



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**ELIMINACIÓN ANOXICA DE CARBONO, NITROGENO Y AZUFRE  
POR MEDIO DE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIFICADO INVERSO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**RICARDO BERISTAIN CARDOSO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**JULIO 2004.**

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Microbiana del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.**

*La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el número de registro 0471-O.*

Iztapalapa, D.F. a 30 de Julio del 2004

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**ELIMINACIÓN ANOXICA DE CARBONO, NITROGENO Y AZUFRE POR MEDIO DE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIFICADO INVERSO.**

Que presentó  
**RICARDO BERISTAIN CARDOSO**

**Comité Tutorial**

Director: Dr. Jorge Gómez Hernández

Asesores: Dr. Elías Razo Flores

Dr. Frederick Thalasso

**Jurado**

Presidente: Dra. Mónica Meraz Rodríguez

Secretaria: Dra. Flor de María Cuervo López

Vocal: Dra. Marcia Morales Ibarria

Vocal: Dr. Elías Razo Flores

The image shows handwritten signatures and lines for the committee members. On the right side, there are several horizontal lines, some of which are crossed out with a large 'X' or a signature. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized. The lines are arranged vertically, corresponding to the names listed on the left. The first line is crossed out with a large 'X'. The second line is crossed out with a signature. The third line is crossed out with a signature. The fourth line is crossed out with a signature. The fifth line is crossed out with a signature. The sixth line is crossed out with a signature. The seventh line is crossed out with a signature. The eighth line is crossed out with a signature. The ninth line is crossed out with a signature. The tenth line is crossed out with a signature.

INDICE	página
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1 Introducción</b> .....	4
<b>1.1 Situación actual</b> .....	4
<b>1.2 Problemática de la presencia de nitrógeno y sulfuro en el agua residual</b> .....	5
1.2.1 Impacto del nitrógeno en el ambiente .....	5
1.2.2 Impacto del sulfuro en el ambiente .....	5
<b>1.3 Biotransformación biológica del nitrógeno y el azufre</b> .....	6
1.3.1 Ciclo Biogeoquímico del nitrógeno.....	6
1.3.1.1 Fijación del nitrógeno .....	7
1.3.2 Ciclo Biogeoquímico del azufre.....	8
1.3.2.1 Compuestos del ciclo biológico del azufre.....	9
1.3.2.2 Ciclo biológico del azufre y tecnología ambiental.....	12
1.3.2.3 Estabilidad del azufre elemental.....	12
<b>1.4 Desnitrificación</b> .....	12
1.4.1 Desnitrificación Heterotrófica .....	14
1.4.2 Desnitrificación Litotrófica .....	15
<b>1.5 Microbiología de la desnitrificación y sulfo-oxidación</b> .....	16
1.5.1 Microbiología de la desnitrificación.....	16
1.5.2 Microbiología de la sulfo-oxidación.....	16
<b>1.6 Proceso respiratorio de la desnitrificación y sulfo-oxidación</b> .....	17
1.6.1 Proceso respiratorio de la desnitrificación.....	17
1.6.2 Proceso respiratorio de la sulfo-oxidación.....	18
<b>1.7 Fisiología y bioquímica de la desnitrificación y sulfo-oxidación</b> .....	18
1.7.1 Bioquímica de la desnitrificación.....	18
1.7.2 Bioquímica de la sulfo-oxidación .....	19
<b>1.8 Oxidación de compuestos azufrados por microorganismos desnitrificantes</b> .....	20
<b>1.9 Oxidación de compuestos azufrados por bacterias “incoloras” del azufre</b> .....	22
<b>1.10 Eliminación simultánea de C, N y S bajo condiciones desnitrificantes</b> .....	24
<b>1.11 Biopelícula</b> .....	25
1.11.1 Concepto de biopelícula.....	25
1.11.2 Formación de la biopelícula.....	26
<b>1.12 Soportes</b> .....	27
<b>1.13 Reactor de Lecho fluidificado con biopelícula</b> .....	28
<b>1.14 Reactor de Lecho fluidificado inverso (RLFI)</b> .....	28
<b>2. Objetivos</b> .....	31
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	33
<b>3.1 Características del reactor continuo de tanque agitado (RCTA)</b> .....	33
<b>3.2 Inóculo</b> .....	33
<b>3.3 RCTA bajo condiciones desnitrificantes</b> .....	34
3.3.1 Medio de cultivo .....	34
<b>3.4 Características del reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI)</b> .....	34
<b>3.5 Inmovilización de la biopelícula en el RLFI</b> .....	35
<b>3.6 Operación del RLFI bajo condiciones desnitrificantes heterotróficas</b> .....	36
<b>3.7 Operación del RLFI bajo condiciones desnitrificantes organo-litótrofas</b> .....	36
<b>3.8 Métodos de análisis</b> .....	37

3.8.1 Compuestos nitrogenados.....	37
3.8.2 Compuestos azufrados.....	38
3.8.3 Compuestos carbonados.....	39
3.8.4 Cuantificación de biomasa (SSV) y biomasa inmovilizada.....	40
3.8.5 Determinación de la velocidad volumétrica de producción de biogás.....	40
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Estabilización del proceso desnitrificante en el RCTA.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Inmovilización de la biopelícula en el RLFI en lote.....</b>	<b>43</b>
4.2.1 Balance de masa en el RLFI bajo condiciones desnitrificantes.....	45
<b>4.4 Estabilización del proceso desnitrificante organo-litótrofo (DOL) en el RLFI.....</b>	<b>46</b>
4.4.1 Balance de masa en el RLFI bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.4....	50
4.4.2 Balance de masa en el RLFI bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.1....	51
4.4.3 Balance de masa en el RLFI bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.25...	53
<b>5. Conclusiones y Recomendaciones.....</b>	<b>55</b>
<b>6. Anexo I.....</b>	<b>58</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>74</b>

## INDICE DE TABLAS

	página
<i>Tabla 1.</i> Niveles de toxicidad del H <sub>2</sub> S y su efecto a la salud.....	6
<i>Tabla 2.</i> Estados de oxidación de compuestos nitrogenados.....	7
<i>Tabla 3.</i> Estados de oxidación de compuestos azufrados.....	10
<i>Tabla 4.</i> Géneros bacterianos con capacidad desnitrificante.....	16
<i>Tabla 5.</i> Características de Géneros procaríotes oxidantes del azufre.....	17
<i>Tabla 6.</i> Cambio de la fuerza iónica a diferentes velocidades de alimentación de sulfuro utilizando <i>T. denitrificans</i> .....	21
<i>Tabla 7.</i> Composición del medio de cultivo para el RCTA bajo condiciones desnitrificantes.....	34
<i>Tabla 8.</i> Composición del medio de cultivo para la formación de la biopelícula.....	36
<i>Tabla 9.</i> Composición del medio de cultivo para el RLFI bajo condiciones desnitrificantes.....	36
<i>Tabla 10.</i> Composición promedio de nitrógeno y carbono del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones desnitrificantes heterotróficas en el RLFI.....	46
<i>Tabla 11.</i> Eficiencias de consumo de sulfuro, nitrato, acetato y rendimiento desnitrificante (Y-N <sub>2</sub> ) en el estado estacionario en función de la relación C/N en el RLFI.....	48
<i>Tabla 12.</i> Composición promedio de nitrógeno, carbono y azufre del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones DOL a una relación C/N 1.4 en el RLFI.....	51
<i>Tabla 13.</i> Composición promedio de nitrógeno, carbono y azufre del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones DOL a una relación C/N 1.1 en el RLFI.....	52
<i>Tabla 14.</i> Composición promedio de nitrógeno, carbono y azufre del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones DOL a una relación C/N 1.25 en el RLFI.....	53

## INDICE DE FIGURAS

	página
<i>Figura 1.</i> Ciclo de oxidación-reducción del nitrógeno.....	8
<i>Figura 2.</i> Ciclo biológico del azufre.....	9
<i>Figura 3.</i> Especies de sulfuro en función del pH.....	10
<i>Figura 4.</i> Rutas desasimilativas y asimilativas del nitrato.....	13
<i>Figura 5.</i> Flujo de electrones en <i>Thiobacillus</i> durante el crecimiento con S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> y HS <sup>-</sup> .....	18
<i>Figura 6.</i> Etapas de formación de biopelícula.....	26
<i>Figura 7.</i> Configuración del reactor de lecho fluidificado con biopelícula.....	28
<i>Figura 8.</i> Configuración del reactor de lecho fluidificado inverso.....	29
<i>Figura 9.</i> Esquema del reactor de tanque agitado y dispositivos.....	33
<i>Figura 10.</i> Esquema del reactor de lecho fluidificado inverso y dispositivos.....	35
<i>Figura 11.</i> Perfil de compuestos nitrogenados en el reactor continuo de tanque agitado bajo condiciones desnitrificantes.....	42
<i>Figura 12.</i> Inmovilización de biopelícula en el RLFI.....	43
<i>Figura 13.</i> Perfil de compuestos carbonados en el RLFI bajo condiciones desnitrificantes.....	44
<i>Figura 14.</i> Comportamiento de la oxidación del sulfuro en función de la acumulación de S <sup>0</sup> y de la relación C/N en el RLFI.....	47
<i>Figura 15.</i> Fotos del RLFI.....	49
<i>Figura 16.</i> Orden de las velocidades de reacción en la eliminación de acetato, nitrato y sulfuro bajo condiciones desnitrificantes.....	50

## RESUMEN

Las descargas de aguas residuales provenientes de la Industria Petroquímica tienen gran relevancia a nivel mundial, por la presencia de compuestos aromáticos, amonio y altas concentraciones de sulfuro principalmente; los cuales tienen un impacto adverso en los ecosistemas naturales y en la salud pública. Debido a esto cobra importancia la necesidad de desarrollar sistemas biológicos que permitan que las descargas de aguas residuales no causen un deterioro a los cuerpos receptores de agua.

En este trabajo se utilizó un proceso desnitrificante para la eliminación simultánea de carbono, nitrógeno y azufre en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI), con un volumen de operación de 1.7 L y un tiempo de residencia hidráulica de 22 h. Este trabajo se enfocó principalmente en la parte oxidativa del ciclo del azufre, con la finalidad de determinar las condiciones que favorecen la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental y separarlo del sistema. Las velocidades de carga del sulfuro y del nitrógeno fueron de 70 mg S<sup>2-</sup>/L-d y 217 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L-d, las cuales se mantuvieron constantes. Se alimentó el acetato a diferentes relaciones C/N (1.4, 1.1 y 1.25). Durante el estado estacionario bajo condiciones desnitrificantes a una relación C/N de 1.4, los productos principales fueron N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y azufre elemental (S<sup>0</sup>), con eficiencias de consumo de acetato, nitrato y sulfuro del 100% para todos los casos. El azufre elemental no se detectó en el efluente posiblemente debido a la presencia de sustancias exopoliméricas (principalmente proteínas), lo que condujo a acoplar un sedimentador a la salida del RLFI para separarlo del sistema, ya que el S<sup>0</sup> se detectó dentro del reactor. Cuando la relación C/N se disminuyó de 1.4 a 1.1, los productos principales fueron N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, con eficiencias de consumo de acetato, nitrato y sulfuro de 100, 99.1 ± 1.2 y 90.4 % ± 4.5, respectivamente. La proteína soluble exopolimérica disminuyó en un 70%, pero el cambio de la relación C/N modificó la ruta metabólica. Con respecto a los resultados de la relación C/N de 1.25, los productos principales fueron N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, con eficiencias de consumo de acetato, nitrato y sulfuro del 100% para todos los casos. Estos resultados indican que el control de la relación C/N en la desnitrificación para la eliminación de C, N y S es indispensable para obtener el producto azufrado deseado, aparte de que la desnitrificación resulta un proceso alternativo para la eliminación simultánea de carbono, nitrógeno y azufre de la industria petroquímica.

## ABSTRACT

The discharges of wastewaters coming from the Petrochemical Industry have great relevance world wide, due to the presence of aromatic compounds, ammonium and high concentrations of sulfide mainly, which have an adverse impact in natural ecosystems and public health. Therefore the necessity to find biological systems that remove from residual waters discharges and avoid further a deterioration to the water bodies.

In this work, a biological denitrification process was used for the simultaneous elimination of carbon, nitrogen and sulfur in an inverse fluidized bed reactor (IFBR), with a 1.7 L nominal volume and 22 h HTR. This work was focused mainly in the oxidative part of the cycle of the sulfur, to find the conditions that favor the partial oxidation of sulfide to elemental sulfur and to facilitate its separation using this system. The sulfide and of the nitrogen loading speed were 70 mg S<sup>2-</sup>/L-d and 217 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L-d which remained constant while acetate was fed at several C/N ratios (1.4, 1.1 and 1.25). During denitrifying conditions at a C/N ratio of 1.4, the main products were N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and elemental sulfur (S<sup>0</sup>), with efficiencies of acetate consumption, nitrate and sulfide around 100% for all cases. The elemental sulfur was not detected in the effluent due to the presence of exopolymeric substances (mainly proteins), that led to install a sedimentador at the exit of the IFBR to separate the elemental sulfur from the system, because of that the S<sup>0</sup> was detected inside the reactor. When the C/N ratio diminished from 1.4 to 1.1, the main products were N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, with efficiencies of acetate consumption, nitrate and sulfide of 100, 99.1 ± 1.26 and 90.4 % ± 4.5, respectively. The soluble protein content diminished in 70%, but the change in C/N ratio modified the metabolic path. Regarding to the results at C/N ratio of 1.25, the main products were N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, with efficiencies of acetate consumption, nitrate and sulfide of 100% for all cases. These results indicate that the control of the C/N ratio in the denitrification for the elimination of C, N and S is indispensable to obtain the wanted sulfurated product apart from that the denitrification is an alternative process for the simultaneous elimination of carbon, nitrogen and sulfur from effluents of the Petrochemical Industry.

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. Introducción

### 1.1 Situación Actual

En la actualidad, las descargas de aguas residuales sin tratamiento, provenientes de la actividad industrial, agrícola y urbana han incrementado la contaminación en las corrientes naturales de agua con una amplia gama de sustancias tóxicas, lo que disminuye su disponibilidad y aprovechamiento potencial.

La industria del petróleo en México es la segunda productora, en volumen y carga de aguas residuales industriales, y en algunos efluentes es común encontrar altas concentraciones de sulfuro junto con compuestos aromáticos y nitrogenados. El sulfuro representa un problema ambiental debido a su toxicidad y por los malos olores que provoca. El sulfuro cuando alcanza los cuerpos de agua superficiales puede causar una deficiencia de oxígeno, que es muy importante para ciertas especies acuáticas (Lesley *et al.*, 1992).

