitieron establecer parámetros de toxicidad como la CI_{50} y la NOEC.

Los ensayos de inhibición de la producción de metano con POP mostraron que la prueba es reproducible, y que concentraciones superiores a 0.01 mM tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre la población metanogénica.

Los ensayos con el lubricante puro permitieron establecer que una concentración de 0.03 mM o superior ejerce un fuerte efecto inhibitorio sobre la producción de metano.

Aunque con el balance de masas no se pudo establecer una asociación entre el efecto tóxico observado y la concentración del lubricante estimada en el agua residual, es claro que se pueden presentar eventos temporales de toxicidad, ya sean generados por el lubricante u otros compuestos que pueden inhibir la producción de metano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la División de Investigación de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto, a los funcionarios de las plantas cerveceras por la colaboración prestada, al personal del laboratorio de Recursos Genéticos y Ambientales del Instituto de Biotecnología y al ingeniero Miller Camargo por sus valiosos aportes para el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alazard, D.; Molina, F. 1997. Manual microbiología de la digestión anaerobia y caracterización de lodos anaerobios. Medellín: ORSTOM y Universidad de Antioquia.
- American Public Health Association (APHA). American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPC). 1998. Standard methods for examination of water and wastewater. 20 Edition. Baltimore USA.
- Austermann, U.; Lange, R.; Seyfried, C.; Rosenwinkel, K. 1998. Upgrading an Anaerobic/Aerobic Wastewater Treatment Plant. *Water Science Technology*. 37:243-250.
- Bertoletti, E.; Nipper, M.G.; Magalhaes, N.P. 1992. A Precisão de testes de toxicidade com Daphnia. *Ambiente*. 6(1): 55-59.
- Collazos, C. 2000. Biodegradabilidad anaerobia de efluentes cerveceros. *Tesis de Maestría*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Espitia, S. 1999. Caracterización microbiana de lodos anaerobios. *Tesis de Maestría*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Fernández, A.; Huang, S.; Seston, S.; Xing, J.; Hickey, R.; Criddle, C.; Tiedje, J. 1999. How Stable is Stable? Function Versus Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8): 3697-3704.
- Field, J. 1967. Degradación anaerobia de compuestos orgánicos. Arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo. UASB. Manual Curso. Santiago de Cali. Colombia: Universidad del Valle. Corporación Autónoma Regional del Cauca y Universidad Agrícola de Wageningen.
- García, C. 2003. Evaluación de la toxicidad del agua residual de una planta cerveceras sobre un lodo anaerobio. *Tesis de Maestría*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- García-Morales, J.; Nebot, E.; Romero, L.; Sales, D. 2001. Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear Aakylbenzene sulfonate. *Chem. Biochem. Eng.* 15 (1): 13-19.
- Glas, K.; Schmaus, B. 2000. Aspectos ecológicos de la limpieza y desinfección. Lubricantes para cadenas, acetatos amínicos y productos de limpieza y desinfección, parte 3. Brauwelt, pp. 587-591.
- Kugelman, I.; Chin, K. 1971. Toxicity, synergism and antagonism in anaerobic waste treatment processes. Washington. *Advances in Chemical Series*. 105:55-90.
- Lin, C. 1992. Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion. *Water Research*. 26 (2): 177-183.
- Nagel, P.; Urtubia, A.; Aroca, G.; Chamy, R.; Schiappacasse, M. 1999. Methanogenic toxicity and anaerobic biodegradation of Chemical products in use in a brewery. *Water Science Technol.* 40:169-176.
- Owen, W.; Stuckey, C.; Healy, J.; Young, L.; McCarty, P. 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*. 13,485-492.
- Scholten, J. 1999. *The Influence of Sulfate and Nitrate on the Methane Formation by Methanogenic Archaea in Freshwater Sediments*. Netherlands Organization for Scientific Research. Holanda.
- Schultz, A.; Perry, J. 1949. *Surface Active Agents: Their Chemistry and Technology*. New York. Interscience Publishers, Inc.
- Ruckdeschel, G.; Renner, G.; Schwarz, K. 1987. Effects of pentachlorophenol and some of its known and possible metabolites on different species of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(11) 2689-2692.
- Sierra, A.; Lettinga, G. 1991. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 34,544-550.
- USEPA. 1991. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organism*. 4^a ed. Editado por Cornelius I. Weber. Washington DC.
- Whitman, W.B., Bowen, T.I.; Boone D.R. 1992. The methanogenic bacteria. In: *Prokaryotes*. 2nded. New York: Springer Verlag.
- Wu, W.; Hickey, R.; Zeikus, G. 1991. Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery waste water role of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (12): 3438-3449.