El aumento de la concentración de nitrógeno en el agua ha colocado a este compuesto como uno de sus principales contaminantes, ya que parte importante de este nitrógeno en forma de amonio, nitrato y nitrito ocasiona un grave daño ambiental como la eutroficación, toxicidad hacia especies acuáticas y un riesgo para la salud humana.

El agua residual contaminada debe ser tratada para eliminar el carbono, nitrógeno y azufre por su impacto adverso en el ambiente. Debido a esto cobra relevancia la necesidad de desarrollar sistemas de eliminación acoplados o simultáneos que permitan que las descargas de aguas residuales no causen deterioro a los cuerpos de agua receptores.

Los contaminantes del agua pueden ser eliminados por operaciones químicas, físicas o biológicas. Los primeros pueden ser por arrastre con vapor, intercambio iónico y precipitación, pero generalmente no resuelven el problema, sólo lo trasladan de una fase a otra. Su eficiencia puede ser alta, pero implica un alto costo de operación y mantenimiento. Los procesos biológicos como lodos activados, lagunas de estabilización y la nitrificación-desnitrificación entre otros, han llegado a ser una alternativa. Principalmente la nitrificación y desnitrificación han constituido la forma más efectiva y económicamente factible en la eliminación de compuestos nitrogenados de las aguas residuales (Cervantes *et al.*, 2000).

## 1.2 Problemática de la presencia de nitrógeno y sulfuro en el agua residual

### 1.2.1 Impacto del nitrógeno en el ambiente

Las aguas residuales industriales sin tratamiento, ocasionan descargas masivas de nitrógeno en las aguas receptoras provocando su contaminación y eutroficación. El nitrógeno es un nutriente limitante para ecosistemas acuáticos, por lo tanto su presencia estimula el crecimiento de fitoplancton en lagos y las consecuencias más frecuentemente observadas cuando se alcanza un estado eutrófico podemos resumirlas en los siguientes fenómenos (Harper, 1992):

- Biomasa abundante.
- Cambio de coloración en las aguas.
- Transparencia reducida.
- Disminución de oxígeno en las capas profundas.
- Olores desagradables producidos por descomposición.
- Aparición de especies indicadoras del estado eutrófico (principalmente cianobacterias).

### 1.2.2 Impacto del sulfuro en el ambiente

El ácido sulfhídrico,  $H_2S$ , es emitido al ambiente por un gran número de industrias como la petrolera, tanerías, producción de viscosa y celofán, además este compuesto es el resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato, se encuentra presente en la extracción de gas natural y es un intermediario de la oxidación biológica de  $CS_2$  (Revah *et al.*, 1995). Sus propiedades corrosivas están relacionadas con el daño a paredes de concreto de los reactores, sistemas de drenaje y tuberías de acero; su emisión al ambiente además de su toxicidad genera olores desagradables y lluvia ácida (Alcántara 2000). En la Tabla 1 se muestran los niveles de toxicidad del ácido sulfhídrico y sus efectos a la salud.

**Tabla 1.** Niveles de toxicidad del H<sub>2</sub>S y su efecto a la salud.

Concentración de H <sub>2</sub> S (ppm)	Efecto a la salud
1.00	Mal olor (a huevo en descomposición)
10.0	Nivel máximo permisible durante una jornada laboral de 8 horas.
20.0	Se requiere de equipo de seguridad
100	Puede causar dolor de cabeza y náusea, pérdida del sentido del olfato de 2-15 min.
200	Rápida pérdida del sentido del olfato, ardor de ojos y tráquea
500	Pérdida de equilibrio y de razonamiento, insuficiencia respiratoria en 200 min.
700	Inconciencia inmediata, sin un tratamiento adecuado paro respiratorio y muerte.

Tomado de Janssen, A. (1996)

Con lo anterior, es claro que los efluentes deben estar prácticamente libres de sulfuro. Es común que se establezca como límite para descargas valores menores a 1 mg/L. Por diferentes razones: de salud pública (toxicidad), ambientales (control de olor), ecológicas (deficiencia de oxígeno en cuerpos receptores de agua) y económicas (corrosión de equipo), las corrientes de agua residual contaminadas con sulfuro deben ser tratadas antes de ser descargadas a los cuerpos receptores.

### 1.3 Biotransformación biológica del nitrógeno y el azufre.

#### 1.3.1 Ciclo Biogeoquímico del nitrógeno

El elemento nitrógeno, N, constituyente básico del protoplasma, se encuentra en varios estados de oxidación (Tabla 2). Varias de las reacciones clave de óxido reducción del nitrógeno que tienen lugar en la naturaleza las llevan a cabo casi exclusivamente microorganismos, por lo que su participación en el ciclo del nitrógeno es de gran importancia. Desde el punto de vista de la termodinámica, el nitrógeno gaseoso, N<sub>2</sub>, es la forma más estable de este elemento, y a la que revierte el nitrógeno atómico en condiciones de equilibrio. Esto explica que el reservorio más importante de nitrógeno en la tierra sea la atmósfera. Contrasta con el caso del carbono, que tiene en la atmósfera un reservorio de poca importancia (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>). La gran cantidad de energía necesaria para romper el enlace N≡N del nitrógeno molecular. Significa que la reducción de N<sub>2</sub> es un proceso que requiere gran cantidad de energía. Sólo un número de organismos relativamente reducido puede utilizar el N<sub>2</sub>, en el proceso que se conoce como

fijación de nitrógeno. Por lo tanto, el reciclado del nitrógeno presente en la tierra requiere, en gran parte, las formas fácilmente convertibles, amoníaco y nitrato (Madigan *et al.*, 1999).

**Tabla 2.** Estados de oxidación de compuestos nitrogenados

<b>Compuesto</b>	<b>Estado de oxidación</b>
Nitrógeno orgánico (R-NH <sub>2</sub> )	-3
Amoníaco (NH <sub>3</sub> )	-3
Gas nitrógeno (N <sub>2</sub> )	0
Oxido nitroso (N <sub>2</sub> O)	+1 (media por nitrógeno)
Oxido de nitrógeno (NO)	+2
Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	+3
Dióxido de nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	+4
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	+5

La Figura 1 muestra el ciclo global del nitrógeno. La transferencia de nitrógeno hacia y desde la atmósfera ocurre en gran parte en forma de N<sub>2</sub>, con una menor transferencia en forma de óxidos nitroso y nítrico, (N<sub>2</sub>O y NO), y amoníaco gaseoso (NH<sub>3</sub>). La transferencia entre el compartimiento terrestre y el acuático es principalmente como nitrógeno orgánico, ion amonio e ion nitrato.

### **1.3.1.1 Fijación del nitrógeno**

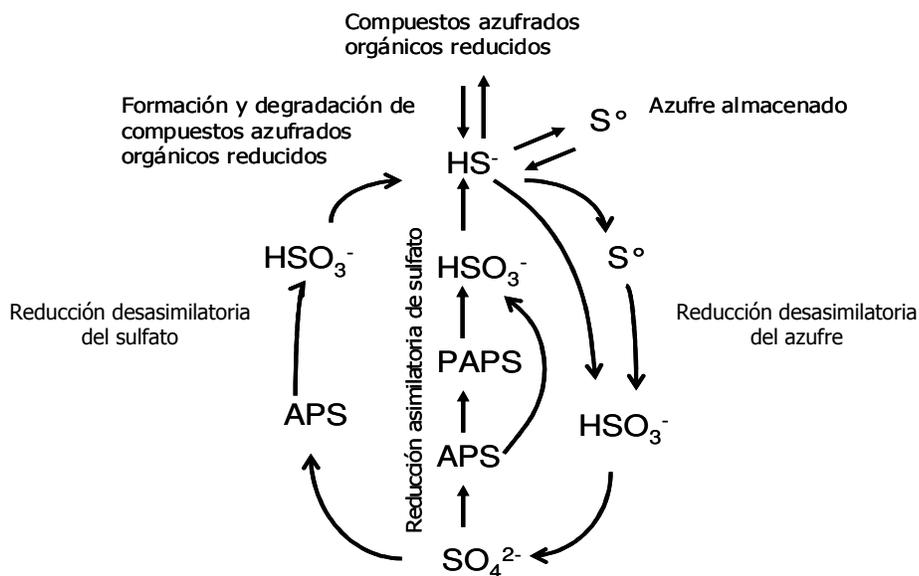
Desde el punto de vista biogeoquímico este proceso es vital para el mantenimiento del ciclo de nitrógeno. Es en su mayor parte biológico y un limitado número de procariotes quimiótrofos y fotótrofos son los únicos organismos capaces de realizarlo. Estos organismos capaces de crecer a expensas del nitrógeno molecular se les conocen con el nombre de “diazótrofos”.

Debido a la alta estabilidad de la molécula diatómica N≡N, para disociarse deben darse condiciones drásticas de presión y temperatura. Algo de nitrógeno es combinado por la luz ultravioleta, los equipos eléctricos, actividad volcánica, motores de combustión interna, rayos de las tormentas y es arrastrado por las precipitaciones pluviales convirtiéndose en disponible para la biosfera, aunque todos estos procesos no representan más del 0.5%.



Eventualmente el  $\text{SO}_4^{2-}$ , por actividad reductora de algunos microorganismos en condiciones anóxicas, llega a formar  $\text{H}_2\text{S}$ .

Aunque son posibles varios estados de oxidación, sólo tres tienen importancia en la naturaleza: -2 (sulfhídrico,  $\text{R-SH}$ , y sulfuro,  $\text{HS}^-$ ), 0 (azufre elemental,  $\text{S}^0$ ) y +6 (sulfato,  $\text{SO}_4^-$ ). La mayor parte del azufre de nuestro planeta se encuentra en sedimentos y rocas en forma de minerales de sulfato (principalmente yeso,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y minerales de sulfuro (principalmente pirita,  $\text{FeS}_2$ ), aunque el mar constituye el reservorio más importante de azufre para la biosfera en forma de sulfato inorgánico (Madigan *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Ciclo biológico del azufre. El azufre elemental almacenado probablemente tiene que ser reducido a sulfuro antes de su oxidación. APS: adenosina-5'-fosfosulfato, PAPS: 3'-fosfoadenosina 5' fosfosulfato (Lens y Hulshoff Pol, 2000).

### 1.3.2.1 Compuestos del ciclo biológico del azufre

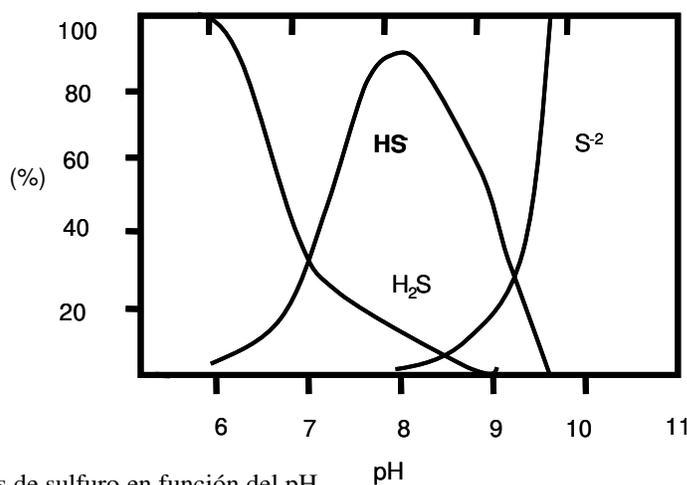
Los compuestos azufrados más comunes que se usan como fuente de energía son el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), el azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) y el tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ). En la mayor parte de los casos el producto final de la oxidación es el sulfato ( $\text{SO}_4^-$ ), y el número total de electrones implicados desde el  $\text{H}_2\text{S}$  (-2) al sulfato (+6) es de ocho, Tabla 3 (Lens y Hulshoff Pol, 2000).

**Tabla 3.** Estados de oxidación de compuestos azufrados

Compuesto	Fórmula química	Estado de oxidación
S orgánico	R-SH	-2
Sulfuro	H <sub>2</sub> S	-2
Polisulfuro	<sup>-</sup> S(S) <sub>n</sub> S <sup>-</sup>	-1(S terminal) / 0 (S interno)
Tiosulfato	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+2 (promedio por S)
Tetratiónato	S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	+2.5 (promedio por S)
Azufre elemental	Anillos S <sub>n</sub>	0
bisulfito	HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+4
Sulfato	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	+6

Tomado de Madigan *et al.*, 1999 y Hulshoff Pol, 2000.

*Sulfuro de hidrógeno.* El sulfuro de hidrógeno, H<sub>2</sub>S, es la forma más reducida del azufre, es tóxico, inflamable y soluble en agua (0.1 M a 25° C) con un pK<sub>1</sub> alrededor de 7 y otro pK<sub>2</sub> de 13. Es formado como el producto principal de la respiración de sulfato por bacterias sulfato reductoras en condiciones anaerobias cuando la materia orgánica no está limitada. El sulfuro también es liberado por desulfuración de compuestos orgánicos que contienen azufre reducido (proteínas). La forma en que está presente el sulfuro en el ambiente depende del pH del mismo, Figura 3 (Oliver *et al.*, 1996).



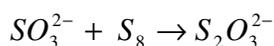
**Figura 3.** Especies de sulfuro en función del pH.

A pH alto, la forma dominante es el sulfuro, S<sup>2-</sup>, a pH neutro el HS<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>S, y por debajo de pH 6, la principal molécula es H<sub>2</sub>S. Son muy hidrosolubles, pero el H<sub>2</sub>S no lo es tanto y se volatiliza fácilmente (Madigan *et al.*, 1999).

La especie de sulfuro S<sup>2-</sup>, es la base conjugada del ácido débil H<sub>2</sub>S. Tiene una constante de disociación básica (K<sub>b</sub>) de 1 x 10<sup>-5</sup> siendo una base fuerte y su hidrólisis en medio acuoso forma soluciones muy alcalinas (Chang, 1998).

En forma de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , la disolución en un medio mineral acuoso que tiene acetato incrementa el valor del pH 6.6 – 7.1 a 9.5-10.2, por lo que este cambio podría afectar el proceso desnitrificante (Reyes-Ávila 2000). Aunque un valor de pH de 8.2 sería adecuado para trabajar con el sulfuro ya que a ese valor no existe la posibilidad de pérdidas por volatilización de  $\text{H}_2\text{S}$  y las especies de sulfuro predominante en solución serían  $\text{HS}^-$  y  $\text{S}^{2-}$  (Foroulis, 1993).

*Tiosulfato.* El tiosulfato tiene dos átomos de azufre no equivalentes. Esto es, un ion sulfato,  $\text{SO}_4^{2-}$  en el que uno de los átomos de oxígeno ha sido desplazado por un azufre. Puede ser formado por reacción no biológica del sulfito con azufre o politionatos (Schmidt, 1984).



El tiosulfato tiene un papel importante en el ciclo biológico del azufre, porque existen bacterias oxidantes de azufre y bacterias productoras de sulfuro que utilizan el tiosulfato como un substrato para el metabolismo desasimilatorio (Barret y Clark 1987).

*Azufre elemental.* El azufre es un sólido amarillo, que forma cristales ortorrómbicos. Es muy poco soluble en agua (5  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{S}_8$  a 25° C), pero muy soluble en bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes no polares análogos. El azufre ortorrómbico se funde a 112.8° C, formando un líquido color pajizo. Puede ser formado por bacterias oxidantes de sulfuro. En algunas especies el azufre elemental es el producto final de la oxidación, por lo tanto éste puede ser además metabolizado sintróficamente por bacterias. *Chlorobiaceae*, *Chloroflexaceae* y *Ectothiorhodospiraceae* pueden formar glóbulos de azufre elemental como intermediario durante la oxidación de compuestos azufrados a sulfato. La química de este azufre no es conocida todavía, en contraste a los glóbulos de azufre en el periplasma de *Chromatiaceae* que consisten de cadenas de azufre de polisulfano (Prange *et al.*, 1999). En algunos *Thiobacillus* (*Thiobacillus thioparus*, *Thermithiobacillus tepidarius*) el azufre elemental precipita durante el crecimiento en cultivo en lote cuando el oxígeno alimentado es limitado (Kelly y Harrison 1989).

*Sulfato.* Puede ser formado bajo condiciones aerobias a partir de la mayoría de los compuestos azufrados que son sensibles al proceso de oxidación, aun bajo condiciones anaerobias. Bajo condiciones anaerobias el sulfato es producido por una gran variedad de bacterias oxidantes de compuestos azufrados. Estas bacterias son fotótrofas o quimiótrofas (Lens y Hulshoff Pol, 2000).

### ***1.3.2.2 Ciclo biológico del azufre y tecnología ambiental***

Los procesos de tecnología ambiental basada en el ciclo biológico del azufre cuentan con la formación de intermediarios insolubles, que pueden ser separados de la fase líquida. Como es esperado, el mismo sólido intermediario que se acumula en la naturaleza en forma de  $\text{CaSO}_4$ , metal sulfuros y  $\text{S}^\circ$  son usados en tecnología ambiental. La utilización de sulfuro para formar precipitados insolubles de metal sulfuro podría resultar atractivo para el tratamiento de aguas residuales contaminadas por metales pesados. El sulfuro puede ser adicionado como un químico, o éste puede provenir de un reactor sulfato reductor. Un proceso biológico completo para la eliminación de azufre de las corrientes de aguas residuales cuenta con la formación de azufre elemental,  $\text{S}^\circ$ . En este proceso, el sulfuro puede ser producido a partir de compuestos oxidados azufrados en un reactor sulfato reductor y en un segundo reactor, el sulfuro ser oxidado parcialmente a  $\text{S}^\circ$ . El  $\text{S}^\circ$  puede ser usado para la producción de ácido sulfúrico o como fertilizante (Lens y Kuenen, 2001).

### ***1.3.2.3 Estabilidad del azufre elemental***

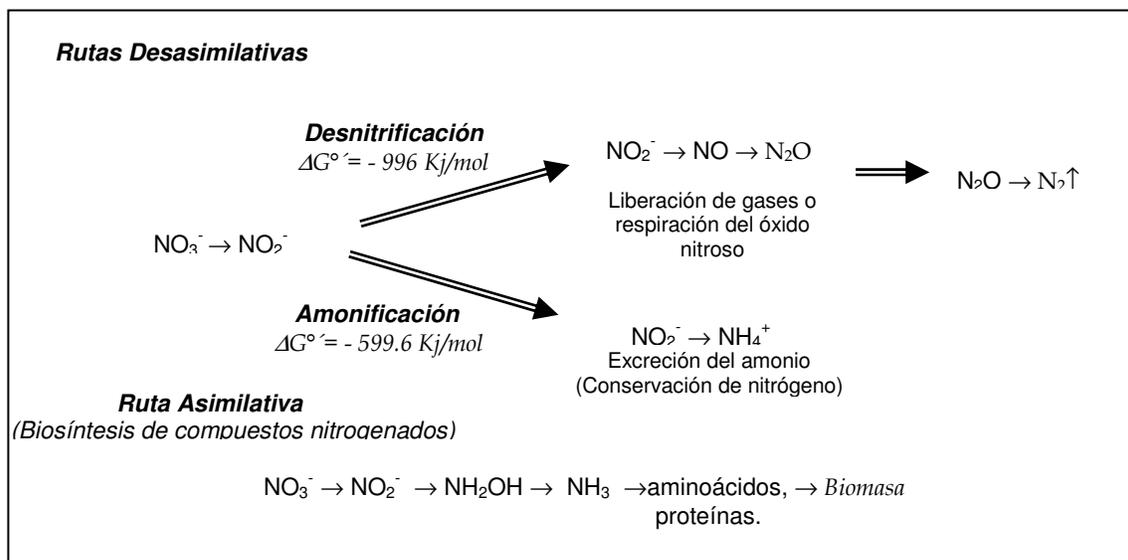
La estabilidad y decantabilidad del  $\text{S}^\circ$  es muy importante para los procesos biológicos de eliminación de azufre. Las condiciones fisiológicas óptimas para el crecimiento de bacterias oxidantes de sulfuro, alcalófilas y neutrófilas, son de: 30 a 47° C y pH 7 a 10, donde el azufre elemental producido será estable. A muy altas temperaturas (> 47° C) y pH (>10), el  $\text{S}^\circ$  es desproporcionado para formar sulfito y sulfuro (Lomans *et al.*, 2001).

Cuando el  $\text{S}^\circ$  es alimentado junto a la recirculación en el biorreactor, este será convertido de regreso a sulfuro por bacterias reductoras de  $\text{S}^\circ$ , que no son precisamente bacterias sulfatoreductoras; un ejemplo es *Wollinella* sp. (Hedderich *et al.*, 1998). También se ha observado que las bacterias metanogénicas son capaces de reducir el  $\text{S}^\circ$  a sulfuro (Stetter y Gaag 1983).

## **1.4 Desnitrificación**

Desnitrificación es el proceso de reducción biológica de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  atmosférico. La desnitrificación constituye una ruta en la que el nitrato puede ser utilizado por la célula como aceptor de electrones con el fin de obtener energía al ser reducido hasta  $\text{N}_2$  (Stouthamer *et al.*,

1988; Zumft, 1997). Las bacterias desnitrificantes tienen la habilidad de cambiar su metabolismo para usar el oxígeno como el aceptor final de electrones, o en su lugar usar el nitrato (respiración facultativa). El uso de nitrato como aceptor de electrones para formar nitrógeno gaseoso, es también conocido como reducción desasimilativa de nitrato. Esto es así para distinguirlo de la reducción de nitrato asimilativa, proceso en que se reduce hasta amoníaco y puede ser empleado como fuente de nitrógeno para la producción de aminoácidos y proteínas, Figura 4 (Juana *et al.*, 2000).



**Figura 4.** Rutas desasimilativas y asimilativas del nitrato.

La desnitrificación es una reacción generadora de iones hidroxilo que tiende a alcalinizar el medio. En la literatura se reporta un intervalo muy amplio en el cual se puede llevar a cabo la desnitrificación y, frecuentemente se considera como pH ideal el cercano a la neutralidad (Christtensen y Harremoes, 1977). Aunque realmente este valor varía dependiendo de la fuente de electrones, dado que cada uno tiene su propia constante de afinidad (Delwiche y Bryan, 1976). Recientemente, en trabajos en cultivo continuo con consorcios microbianos y utilizando diferentes fuentes de carbono como lactato, acetato y etanol, se mostró que en el intervalo de pH de 6 a 9, la desnitrificación se llevó a cabo sin acumulación de intermediarios y con rendimientos desnitrificantes ( $Y\text{-N}_2$ ) mayores que 0.95, mientras que a un pH de 5, la desnitrificación se inhibió completamente (Pérez, 1998).

Dado el carácter respiratorio del proceso, es necesaria la presencia de un sustrato oxidable que suministre energía, por lo que la desnitrificación puede ser un proceso organotrófico o litotrófico, siendo el primero termodinámicamente más favorecido que el segundo (heterótrofo,  $\Delta G^\circ = -996$  KJ/mol; litoautótrofo,  $\Delta G^\circ = -930$  KJ/mol).

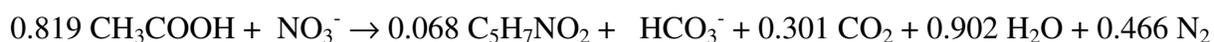
#### 1.4.1 Desnitrificación Heterotrófica

Han sido estudiadas una amplia gama de bacterias desnitrificantes por su capacidad de consumir ácidos grasos volátiles, metanol, glucosa, lactato, glicerol, propionato, aspartato, etc (Akunna *et al.*, 1994; Fass *et al.*, 1994; Bernet *et al.*, 1995; Hendriksen *et al.* 1996).

En el proceso de desnitrificación organotrófica, un factor importante que orienta el proceso es la relación carbono/nitrógeno (C/N), misma que va depender del tipo de sustrato y fuente de carbono orgánico disponible. El acetato parece ser el más adecuado ya que se puede trabajar bajo diferentes relaciones C/N, con grandes velocidades y altas eficiencias de eliminación de nitrato sin presentar acumulación de intermediarios o la desviación a otras rutas metabólicas (Cuervo-López *et al.*, 1999). Cuando se suministra como ácido acético la reacción estequiométrica es:



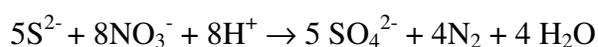
Considerando la formación de biomasa (Matejů *et al.*, 1992):



Mediante el proceso desnitrificante, además de que se obtiene alta eficiencia de eliminación de nitrato, también es posible eliminar materia orgánica al ser oxidada en forma de  $\text{CO}_2$ . Algunos inconvenientes que podrían presentarse son: la reducción desasimilativa de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_3$ , lo cual suele ocurrir cuando se trabaja con relaciones de C/N demasiadas altas, o en otras circunstancias puede presentarse acumulación de intermediarios como  $\text{NO}$  o  $\text{N}_2\text{O}$ , sobre todo cuando existen desbalances en el medio, como la falta de  $\text{Cu}^{++}$  (Cervantes *et al.*, 1999)

### 1.4.2 Desnitrificación Litotrófica

Algunas bacterias de los géneros *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera* y otras, pueden desnitrificar autotróficamente usando hidrógeno o varios compuestos reducidos de azufre como  $S^{\circ}$ ,  $S^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $S_4O_2^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ , como fuentes de energía. Bajo condiciones de crecimiento autotrófico, el dióxido de carbono o bicarbonato son usados como fuente de carbono para la síntesis de biomasa celular. Barrenstein *et al.* (1986) propusieron la siguiente reacción estequiométrica, en donde el sulfuro en condiciones anaerobias es oxidado hasta formar sulfato como producto final en presencia de  $NO_3^-$ , que es reducido a  $N_2$ :



Se ha visto que la relación S/N influye en el desarrollo de la desnitrificación litotrófica. Cuando S/N es baja (menor a la estequiométrica), el consumo de sulfuro puede ser eficiente, pero se presenta acumulación de nitrito ya que la reducción de  $NO_2^-$  a  $N_2$  se encontraría limitada. No existe acumulación de  $NO_2^-$  cuando S/N es alta (Matejů, *et al.* 1992). Por otra parte, el coeficiente estequiométrico de consumo de azufre por mol  $NO_3^-$  reducido, dependerá también del compuesto de azufre presente, es decir, si la fuente de energía es  $HS^-$ ,  $S_2O_3^{2-}$  o  $S^{\circ}$ . El ión ferroso, también puede ser usado para reducir al nitrato por ciertas especies como *Ferrobacillus* y *Leptothrix* en condiciones de litotrofia (Achnich *et al.*, 1995).

Esta forma de desnitrificación es de interés en casos donde no es posible la aplicación de la desnitrificación organotrófica debido a la baja disponibilidad de carbono orgánico. La desnitrificación litotrófica estaría limitada a situaciones donde se tienen bajas concentraciones de materia orgánica, tales como cuerpos de agua subterránea, agua superficial y en el tratamiento terciario de efluentes. Pero no es adecuada para el tratamiento de aguas residuales, tanto de origen urbano y de algunos sectores industriales, que contienen concentraciones variables de materia orgánica.

## 1.5 Microbiología de la Desnitrificación y sulfo-oxidación

### 1.5.1 Microbiología de la Desnitrificación

La capacidad de realizar la desnitrificación está distribuida entre una gran variedad de grupos taxonómicos con características fisiológicas diversas, donde la mayor parte de las bacterias son heterótrofas facultativas y existen algunas bacterias que sólo llevan acabo algunas etapas de la ruta respiratoria, dando como resultado la formación de algunos de los intermediarios de la desnitrificación:  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  o bien  $\text{N}_2\text{O}$ . En la Tabla 4, se muestran algunos géneros bacterianos con capacidad desnitrificante.

**Tabla 4.** Géneros bacterianos con capacidad desnitrificante.

Género	Características fisiológicas	Género	Característica fisiológica
<i>Pseudomonas</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Paracoccus</i>	Heterótrofas aerobias	<i>Rhodopseudomonas</i>	Fotótrofas
<i>Azospirillum</i> <i>Bacillus</i> <i>Wolinella</i>	Fermentativas	<i>Paracoccus</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Pseudomonas</i>	Litoautótrofas, utilizadoras de $\text{N}_2$
<i>Rhizobium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Agrobacterium</i>	Heterótrofas fijadoras de $\text{N}_2$	<i>Thiobacillus</i> <i>Thiospaera</i> <i>Thiomicrospira</i>	Litoautótrofas, utilizadoras de $\text{S}_2$
<i>Neisseria</i> <i>Kingella</i> <i>Wolinella</i>	Heterótrofas patógenas	<i>Nitrosomonas</i>	Litoautótrofas, utilizadoras de $\text{NH}_4^+$

### 1.5.2 Microbiología de la sulfo-oxidación

Estudios relacionados al crecimiento en medios sintéticos han permitido identificar diversas fuentes de carbono que son utilizados por estos microorganismos (Tabla 5), lo que permitió establecer dos clases de microorganismos de acuerdo a su capacidad de crecimiento en fuentes orgánicas de carbono (Alcántara, 2000):

1. *Quimiolitoautótrofos obligados*. Son bacterias especializadas, que requieren una fuente inorgánica como fuente de energía y obtienen su fuente de carbono a partir de fijar  $\text{CO}_2$  por el ciclo de Benson-Calvin. Utilizan para ello el flujo inverso de electrones para la generación de poder reductor (NADPH).

2. *Quimiolitotrofos facultativos*. Estos microorganismos crecen adecuadamente con una fuente inorgánica de energía y CO<sub>2</sub>, o bien heterotróficamente con compuestos orgánicos que proveen de carbono mientras los compuestos inorgánicos proveen de electrones para la generación de energía.

**Tabla 5.** Características de Géneros procariones oxidantes del azufre.

Género	Especie	Donador inorgánico de electrones	Intervalo de Temp. para Crecimiento (°)	Intervalo de pH para crecimiento
<i>T. thioparus</i>	Quimiolitótrofos	H <sub>2</sub> S, S <sup>-2</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	25-30	6.0-8.0
<i>T. desnitrificans</i> <sup>a</sup>	obligados	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	25-30	6.0-8.0
<i>T. neapolitanus</i>	Crecen pobre en medios orgánicos.	S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	25-30	6.0-8.0
<i>T. thiooxidans</i>	Secreta el S <sup>0</sup>	S <sup>0</sup> , metal sulfuro, Fe <sup>2+</sup>	25-30	2.0-4.0
<i>T. ferrooxidans</i>	Heterótrofos,	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	30-35	2.0-4.0
<i>T. novellus</i>	Quimiolitótrofos facultativos	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	25-35	6.0-8.0
<i>T. intermedius</i> <sup>b</sup>	Crecimiento pobre en medios orgánicos	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-	1.9-2.2
<i>Beggiatoa</i>	Quimiolitótrofos	H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	15-30	6.0-8.0
<i>Thiothrix</i> <sup>c</sup>	filamentosos del azufre.	H <sub>2</sub> S,	4.0-33	6.0-8.0
<i>Thiospira</i> <sup>c</sup>	Acumulan el S <sup>0</sup> producido dentro de la célula	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	5.0-20	-
<i>Thiomicrospira</i> <sup>c</sup>	Quimiolitotrofos facultativos	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub> S	-	6.0-8.0
<i>Thiosphera</i> <sup>c</sup>		H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	12-45	6.0-8.0
<i>Thermothix</i>		H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	40-80	6.5-7.5
<i>Thiovulum</i>	Termoacidófilas,	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	50-87	6.8
<i>Sulfolobus</i>	quimiolitotrofica y	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup>	45-90	1.0-5.0
<i>Acidianus</i>	autotróficas.	S <sup>0</sup>		1.0-5.0

<sup>a</sup> Anaerobia; <sup>b</sup> acidófila; <sup>c</sup> microaerofilia.

## 1.6 Proceso respiratorio de la desnitrificación y sulfo-oxidación

### 1.6.1 Proceso Respiratorio de la Desnitrificación

Este proceso respiratorio, en que el nitrato o nitrito sirven como aceptor final de electrones en lugar del oxígeno, resulta en la generación de ATP. Cuando los electrones son transferidos del donador (fuente orgánica) al aceptor de electrones (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), el organismo gana energía que puede ser utilizada para la síntesis de nueva masa celular y el mantenimiento de la ya existente (Matejů *et al.*, 1992).

Donador e<sup>-</sup> → NAD → FAD → Quinona → Citocromo → Nitrato reductasa → NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Las fases del donador de electrones al citocromo son siempre idénticas, en tanto que el último paso depende del aceptor final ya sea nitrato o nitrito (Halling y Jorgesen, 1993).

### 1.6.2 Proceso respiratorio de la sulfo-oxidación

El sistema de transporte de electrones de una bacteria típica oxidante de azufre se muestra en la Figura 5, donde se puede observar que los electrones de los compuestos reducidos se incorporan a la vía por varios puntos según sus potenciales de reducción, empleando el oxígeno como el aceptor final de electrones. El proceso global genera una fuerza motriz de protones que origina la síntesis de ATP por ATPasas de la membrana.

También se puede observar que al utilizar un compuesto azufrado intermediario, como el tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) o  $S^0$ , se requiere de menos energía para reducir el  $O_2$ .

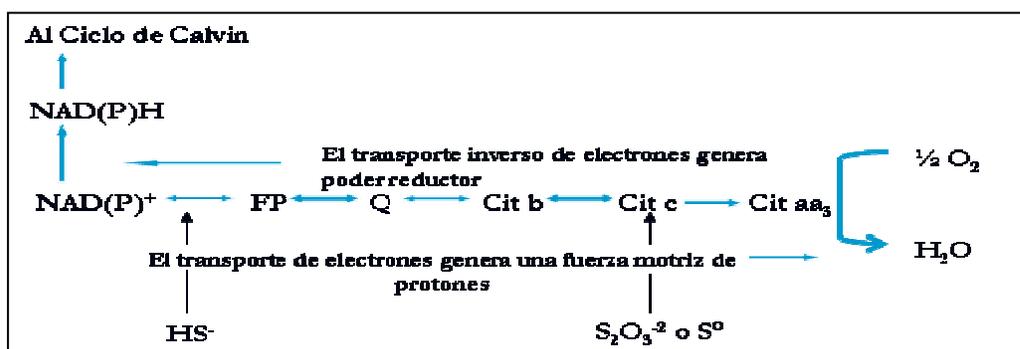
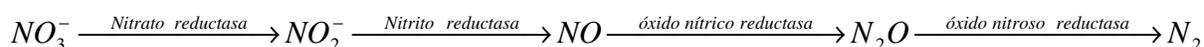


Figura 5. Flujo de electrones en *Thiobacillus* durante el crecimiento con  $S^0$ ,  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$ .

## 1.7 Fisiología y bioquímica de la desnitrificación y sulfo-oxidación

### 1.7.1 Bioquímica de la Desnitrificación

Durante la desnitrificación, utilizando como aceptor final de electrones al nitrato, transcurren cuatro etapas: La reducción desasimilativa de  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$ , la reducción de  $NO_2^-$  a NO (óxido nítrico), la reducción de NO a  $N_2O$  (óxido nitroso) y por último la reducción de  $N_2O$  a  $N_2$ , en la cual intervienen una serie de enzimas, las cuales son sintetizadas cuando las condiciones ambientales son anaerobias:



El primer paso de la desnitrificación es la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , catalizado por la nitrato reductasa. Se han identificado dos tipos de nitrato reductasa, una membranal de tres subunidades de 120, 60 y 20 kDa, que emplea ubihidroquinona en el transporte de electrones y cuyo centro activo se orienta hacia el citoplasma. La otra es una enzima soluble que se localiza en el periplasma, está formada por dos subunidades de 94 y 19 kDa, que aún no está bien caracterizada. En general, se asume que la reducción de nitrato a nitrito ocurre a través de molibdeno como centro (Kroneck *et al.*, 1992).

El segundo paso es la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO por medio de la nitrito reductasa. Se han identificado dos tipos, una contiene cobre, mientras que la otra contiene el grupo hemo  $\text{cd}_1$  (Jetten *et al.*, 1997). La que contiene cobre es un homotrímero con dos átomos de cobre por monómero (Godden *et al.*, 1991), mientras que la que contiene el hemo  $\text{cd}_1$ , es un homodímero con un grupo hemo c y un hemo  $\text{d}_1$  por cada monómero (Fulop *et al.*, 1995).

La reducción de NO a  $\text{N}_2\text{O}$ , está catalizada por la óxido nítrico reductasa, localizada en la membrana citoplasmática (Goretski *et al.*, 1990). Ha sido aislada de *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*. Está formada por una subunidad de 16 kDa, que contiene un grupo hemo c; y otra de 53 kDa que incluye un hemo b (Carr y Ferguson, 1990). De las enzimas de la desnitrificación esta es la menos caracterizada (Kroneck *et al.*, 1992).

La última etapa de la desnitrificación es la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , llevada a cabo por el óxido nitroso reductasa, localizada en el periplasma. Contiene ocho átomos de cobre distribuidos en dos monómeros de aproximadamente 70 kDa cada uno (Andrew *et al.*, 1994). Esta enzima es severamente inhibida por la presencia de oxígeno (Ferguson, 1994). Debido a esto, es importante evitar la entrada de oxígeno en el proceso desnitrificante para no liberar  $\text{N}_2\text{O}$ , gas que contribuye al efecto invernadero del planeta (Hong *et al.*, 1994).

### **1.7.2 Bioquímica de la sulfo-oxidación**

El grado de complejidad y el número de reacciones involucradas en las transformaciones químicas y biológicas de los compuestos de azufre, hace complicado el estudio de las reacciones bioquímicas para la oxidación biológica de estos compuestos reducidos. Kelly *et al.* (1997), sostienen que posiblemente existen dos procesos básicos para la oxidación de estos compuestos (azufre, sulfuro y tiosulfato):

- I. Un mecanismo que involucra la formación de politionatos, presentes en todos los *Thiobacillus* que son quimiolitotróficos obligados y otros *Thiobacillus* “verdaderos” como *Thiobacillus acidophilus*.
- II. Un mecanismo que no involucra la formación de politionatos observado en *Paracoccus sp.*, *Thiobacillus versutus*, posiblemente en *Thiobacillus novellus* y *Thiobacillus tepidarius*.

Las diferentes vías reportadas para la oxidación del sulfuro se pueden dividir en dos tipos de reacción:

- a.  $S^{2-} \rightarrow S^{\circ}$
- b.  $S^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$

La reacción de tipo a., donde el producto final es azufre elemental, se presenta en algunas especies de *Thiobacillus* y en bacterias fotosintéticas. La posibilidad de que la oxidación de  $H_2S$  en *Thiobacillus* se presente extracitoplasmáticamente ha sido sugerida por Hooper y Dispirito (1985), dado que observaron la precipitación de azufre elemental en el medio de crecimiento.

En la reacción de tipo b, donde el producto final es el sulfato, el sulfuro es oxidado en forma directa a sulfito que a su vez se oxida a sulfato.

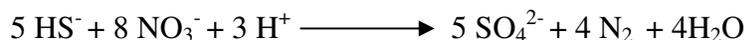


La enzima involucrada, sulfito reductasa, fue purificada de *Thiobacillus denitrificans* por Schedel y Truper (1979). Es una enzima insoluble y su sitio de localización en la célula es incierto. Sin embargo, debido a que la reacción libera 6 protones del agua, se ha propuesto que la enzima se encuentra en el periplasma (Hooper y Dispirito, 1985).

### 1.8 Oxidación de compuestos azufrados por microorganismos desnitrificantes

*Thiobacillus denitrificans* es un microorganismo que se caracteriza por su actividad desnitrificante usando compuestos reducidos de azufre, y tiene la capacidad de crecer en un ambiente heterotrófico si un compuesto orgánico está presente. En la siguiente reacción

podemos observar la oxidación de sulfuro hasta sulfato como producto final en condiciones anaerobias, mientras que el  $\text{NO}_3^-$  es reducido a  $\text{N}_2$  (Hallings *et al.*, 1993).



Günter y Hans (1985), llevaron a cabo un estudio de cinética en cultivo continuo y en lote, de una cepa de *T. denitrificans* obtenida de una muestra de suelo con un medio enriquecido utilizando tiosulfato como fuente de energía  $\text{NO}_3^-$ , como aceptor final de electrones y bicarbonato como fuente de carbono, en una relación C/N de 0.51 y S/N de 3.73. En los resultados de los cultivos en lote, observaron que a concentraciones mayores de 5 g/L de  $\text{SO}_4^{2-}$  se presenta inhibición y a 20 g/L no hay actividad desnitrificante, posiblemente por efecto de la fuerza iónica que ejerce el sulfato.

Los resultados obtenidos de cinéticas en cultivo continuo, utilizando el mismo medio de cultivo, pero ahora con una relación S/N de 2.88, reportaron que en el estado estacionario no encontraron acumulación de  $\text{NO}_2^-$ , el  $\text{N}_2$  molecular se encontró casi en forma pura y las concentraciones de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}$  fueron menores a 1 ppm. El rendimiento de biomasa con respecto a nitrato y tiosulfato consumido fue de 0.129 y 0.085 respectivamente,  $\mu_{\text{max}}$  de  $0.11 \text{h}^{-1}$  y  $K_s$  de  $0.2 \text{mg NO}_3^-/\text{L}$ , pero no calcularon el rendimiento de formación de  $\text{N}_2$ , aunque se puede asumir que fue cercano a uno, debido a que no hubo formación de intermediarios, además de que la formación de biomasa fue muy pequeña por lo que el proceso fue probablemente, puramente desasimilativo.

Sublette y Sylvester (1987), llevaron a cabo un estudio con una cepa de *T. denitrificans* en un reactor continuo de tanque agitado, en condiciones anaerobias, alimentado con  $\text{H}_2\text{S}$  como fuente de energía. Trabajaron dos tasas de dilución ( $0.029$  y  $0.058 \text{h}^{-1}$ ) y tres velocidades de carga de  $\text{H}_2\text{S}$  (1.45, 2.61, 3.35 mM/h), Tabla 6.

**Tabla 6.** Cambio de la fuerza iónica a diferentes velocidades de alimentación de sulfuro utilizando *T. denitrificans*.

D ( $\text{h}^{-1}$ )	$\text{H}_2\text{S}$ alimen. (mmol/h)	$\text{SO}_4^{2-}$ prod. (mM)	$\text{NO}_3^-$ alimen. (mM)	$\text{NH}_4^+$ alimen. (mM)	Biomasa (mg/L)	Fuerza iónica
0.029	1.45	40	22.3	5.7	340	220
0.029	2.61	67.4	17.6	3.8	530	310
0.029	3.35	75.4	50.1	9.3	760	390
0.058	1.42	17.2	57.7	7.7	210	180
0.058	2.57	33.4	41.5	6.5	400	220
0.058	3.22	39.4	58.2	5.0	500	260

Los autores concluyeron que la fuerza iónica total que observaron en su experimento no afectó significativamente el crecimiento ni la velocidad de oxidación del  $H_2S$ .

Pero si analizamos sus resultados, ellos obtuvieron óxido nitroso como producto de la reducción incompleta de nitrato a nitrógeno molecular en concentraciones que van de 35 a 80 ppm en régimen estacionario, por lo que tal vez la fuerza iónica no afectó el consumo de sulfuro pero sí la reducción de nitrato a  $N_2$ .

Ongcharit *et al.* (1989) desarrollaron un procedimiento de inmovilización de *Thiobacillus denitrificans* en un cultivo mixto con bacterias heterotróficas. El cultivo mixto fue crecido bajo condiciones aerobias, utilizando tiosulfato como única fuente de energía y sin ninguna fuente de carbono orgánico en un cultivo en lote. Supusieron que los microorganismos heterótrofos utilizaron los productos de desecho de *Thiobacillus denitrificans*, o bien los productos de la lisis celular como fuente de carbono y energía, lo que puede ser razonable, debido a la falta de materia orgánica que requieren los microorganismos heterótrofos. Los agregados fueron posteriormente utilizados para la eliminación de sulfuro de hidrógeno de una corriente de aire en un reactor continuo de tanque agitado con reciclado de la biomasa. Debido a que el  $H_2S$  es un inhibidor del crecimiento de *Thiobacillus denitrificans*, el reactor fue operado bajo condiciones limitadas de sulfuro. Observaron una velocidad máxima de 3.2 mmol  $H_2S/L \cdot h$  con una eficiencia de eliminación de  $H_2S$  del 90.7%.

Sublette *et al.* (1998) mencionan que *T. denitrificans* resulta inhibida a una concentración de sulfato de 250 mM y relacionan este efecto con la fuerza iónica afectándose tanto el cultivo en lote como en continuo. También reportan que el sulfuro puede ser tóxico ya que a concentraciones de 1 mM en un cultivo en lote, no observaron crecimiento, sin embargo comentan que es posible lograr el crecimiento de algunas cepas cuando se exponen a concentraciones crecientes de sulfuro, bajo estas condiciones lograron crecimiento en una concentración de 2.5 mM.

### **1.9 Oxidación de compuestos azufrados por bacterias “incoloras” del azufre**

La eliminación del sulfuro de hidrógeno puede ser llevado a cabo mediante un proceso de oxidación aerobia por los microorganismos sulfooxidantes conocidos como bacterias “incoloras” del azufre, los cuales utilizan la oxidación de compuestos reducidos de azufre para obtener energía. A este grupo pertenecen microorganismos de una gran variedad

fisiológica y morfológica. Los géneros que pertenecen a este grupo de microorganismos son: *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Thiovulum*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiospira* y *Thioploca*.

El pH y el intervalo de temperatura que permite el crecimiento de bacterias incoloras del azufre son de 1 a 10 y de 4 a 95° C, respectivamente. La mayoría de las bacterias incoloras del azufre utilizan el oxígeno molecular como el aceptor final de electrones, pero varias especies son también capaces de desnitrificar. Estas bacterias son usualmente subdivididas basándose en el tipo de fuente de energía y carbono, que utilizan e incluye quimiolitó(auto)trofos obligados, quimiolitó(auto)trofos facultativos y quimiolitoheterótrofos. El tipo fisiológico de bacterias incoloras de azufre que dominan en los sistemas biológicos de eliminación de sulfuro, depende principalmente de las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura) y la composición del agua residual (relación de compuestos orgánicos: Inorgánicos), (Robertson y Kuenen, 1992).

Muchas aguas residuales industriales y corrientes gaseosas que contienen H<sub>2</sub>S contienen bajas cantidades de materia orgánica, pero altas concentraciones de compuestos inorgánicos reducidos de azufre. Tales sistemas son, por lo tanto, selectivos para microorganismos quimiolitautótrofos.

Un factor importante a tomar en cuenta es, si estas bacterias almacenan o excretan el azufre elemental producido a partir de la oxidación parcial de los compuestos reducidos de azufre. Especies del género *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira* acumulan el azufre elemental dentro de la célula, por lo que dificultarían cualquier proceso, ya que por una parte deberá producirse una gran cantidad de biomasa para eliminarlo y el azufre no puede fácilmente separarse de la biomasa. Por esta razón los microorganismos deben ser seleccionados con las características de que el azufre elemental formado sea excretado al medio, un ejemplo es el género *Thiobacillus* (Lens y Kuenen, 2001).

Janssen *et al.* (1995), encontraron que bajo condiciones limitadas de O<sub>2</sub>, (< 0.1 mg/L) el S<sup>0</sup> es el producto final de la oxidación parcial del H<sub>2</sub>S, mientras que la formación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> se ve favorecida por concentraciones limitadas de la especie reducida de azufre.

Annachatre y Suktrakoolvait (2001) reportaron un proceso a nivel de laboratorio en un reactor de lecho fluidizado para la oxidación biológica de S<sup>-2</sup> a S<sup>0</sup>, con la formación de sedimentos de este último. En un reactor con oxígeno disuelto (OD) mayor que 0.1 mg/L, el

$\text{SO}_4^{2-}$  fue el principal producto de la oxidación de  $\text{S}^{2-}$ . Al incrementar la velocidad de carga de sulfuro, la velocidad de producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  disminuyó y la velocidad de producción de  $\text{S}^0$  mostró un marcado incremento. La baja formación de sulfato posiblemente podría deberse a que el  $\text{S}^{2-}$  inhibió a los microorganismos productores de  $\text{SO}_4^{2-}$  o bien que la conversión de  $\text{S}^{2-}$  a  $\text{S}^0$  fue más favorable que la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Conversiones de sulfuro mayores a 90% fueron obtenidas a velocidades de carga de sulfuro de 0.13-1.6 Kg. S/m<sup>3</sup>d, con OD menor que 0.1 mg/L, siendo el  $\text{S}^0$  el principal producto de la oxidación de sulfuro.

Para obtener azufre elemental como producto, la sulfo-oxidación debe ser forzada en la dirección de la producción de azufre, por ejemplo por altas cargas de sulfuro o bajas concentraciones de oxígeno (Stefess *et al.*, 1996). La formación de azufre puede ser regulada dosificando las cantidades estequiométricas de oxígeno (Janssen *et al.*, 1997), pero recientemente un mecanismo de control más estricto es la aplicación de potencial redox (Janssen *et al.*, 1998).

### **1.10 Eliminación simultánea de C, N y S bajo condiciones desnitrificantes**

La búsqueda de procesos que nos permitan la eliminación de varios contaminantes a la vez, así como de llevarlos a productos que no van a tener un impacto adverso al ecosistema, es de gran relevancia en el ámbito industrial. La desnitrificación es un proceso que ha permitido la eliminación simultánea de carbono, nitrógeno y azufre, así como la posibilidad de eliminarlos en forma de  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{S}^0$  o  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Gommers *et al.* (1988a), en un reactor de lecho fluidificado de flujo ascendente, bajo condiciones desnitrificantes con una velocidad de carga de sulfuro de 2-3Kg S/m<sup>3</sup>-d, acetato de 4-6 Kg C/m<sup>3</sup>-d y nitrato de 5 Kg N/m<sup>3</sup>-d, observaron que los tres contaminantes se eliminaron casi al 100%, teniendo como productos finales,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{N}_2$ . Es importante tomar en cuenta que el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) sigue siendo un contaminante más perjudicial que el nitrato.

Kim y Son (2000), Realizaron estudios en lote para observar el efecto de la relación DQO/N/S en un cultivo de bacterias sulfato reductoras y bacterias desnitrificantes de azufre, utilizando acetato y tiosulfato como fuente de energía y nitrato como aceptor final de electrones. A una relación DQO/N/S (0.8/1/3.3), el nitrato y el tiosulfato se consumieron dentro las 6 primeras

horas, la materia orgánica disminuyó rápidamente dentro de las 6 horas, después su consumo fue lento, consumiéndose totalmente a las 42h. Al aumentar la relación DQO/N/S (3.3/1/3.3), observaron una inhibición en el consumo de la materia orgánica, pero el consumo de nitrato y tiosulfato fue rápido dentro de las 6 primeras horas, obteniendo como producto azufrado final el sulfato. Posiblemente esto fue debido, a que al incrementar la materia orgánica, ya no hubo suficiente poder oxidante ( $\text{NO}_3^-$ ), para mineralizar el acetato.

Reyes-Ávila (2000), en un reactor de tanque agitado bajo condiciones desnitrificantes operado en continuo, observó que en presencia de acetato (C/N 1.4) y una relación S/N estequiométrica (1.43) el sulfuro se oxidó parcialmente a azufre elemental ( $\text{S}^0$ ), el cual se acumuló dentro del reactor, teniendo como producto finales de la desnitrificación el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{S}^0$ . Obteniendo una eficiencia de eliminación de sulfuro y nitrato de casi el 100%, y un consumo de acetato del 65%. La acumulación de azufre elemental en este tipo de reactor, con el tiempo, genera problemas operacionales, así como también posibles cambios en las rutas metabólicas oxidantes.

Lo anterior aporta evidencias de que el proceso de desnitrificación puede ser una alternativa tecnológica para llevar a cabo la eliminación simultánea de sulfuro, materia orgánica y nitrato. Como la oxidación de sulfuro es sólo parcial hasta azufre elemental, la desnitrificación resulta atractiva como vía para la eliminación de sulfuro en forma de azufre insoluble, ya que de este modo se podría facilitar su separación del efluente.

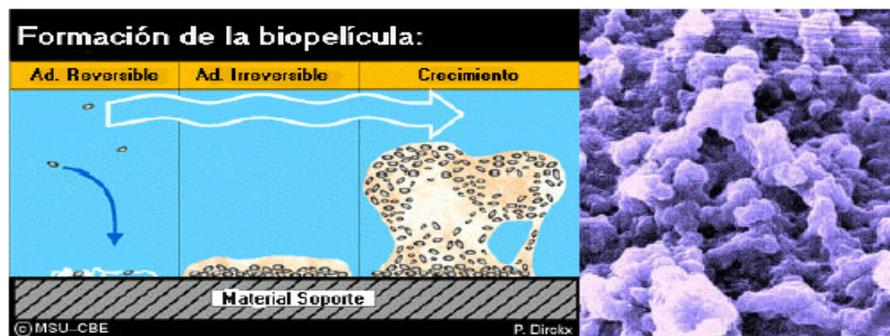
## **1.11 Biopelícula**

### ***1.11.1 Concepto de biopelícula***

Podemos hablar de biopelícula, como una estructura compleja de células y productos celulares, como polímeros extracelulares (Characklis *et al.*, 1990), que pueden adherirse a una superficie de origen natural o sintético. Su estructura es morfológica y fisiológicamente distinta a la de bacterias libres.

### 1.11.2 Formación de la biopelícula

Mediante microscopía óptica y electrónica se ha podido estudiar la formación de biopelículas, observándose la complejidad tanto microbiológica como física de estas colectividades. Los procesos que conllevan a su formación son similares para ambientes acuáticos naturales como para los desarrollados en aguas residuales. El concepto básico de su formación se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Etapas de formación de biopelícula.

Se ha encontrado que varias etapas son necesarias para alcanzar la formación de la biopelícula (Van Losdrecht *et al.* 1995; Fleming 1995):

*Inducción.* Un medio enriquecido en contacto con una superficie, promoverá la adsorción de los nutrientes al soporte, en el cual subsecuentemente se realizará la inmovilización.

*Transporte de células microbianas a la superficie.* Las células suspendidas en el fluido son transportadas a la superficie sólida por movimiento browniano y transporte turbulento. El flujo de estas células depende, entre otros factores, de la velocidad de flujo, concentración de las células y de ciertas propiedades físicas (tamaño, forma y densidad de los microorganismos).

*Adhesión de los microorganismos a la superficie.* La adhesión puede ser de dos tipos: reversible e irreversible. En la primera los microorganismos aún se unen al soporte por atracción de cargas o por fuerzas hidrofóbicas, por lo que pueden ser fácilmente desprendidos del soporte. Mientras que en la forma irreversible ya se ha realizado la producción de sustancias exopoliméricas, lo que adhiere a los microorganismos al soporte y que hace que difícilmente sean removidos de la superficie del soporte. En algunos casos las bacterias poseen proteínas con características hidrofóbicas, incluyendo muchas adhesinas, que pueden también interactuar con otras superficies hidrofóbicas encontradas en la naturaleza. Si se

aproxima una bacteria a una superficie cargada negativamente y no es favorable para ésta, la bacteria puede llegar a vencer la barrera energética (repulsión) para establecer contacto con dicha superficie (Matthew y Scott, 2000).

*Crecimiento o acumulación de microorganismos.* El crecimiento de la biopelícula es el resultado de la transferencia de masa y consecuente transformación de los nutrientes. Por otra parte, el crecimiento y grosor de la biopelícula depende principalmente de factores como el pH, concentración de nutrientes, condiciones de hidrodinámica, tipo de sustrato, tipo de reactor, tipo de microorganismos, etc.

*Desprendimiento de microorganismos.* El desprendimiento puede deberse a varias causas, una es debido a que los nutrientes no son difundidos en la biopelícula ocasionando que los microorganismos de las capas basales mueran, perdiéndose con ello la integridad de la estructura de la biopelícula, dando con esto un desprendimiento masivo. La segunda causa se refiere a que en cualquier etapa del desarrollo de la biopelícula se dan pérdidas de ésta por el esfuerzo cortante. Se puede alcanzar un estado estacionario, en el que la cantidad de microorganismos muertos o desprendidos es equivalente a la cantidad de bacterias producidas. Es importante tomar en cuenta que posiblemente hay otros factores que pueden desprender los microorganismos, como el pH y la concentración de sustrato, fagocitación, compuestos (detergentes) que pueden promover el desprendimiento de la biopelícula.

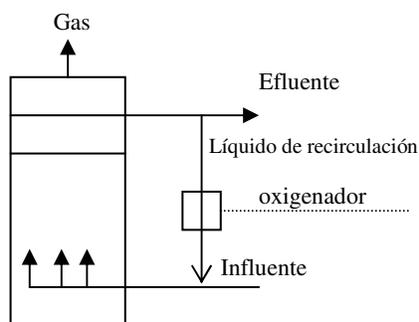
*Regeneración.* Una vez que la biopelícula alcanza su estado estacionario y al desprenderse las capas externas, permanece una capa delgada que rápidamente tiende a engrosar, repitiéndose así el ciclo (Meraz *et al.*, 1995).

## **1.12 Soportes**

Los reactores llamados de segunda y tercera generación se caracterizan por el uso de material soporte para la inmovilización de los microorganismos. Presentan grandes superficies para la colonización y estos materiales pueden ser fijos, suspendidos o fluidificables. Si son fijos se emplean placas o empaques con partículas esféricas o irregulares. Cuando son suspendidos se utilizan materiales de baja densidad (poliéster, nylon y polietileno) y de alta densidad (carbón activado, arena, etc.), los cuales se pueden fluidificar con el fin de tener una distribución uniforme de la biomasa en la zona de expansión del reactor.

### 1.13 Reactor de Lecho fluidificado con biopelícula (RLFB)

En este tipo de reactores, el líquido a tratar es bombeado a través de un lecho (típicamente arena con un tamaño de partícula de 0.2-0.8 mm) con una velocidad ascensional suficiente para causar la fluidificación ( $5-10 \text{ mh}^{-1}$ ). Fluidificación, es el funcionamiento donde las partículas sólidas se comportan como el líquido a través de la suspensión en un gas o líquido (Kunii y Levenspiel 1991). En procesos aerobios el reactor puede ser aireado a través de la recirculación (Figura 7) (Cooper, 1981). En el estado fluidificado el soporte proporciona una gran área superficial para el crecimiento biológico inmovilizado y permite mayor concentración de biomasa en un intervalo de  $10-40 \text{ Kg/m}^3$  (Cooper y Sutton, 1983).



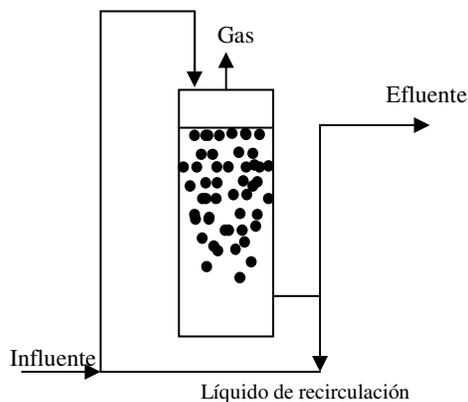
**Figura 7.** Configuración del reactor de lecho fluidificado con biopelícula.

Todo esto permite un crecimiento concentrado y activo de bacterias siendo, por lo tanto, un sistema capaz de soportar mayores cargas orgánicas. El RLFB es una tecnología típicamente usada para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con compuestos orgánicos o inorgánicos, que requieren tiempos largos de retención de sólidos (mayores a 15 días) para la oxidación y reducción biológica (Sutton y Mishra, 1990). El primer RLFB industrial fue construido en 1986 para el tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera.

### 1.14 Reactor de Lecho fluidificado inverso (RLFI)

En este tipo de reactores se utilizan partículas de menor densidad que el agua (nylon, poliéster y polietileno) como soporte. Las partículas son fluidificadas por un flujo descendente del líquido (Figura 8). El flujo del gas (generado por el proceso o inyectado) y el líquido que están en direcciones opuestas, ayudan a la expansión del lecho (García-Calderon *et al.* 1998). Los

tiempos de retención hidráulica en este tipo de sistemas pueden ser muy cortos llegando a estar entre 1-12 horas debido, principalmente, a que la biomasa microbiana alcanza concentraciones muy altas. Una de las posibles desventajas de estos reactores se encuentra en el periodo de arranque debido al difícil desarrollo de la biopelícula sobre el soporte. Meier-Schneiders *et al.*, 1993 y Meraz *et al.*, 1995, mencionan que puede variar de 60 a 100 días. Además de este problema se han sumado otros, como el tipo de soporte empleado, procedimientos de inoculación, carga orgánica durante el arranque, etc.



**Figura 8.** Configuración del reactor de lecho fluidificado inverso.

El RLFI ha sido muy eficiente para el tratamiento de procesos aerobios y anaerobios; como la hidrólisis de la proteína de leche por *Lactobacillus helveticus* y la oxidación de hierro por *Thiobacillus ferrooxidans* (Nikolov y Karamanev, 1987).

Un reactor de este tipo es el que se empleará en este estudio, debido a que por su funcionamiento podría facilitar la separación del azufre elemental (ya que este tiene una densidad de  $1.96 \text{ Kg/m}^3$ , que es mayor a la del agua) en continuo, así como la eliminación de materia orgánica y nitrógeno. Cabe decir que, hasta el momento, este tipo de reactor no ha sido empleado para llevar a cabo procesos desnitrificantes, acoplados a la oxidación de materia orgánica y sulfuro.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general.**

Estudiar y evaluar un sistema continuo para eliminar de manera simultánea y en un solo paso de materia orgánica soluble, sulfuro y nitrato bajo condiciones de desnitrificación.

### **2.2 Objetivo particular**

2.2.1 Diseñar, construir, operar y evaluar un RLFI en condiciones desnitrificantes organotróficas en régimen estacionario.

2.2.2 Evaluar el proceso fisiológico respiratorio con alimentación de dos fuentes de donadores de electrones (sulfuro y acetato).

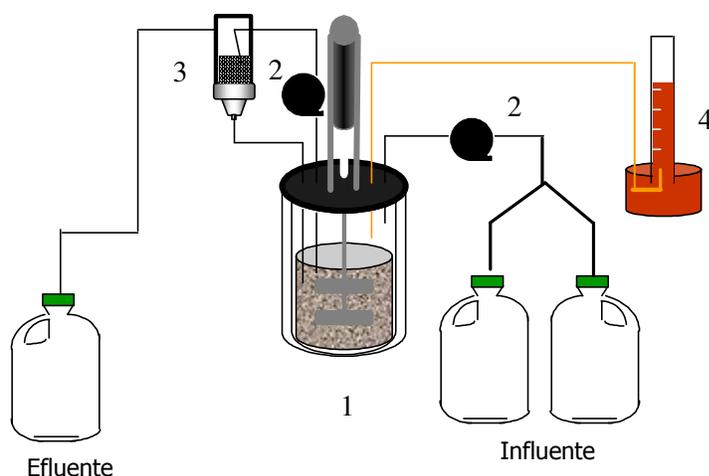
2.2.3 Evaluar la capacidad de eliminación y separación del azufre elemental formado en continuo, en régimen estacionario, del RLFI.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Características del reactor continuo de tanque agitado (RCTA)

Se utilizó un reactor Applikon, de 2 L de volumen nominal, con bombas peristálticas acopladas para el control del flujo del influente y efluente. El sistema integrado contó con dispositivos para el control de temperatura, de mezclado homogéneo, sedimentador para la recuperación de la biomasa del efluente y un sistema para la recolección de biogás (columna de solución salina), como se puede observar en la Figura 9. El sistema fue sometido a pruebas para verificar la ausencia de fugas de gas, y asegurar las condiciones anaerobias dentro del sistema.



**Figura 9.** Esquema del reactor de tanque agitado y dispositivos. 1) bioreactor, 2) bombas peristálticas, 3) sedimentador y 4) sistema de recolección de biogás.

#### 3.2 Inóculo

El inóculo que se utilizó fue lodo desnitrificante procedente del laboratorio de fisiología y bioquímica microbiana de la UAM-Iztapalapa. Antes de su inoculación, el lodo se lavó dos veces con una solución isotónica (0.9%) de cloruro de sodio para eliminar el amonio presente y residuos. La concentración de biomasa medida como sólidos suspendidos volátiles después del lavado fue de 61 gSSV/L. En el reactor, se adicionó inóculo, obteniéndose una concentración final de 6 gSSV/L.

### 3.3 RCTA bajo condiciones desnitrificantes

#### 3.3.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo se suministró en forma separada para evitar problemas de precipitación de las sales. El medio 1 contenía el agente reductor en forma de acetato de sodio y el medio 2 el aceptor de electrones, nitrato de sodio, en las concentraciones que se indican en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Composición del medio de cultivo para el RCTA bajo condiciones desnitrificantes

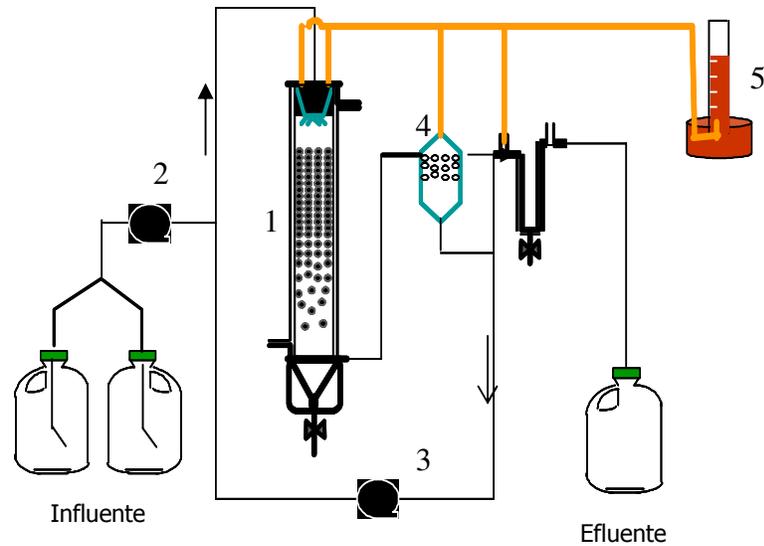
<b>Medio 1: Fuente de carbono</b>	[g/L]	<b>Medio 2: Fuente de nitrato</b>	[g/L]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	FeCl <sub>3</sub>	0.1
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0.6	CuSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)	0.02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0.12	NaNO <sub>3</sub>	6.07
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.82		
CH <sub>3</sub> COONa	4.8		

El volumen de operación del reactor fue de 1.2 L. La alimentación se llevó a cabo con un flujo total de 0.6 L/d, la temperatura se mantuvo constante a 32° C, el pH a 9.0 ± 0.1, agitación 250 rpm y un tiempo de residencia hidráulico de 2 días. Durante la operación del reactor se midió la velocidad de producción de biogás y se dio seguimiento al comportamiento del proceso desnitrificante, a través de la medición de compuestos nitrogenados y carbonados en el efluente del reactor.

Conducir la operación del RCTA bajo condiciones desnitrificantes hasta alcanzar el régimen estacionario fue una etapa previa al estudio del comportamiento del proceso desnitrificante organo-litótrofo en el RLFI. Esta etapa previa tuvo la finalidad de entender el proceso desnitrificante, manejo del reactor y su evaluación a través de variables de respuesta como eficiencia y rendimiento.

#### 3.4 Características del Reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI)

Se utilizó un RLFI con un volumen nominal de 2 L, un volumen de operación de 1.7 L, bomba peristáltica para el control del flujo del influente y para la recirculación. El sistema integrado contó con dispositivos para el control de temperatura y un sistema para la recolección de biogás (por desplazamiento de solución salina saturada), como se puede observar en la Figura 10.



**Figura 10.** Esquema del reactor de lecho fluidificado inverso y dispositivos periféricos. 1) bioreactor, 2) bomba peristáltica del influente, 3) bomba peristáltica de recirculación, 4) trampa de lodos y 5) recolección de biogás.

### 3.5 Inmovilización de la biopelícula en el RLFI

Se utilizó como material de soporte, polietileno de baja densidad ( $267 \text{ Kg/m}^3$ ), con un diámetro promedio de  $0.4 \text{ mm}$ , ocupando el 20% del volumen de operación del reactor. El inóculo que se adicionó fue lodo fisiológicamente estable procedente del RCTA operado en la etapa anterior, la concentración, después de la inoculación fue de  $0.6 \text{ gSSV/L}$ .

La inmovilización se llevó a cabo en lote con recirculación del medio de cultivo, el cual se renovó cada 24 horas, con una velocidad descendencial de  $11.5 \text{ m/h}$  y temperatura de  $32^\circ \text{ C}$ . Durante la operación del reactor fue medida la biopelícula inmovilizada, expresada en kilogramos de sólidos volátiles inmovilizados por metro cúbico de soporte seco ( $\text{Kg SVI/ m}^3$  soporte seco).

El medio de cultivo utilizado para la formación de la biopelícula se suministró en forma separada para evitar problemas de precipitación, con una relación C/N de 2.9, y mayor concentración de fosfato y magnesio para favorecer el crecimiento microbiano. La formulación del medio se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Composición del medio de cultivo para la formación de la biopelícula

<b>Medio 1: Fuente de carbono</b>	[g/L]	<b>Medio 2: Fuente de nitrato</b>	[g/L]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	FeCl <sub>3</sub>	0.1
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0.6	CuSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)	0.02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0.12	NaNO <sub>3</sub>	7.6
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	1.2		
CH <sub>3</sub> COONa	12.5		

### 3.6 Operación del RLFI bajo condiciones desnitrificantes heterotróficas

El medio de cultivo para el arranque del reactor LFI en continuo después de la inmovilización, se suministró en forma separada para evitar problemas de precipitación. Uno contenía el agente reductor en forma de acetato de sodio y el otro contenía el aceptor de electrones en forma de nitrato de sodio, en las concentraciones que se indican en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Composición del medio de cultivo para el RLFI bajo condiciones desnitrificantes.

<b>Medio 1: Fuente de carbono</b>	[g/L]	<b>Medio 2: Fuente de nitrato</b>	[g/L]
CuSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)	0.015	FeCl <sub>3</sub>	0.01
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	1	MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0.05	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
CH <sub>3</sub> COONa	2.52	CuSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)	0.015
		NaNO <sub>3</sub>	2.61

La alimentación se llevó a cabo con un flujo de 1.64 L/d, la temperatura se mantuvo constante a 32° C, el pH a  $9 \pm 0.2$ , velocidad descendional 3.5 m/h y un tiempo de residencia hidráulico de 22 horas. Durante la operación del reactor se midió la velocidad de producción de biogás y se dio seguimiento al comportamiento del proceso desnitrificante a través de la medición de compuestos nitrogenados y carbonados en el influente y efluente del reactor.

### 3.7 Operación del RLFI bajo condiciones desnitrificantes organo-litótrofas

El medio de cultivo para el arranque del reactor de lecho fluidificado en continuo se suministró en forma separada para evitar problemas de precipitación. El medio 1 contenía los agentes reductores en forma de acetato de sodio y sulfuro de sodio y el medio 2 el aceptor de electrones en forma de nitrato de sodio.

La alimentación se llevó a cabo a un flujo de 1.8 L/d, la temperatura se mantuvo constante a 32° C, pH experimental 8.0-8.5 y un tiempo de residencia hidráulico de 25 horas. Se operó con diferentes relaciones C/N (1.4, 1.25, 1.1) en la alimentación, manteniendo constante la concentración de nitrógeno y sulfuro. Durante la operación del reactor se midió la velocidad de producción de biogás y se dio seguimiento al comportamiento del proceso desnitrificante organo-litótrofo (DOL) a través de la medición de compuestos nitrogenados, carbonados y azufrados en el influente y efluente del reactor.

### **3.8 Métodos de análisis.**

A continuación se describen los fundamentos de los métodos y técnicas de análisis de las variables de respuesta (compuestos nitrogenados, azufrados, carbonados y biomasa). Los procedimientos y curvas estándar que muestran la reproducibilidad de los métodos, se detallan en el Anexo I.

#### **3.8.1 Compuestos nitrogenados**

Para la determinación de amonio se utilizó un electrodo selectivo del ion amoniaco (pHoenix Electrode Co.), cuya respuesta de linealidad se obtiene en un intervalo de 0.01 a 100 mg/L de amoniaco. La muestra se alcaliniza con hidróxido de sodio para desprotonar el ion amonio convirtiéndose en amoniaco (ASTM, 1992). El amoniaco pasa a través de una membrana permeable al gas, colocada en el fondo del electrodo selectivo modificando el pH de la solución interna. El cambio es detectado por un electrodo interno de pH. La medición del potencial en mV se hizo con un potenciómetro Cole-Parmer (Digitense), bajo agitación constante (5 rpm) y a 25° C. El electrodo se coloca con una inclinación de 45° para evitar la formación de burbujas que puede interferir en la lectura. El método es sensible en una escala de 0.03 a 1400 mg de N-NH<sub>3</sub>/L.

La cuantificación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> fue por electroforesis capilar (Li, 1993). Donde es posible medir estos 4 compuestos en una sola corrida. Este método se basa en la migración electroforética de iones al aplicar un voltaje a través de una columna capilar, causando una migración diferencial de los componentes de la muestra hacia el electrodo

respectivo. Dependiendo de la polaridad de la energía suministrada y la composición del electrolito, el analito separado pasa a través del detector.

Se utilizó un analizador de iones (CIA 4000, Millipore), a una temperatura de 25° C. Como capilar se empleó una columna de sílice fundida, de 60 cm. de largo y 75 µm de diámetro interno, con una corriente de 18 µA y un suministro de energía negativo con un voltaje de 20KV. El modo de la inyección fue hidrostática a 10 cm. de altura por 30 seg. La absorbancia se midió en la región ultravioleta con lámpara de mercurio para 254 nm. Los tiempos de toma de muestra y de corrida fueron 4 segundos y 5 minutos, respectivamente.

El análisis de nitrógeno molecular y óxido nitroso fue por cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3350, con un detector de conductividad térmica y un integrador Shimadzu CR501 Chromatopac. Como fase móvil se utilizó helio a un flujo de 16 ml/min, con una columna de acero de 1.20 m de largo y 1/8" de diámetro, empacada con Porapak Q malla 80 - 100. Las condiciones de temperatura fueron: para la columna, 35° C; inyector, 100° C; detector, 110° C; filamento, 135° C y un volumen de inyección de 50µL de muestra (Varian, 1996). La calibración del cromatógrafo se hizo con una mezcla estándar de nitrógeno (60%), dióxido de carbono (15%) y óxido nitroso (10%). La muestra de biogás producido en el reactor se obtuvo a través del septo colocado en la línea de recolección del gas, con una jeringa hermética de 0.5 ml (Mca. Hamilton).

Las mediciones de los gases se realizaron directamente con inyecciones repetidas de la misma muestra. Bajo las condiciones del método, es posible en la misma corrida la identificación de metano y dióxido de carbono.

### **3.8.2 Compuestos azufrados**

El azufre elemental se determinó por el método de cianolisis. Esta técnica permite una rápida y precisa determinación de pequeñas cantidades de azufre elemental. En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona rápidamente con cianuro para formar el complejo tiocianato, complejo que puede ser determinado colorimétricamente por la adición de acetona con cloruro férrico. El método es sensible a concentraciones de 2 ppm de azufre elemental. La

absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Ultrospec II-4050 con fuente de luz de tungsteno a 465 nm. El método alcanza una precisión de 98-99%. (Bartlett *et al.*, 1954).

Para la determinación de sulfuro se utilizó el método yodométrico (Standar Methods, 1985), que se basa en la capacidad oxidante débil del yodo frente a un reductor fuerte como es el ion sulfuro, en medio ácido. La medición se hace en forma indirecta por una valoración en retroceso del yodo remanente empleando una solución estándar de tiosulfato de sodio. Este es un método confiable para determinar sulfuro en concentraciones mayores de 1 mg/L si no se tienen interferencias y si se evita la pérdida de H<sub>2</sub>S.

### **3.8.3 Compuestos carbonados**

El carbono total se midió con un analizador de carbono orgánico total. El principio de su determinación se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presentan las moléculas poliatómicas de gas como el CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, a diferencia de moléculas como N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, que no presentan esa propiedad. El equipo utilizado es un analizador de carbono orgánico total modelo TOC-5000 de Shimadzu TM. Cuenta con un tubo de combustión para carbón total que contiene catalizador para la combustión y es calentado a 680° C. Como gas de arrastre utiliza aire de alta pureza (Shimadzu Co.).

El acetato se cuantificó por electroforesis capilar, con un analizador de iones (CIA 4000, Millipore), a una temperatura de 25° C. Como capilar se empleó una columna de sílice fundida, de 60 cm. de largo y 75 µm de diámetro interno, con una corriente de 18 µA y un suministro de energía negativo con un voltaje de 20KV. El modo de la inyección fue hidrostática a 10 cm. de altura por 30 seg. La absorbancia se midió en la región ultravioleta con lámpara de mercurio a 254 nm. Los tiempos de toma de muestra y de corrida fueron 4 segundos y 6 minutos, respectivamente.

La concentración de carbono inorgánico fue determinada con el mismo procedimiento para el carbono total. La muestra se introduce por el inyector de muestra del equipo (TOC-5000). Posteriormente se acidifica y se somete a burbujeo con el gas de arrastre, posteriormente el componente inorgánico se convierte a CO<sub>2</sub> que es detectado por el analizador infrarrojo de gas (Shimadzu Co.).

### 3.8.4 Cuantificación de Biomasa: sólidos suspendidos volátiles (SSV) y biomasa inmovilizada

Los SSV se determinaron por gravimetría, de acuerdo al método recomendado por Standard Methods (1985). La biomasa inmovilizada se cuantificó por gravimetría una vez desprendida la biomasa del soporte por sonicación.

### 3.8.5 Determinación de la velocidad volumétrica de producción de biogás

Los valores de la velocidad de producción de los diferentes gases están expresados en condiciones estándar: 1 atm y 298.15° K. El volumen estándar del gas se calculó con la siguiente relación, considerando que la presión atmosférica de la ciudad de México es de 0.8 atm.

Velocidad de producción de N<sub>2</sub> molecular bajo condiciones estándar.

$$v_N = \frac{(F * f * T_s * P_t)}{(T_f * P_s)} = \left[ \frac{L}{d} \right]$$

$v_N$  = Velocidad de producción de N<sub>2</sub> molecular.

F = Flujo de biogás (L/d)

f = Fracción de N<sub>2</sub> en el biogás.

T<sub>s</sub> = Temperatura estándar (298.15° K).

P<sub>t</sub> = Presión atmosférica a la que opera el reactor (0.8 atm para la Ciudad de México).

T<sub>f</sub> = Temperatura de operación del reactor (° K)

P<sub>s</sub> = Presión estándar (1 atm).

Para calcular la velocidad volumétrica de producción de N<sub>2</sub> (g/L-d) y para que sea comparable con la velocidad de carga de nitrato, se utiliza la siguiente ecuación:

$$v = \frac{(v_N * P_s * PM_{N_2})}{(R * T_s * V_R)} = \left[ \frac{g}{L * d} \right]$$

Donde;

PM<sub>N<sub>2</sub></sub> = Peso molecular del N<sub>2</sub> (g/mol)

R = Constante de los gases ideales (0.082 atm\*L/° K\*mol)

V<sub>R</sub> = Volumen de operación del reactor.

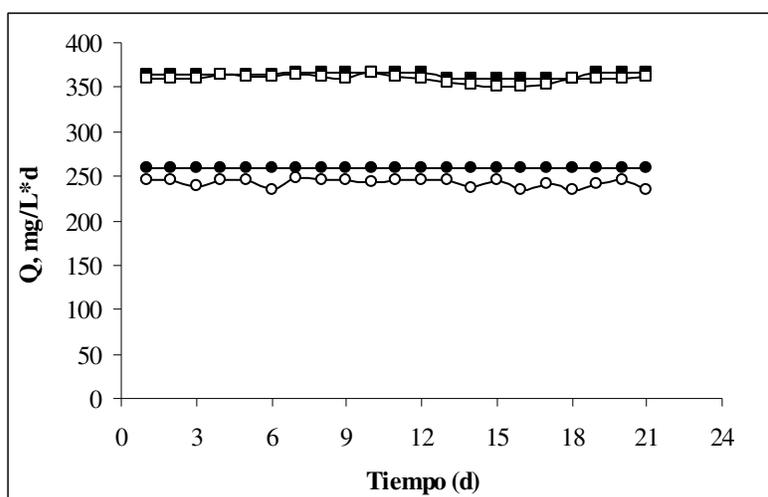
## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Estabilización del proceso desnitrificante en el RCTA

En la alimentación se suministró como fuente de carbono (acetato) y como fuente de nitrógeno (nitrato). En el gas el principal componente fue el nitrógeno molecular. Asimismo, en el efluente, la concentración residual de nitrato fue menor a 1 ppm y no se detectó acetato residual. El  $\text{CO}_2$  producido de la mineralización del acetato, por el pH alcalino del medio se solubilizó en forma de bicarbonato, y fue cuantificado como carbono inorgánico soluble.

En la Figura 11 se presenta el comportamiento de los compuestos nitrogenados y carbonados, en función de la velocidad de carga ( $\text{mg/L}\cdot\text{d}$ ). La velocidad de carga de nitrógeno fue de  $259 \text{ mg N-NO}_3^- / \text{L}\cdot\text{d}$  y la velocidad de descarga fue menor a  $0.1 \text{ mg N-NO}_3^- / \text{L}\cdot\text{d}$ , por lo que se obtuvo una eficiencia de consumo de nitrato del 99 %.



**Figura 11.** Perfil de compuestos nitrogenados y carbonados en el RCTA bajo condiciones desnitrificantes. (●) velocidad de carga de  $\text{N-NO}_3^-$ , (○) velocidad de producción de  $\text{N}_2$ , (◐) velocidad de descarga de c-inorgánico soluble y (■) velocidad de carga de c-acetato.

El rendimiento desnitrificante, velocidad de producción de nitrógeno molecular con respecto a la velocidad de nitrato consumido ( $Y\text{-N}_2$ ), fue de 0.94.

Respecto al comportamiento de los compuestos carbonados, la velocidad de carga fue de  $364 \text{ mg C-acetato/L}\cdot\text{d}$ , por lo que se obtuvo una eficiencia de consumo de acetato del 100%. Puede también verse que la mineralización del acetato a  $\text{CO}_2$  fue completa, resultado que coincide con la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ .

La concentración de la biomasa inicial fue de 6 g SSV/L y la final, después de 21 días, fue similar. Este comportamiento podría estar vinculado con la relación C/N que se trabajó la cual fue de 1.4, cercana a la estequiométrica (1.1), por lo que el cultivo estuvo limitado por la fuente de carbono para llevar a cabo la síntesis de masa celular. Este resultado, junto con los previamente descritos, muestra que el proceso respiratorio desnitrificante fue netamente desasimilativo. Estas observaciones coinciden con los de Akkuna *et al.* (1993); Cuervo-López *et al.* (1999) quienes reportaron un crecimiento no significativo y un alto rendimiento desnitrificante a relaciones C/N bajas (cerca de las estequiométricas).

Dado que el  $Y-N_2$  y  $Y-CO_2$  fueron muy próximos a 1, es claro que el lodo desnitrificante estuvo, desde el punto de vista respiratorio, fisiológicamente estable, además como no hubo un cambio significativo en la velocidad de producción de nitrógeno molecular, se concluyó que el proceso respiratorio operó en estado estacionario durante todo el tiempo de experimentación.

#### 4.2 Inmovilización de la biopelícula en el RLFÍ en lote

Con el fin de inmovilizar la biomasa en el soporte plástico de polietileno, se inoculó el reactor con el lodo producido en el RCTA y se operó durante 15 días en lote, recambiándose el medio de cultivo cada 24 h.

En la Figura 12 se puede observar que para el día 5 en condiciones desasimilativas (C/N; 1.4) se alcanzó una inmovilización de 0.91 Kg de sólidos volátiles inmovilizados (SVI)/m<sup>3</sup> de soporte seco.

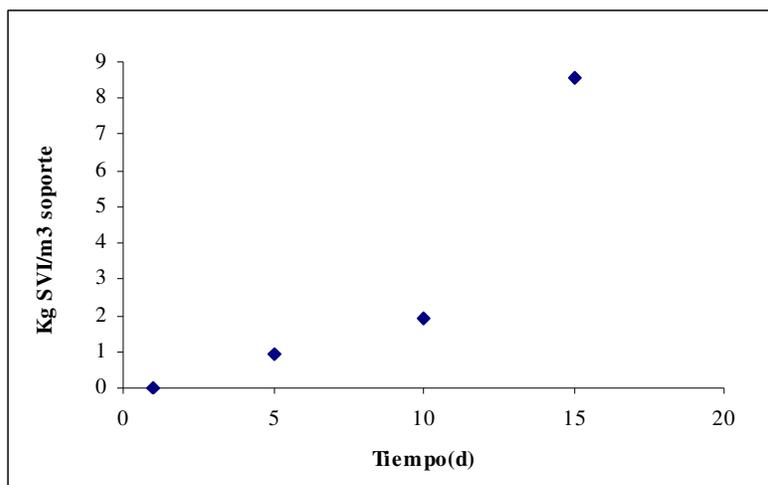
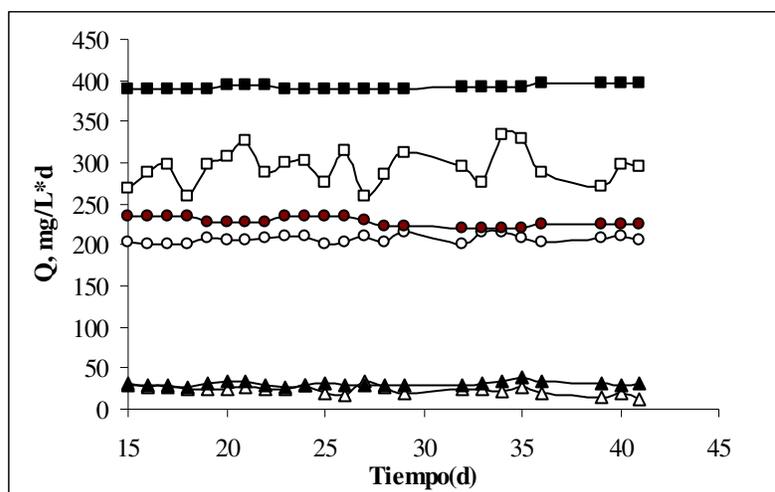


Figura 12. Inmovilización de la biopelícula en el RLFÍ.

Posteriormente, se cambió la operación del sistema a un estado más asimilativo incrementando la relación C/N a 2.9, junto con un aumento de fosfato de 2 a 3 g/L para favorecer la asimilación y por lo tanto la colonización del soporte, ya que a una relación C/N de 1.4 está muy limitada la fuente de carbono para la síntesis de masa celular. Para el día 15 de cultivo, se alcanzaron 8.56 Kg de SVI/m<sup>3</sup> de soporte seco, un incremento de concentración (SSV) aproximado del 90%.

A partir del día 15 de inmovilización se operó el RLFI en continuo a una relación C/N de 1.7, con una velocidad de carga de nitrógeno de 228 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> /L-d, alcanzando una eficiencia de consumo de nitrato del 99.5% en el estado estacionario. En el efluente la concentración de nitrato y nitrito residual fue menor a 1ppm.

En la Figura 13, se puede observar que la velocidad de carga de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> está muy próxima a la velocidad de formación de N<sub>2</sub>, el cual se ve reflejado en el rendimiento desnitrificante obtenido (Y-N<sub>2</sub>; 0.9). Sin embargo, la mineralización del acetato fue ligeramente incompleta, lo cual podría estar vinculado con la relación C/N de 1.7 en la alimentación, que por estequiometría hay carbono orgánico disponible para la formación de biomasa y exopolímeros. La eficiencia de consumo de acetato fue de 98.9%.



**Figura 13.** Perfil de compuestos nitrogenados y carbonados en el RLFI bajo condiciones desnitrificantes. (●) velocidad de carga de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (○) velocidad de producción de N<sub>2</sub>, (◻) velocidad de descarga de c-inorgánico soluble, (■) velocidad de carga de c-acetato, (▲) velocidad de descarga de c-biomasa y (△) velocidad de descarga de c-exopolímeros.

Reyes-Ávila *et al.* (2000), observaron en un reactor de tanque agitado continuo, alimentado con acetato y nitrato a una relación C/N de 1.7, TRH de 2 días y bajo condiciones desnitrificantes, una eficiencia de consumo de 85 y 100% respectivamente, mientras que a una

relación C/N de 1.4 la eficiencia de consumo de acetato aumentó a (94%), sin verse afectado el rendimiento desnitrificante. Comparando las observaciones con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos señalar que la eficiencia de consumo de acetato fue cercana al 100%, debido a que parte del carbono orgánico se destinó a la formación de biomasa y exopolímeros. El RLFI fue más eficiente con respecto al reactor continuo de tanque agitado.

Bajo estos resultados de eficiencias y rendimientos altos, podemos concluir que el RLFI puede ser un sistema para llevar a cabo el proceso desnitrificante, ya que se requiere de un tiempo corto, tanto para el proceso de inmovilización, como para que se alcance el estado estacionario (menos de 20 días), que comparado con la literatura (Meir-Schneiders *et al.*, 1993; Meraz *et al.*, 1995) varió de 60 a 100 días, bajo las condiciones de cultivo ahí referidos, para llevar a cabo el proceso metanogénico. Se puede resaltar que bajo condiciones desnitrificantes se favoreció la inmovilización y un arranque rápido del sistema. Este resultado pudo estar relacionado con que se inoculó con un consorcio fisiológicamente estable, además de que la desnitrificación heterotrófica tiene una energía libre (-996 KJ/mol), aproximadamente 10 veces mayor que la metanogénesis, esto es, mayor cantidad de energía disponible para la síntesis de biomasa.

#### **4.2.1 Balance de masa en el RLFI bajo condiciones desnitrificantes**

Se realizó el balance de materiales para los compuestos nitrogenados y carbonados en el estado estacionario. En la Tabla 10 se puede observar un porcentaje de recuperación de nitrógeno cercano a 96%, donde el producto principal fue  $N_2$ , el cual representó el 90% de la velocidad de carga de  $N-NO_3^-$ . El porcentaje de recuperación de carbono fue de 90.74%, siendo el producto principal  $HCO_3^-$ , medido como c-inorgánico soluble. Se detectó en el efluente c-biomasa y c-exopolímeros solubles. Estos dos últimos representaron un porcentaje del 8 y 6% de la velocidad de carga del c-acetato, los que posiblemente tuvieron un efecto sobre el cambio estructural y aumento en la densidad del lecho, como podrá verse en párrafos posteriores.

**Tabla 10.** Composición promedio de nitrógeno y carbono del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones desnitrificantes heterotróficas en el RLF1.

(mg/L-d)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N <sub>2</sub>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-biomasa	Total N
Influente	228 ± 6	0.00	0.00	0.00	0.00	228 ± 6
Efluente	1 ± 1.3	206 ± 5	0.84 ± 1.3	1.2 ± 1.1	5.6 ± 0.6	215 ± 5
	C-acetato	*C-I	C-CO <sub>2</sub> gas	*C-E	C-biomasa	Total C
Influente	391.5 ± 2.6	0.00	0.00	0.00	0.00	391.49 ± 3
Efluente	4.6 ± 1	294.2 ± 21	2.57 ± 2	23.25 ± 5	30.56 ± 3	355.25 ± 2

\* C-E: es el c-exopolimérico soluble, se obtuvo de la diferencia del carbono orgánico cuantificado por análisis en el TOC y el acetato cuantificado por electroforesis capilar. C-I: carbono inorgánico soluble (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

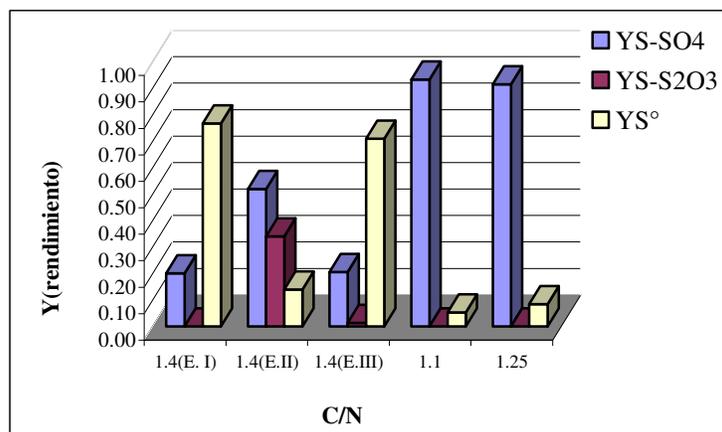
El 14% de la velocidad de carga de c-acetato no se utilizó como fuente de energía, si no como fuente de carbono para la síntesis de biomasa y exopolímeros. Probablemente esto pudo deberse a la falta de fuente oxidante (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

#### 4.4 Estabilización del proceso desnitrificante organo-litótrofo (DOL) en el RLF1

El RLF1 bajo condiciones DOL fue operado en continuo aproximadamente 85 días, a tres diferentes relaciones C/N (1.4, 1.1 y 1.25), manteniendo la velocidad de carga del sulfuro y nitrógeno fijas.

Una vez que se alcanzó el estado estacionario desnitrificante en el RLF1 en condiciones de heterotrofia, se inició la alimentación con sulfuro (69.4 mg S<sup>-2</sup>/L-d). En la Figura 14 se pueden observar tres etapas (EI, EII, EIII) a una relación C/N de 1.4, debido posiblemente a lo siguiente: cuando se inició la alimentación con sulfuro, hubo una oxidación parcial del mismo a azufre elemental (Etapa I), pero el azufre elemental no se detectó en el efluente, ya que probablemente se estaba acumulando dentro del sistema debido a la presencia de sustancias exopoliméricas (proteínas principalmente) evitando la sedimentabilidad del azufre. La acumulación de azufre elemental pareció provocar un cambio metabólico en el proceso, como se puede observar en la etapa II, con la aparición de sulfato y tiosulfato en el efluente. En esta etapa se decidió acoplar un sedimentador a la salida del RLF1 para separar lo que se estaba reteniendo dentro del sistema (S<sup>o</sup>, exopolímeros y biomasa principalmente) (Figura 15). Después de 5 días se recuperó el azufre elemental con un Y-S<sup>o</sup> de 0.71 (Etapa III). Posteriormente se disminuyó la C/N a 1.1 para reducir la producción de sustancias

exopoliméricas, y de esta manera pudiera sedimentar más fácilmente el azufre elemental. La producción de sustancias exopoliméricas disminuyó, ya que la proteína soluble en el efluente disminuyó en un 70%, pero se perdió la expansión del lecho, adquiriendo el aspecto de un lecho empacado. A esta C/N el sulfuro se oxidó completamente hasta sulfato ( $Y\text{-SO}_4^{-2}$ ; 0.94). Esto sugiere ciertamente, que con la modificación de la C/N, el sulfuro se oxidó hasta sulfato. Posteriormente se trabajó con una relación C/N intermedia 1.25, observándose un comportamiento similar, con respecto a la relación C/N de 1.1.



**Figura 14.** Comportamiento de la oxidación del sulfuro en función de la acumulación de azufre elemental y de la relación C/N en el RLFI.

Estos resultados indican que la relación C/N tiene un efecto en la ruta metabólica oxidativa del sulfuro, ya que al alimentar con una relación C/N de 1.4, se obtuvo como producto parcial de la oxidación del sulfuro, azufre elemental. A esta relación C/N el aceptor de electrones ( $\text{NO}_3^-$ ) está limitado. Janssen *et al.* (1995), observaron en un proceso sulfooxidante utilizando como aceptor final de electrones al  $\text{O}_2$ , que bajo condiciones limitadas del mismo ( $< 0.1 \text{ mg/L}$ ) el  $\text{S}^\circ$  fue el producto final de la oxidación parcial del  $\text{H}_2\text{S}$ . Analizando estos resultados podría hallarse una similitud. Esto es que la limitación del aceptor final de electrones es lo que podría estar generando que la oxidación del sulfuro a  $\text{S}^\circ$  fuera sólo parcial.

Es importante hacer mención que el consorcio microbiano mostró gran versatilidad, ya que al ser inmovilizado bajo condiciones desnitrificantes, posteriormente fue capaz de orientar su metabolismo a la oxidación de compuestos azufrados y al mismo tiempo eliminar nitrato y acetato. Aunque es poco probable, no se pueden descartar cambios en la población microbiana,

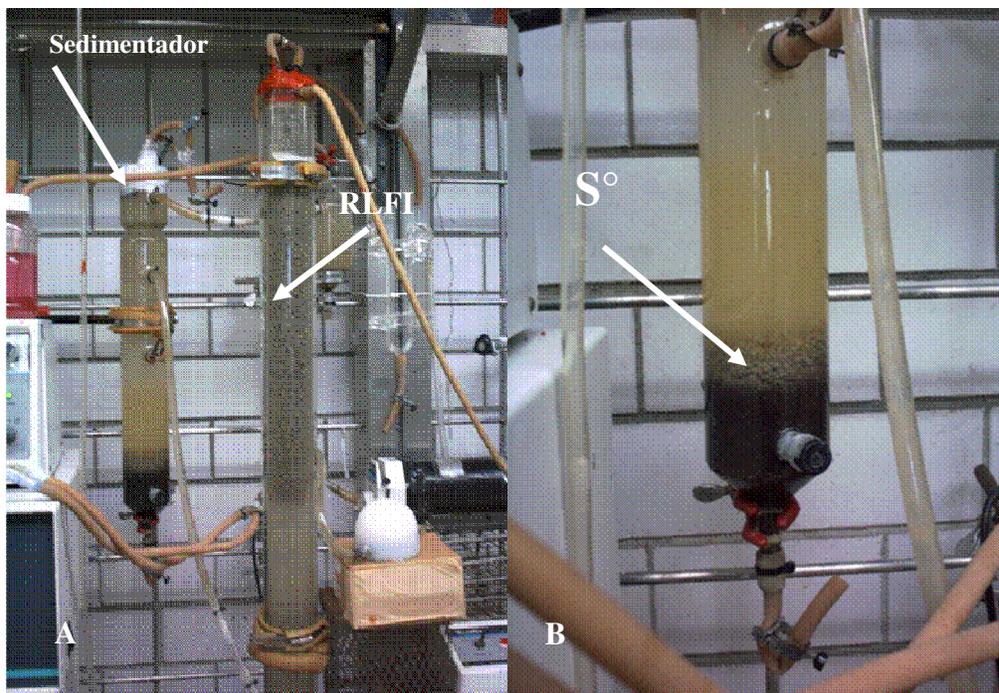
pero el tiempo de respuesta para oxidar el sulfuro fue casi inmediato, lo cual descarta que el cambio pudiera estar asociado a cambios de microflora.

En el estado estacionario DOL se calcularon las eficiencias de consumo de sulfuro, acetato, nitrato y el rendimiento desnitrificante. En la Tabla 11 se puede observar que a una relación C/N de 1.4 y 1.25 las eficiencias de consumo de acetato, sulfuro y nitrato fueron del 100%. A una relación C/N de 1.1 sólo el sulfuro se consumió al 90%. Esta disminución posiblemente se debió a que parte de la reducción de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitrógeno molecular se vio limitada, ya que se detectó nitrito en el efluente, lo cual se vio reflejado en la disminución del rendimiento desnitrificante ( $Y\text{-N}_2$ ; 0.73). Matejů *et al.* (1992), observaron que a relaciones S/N bajas (menor a la estequiométrica), se presenta acumulación de nitrito, ya que la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2$  se encuentra limitada. En el presente trabajo la relación S/N se mantuvo constante, por lo que estos resultados indicarían que la disminución de la relación C/N también limitó la reducción del nitrito, debido a que a una relación C/N de 1.4 no se detectó nitrito residual. Sin embargo, cuando se disminuyó la relación C/N (1.1) se detectó dicho compuesto en el efluente.

**Tabla 11.** Eficiencias de consumo de sulfuro, nitrato, acetato y rendimiento desnitrificante ( $Y\text{-N}_2$ ) en el estado estacionario en función de la relación C/N en el RLF1.

C/N	$Y\text{-N}_2$	Eficiencia. Consumo Sulfuro (%)	Eficiencia. Consumo Nitrato (%)	Eficiencia. Consumo Acetato (%)
1.4	$0.81 \pm 0.03$	100	100	100
1.25	$0.84 \pm 0.06$	100	100	100
1.1	$0.73 \pm 0.01$	$90.42 \pm 4.51$	$99.12 \pm 1.26$	100

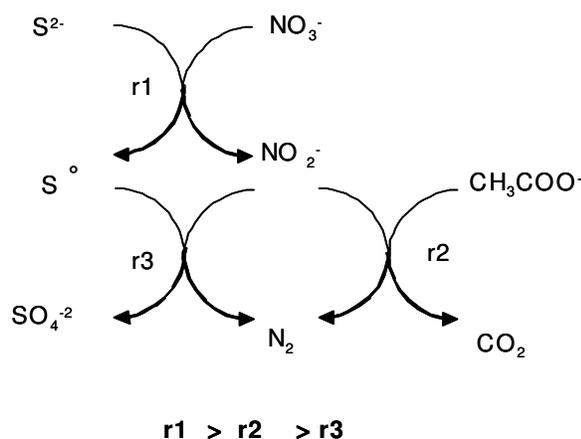
Con respecto al rendimiento desnitrificante se obtuvieron valores diferentes en los cambios de la relación C/N, lo que indica cambios de operación de las rutas metabólicas dentro del sistema. Cervantes *et al.* (1999), señalaron que al trabajar con C/N demasiado altas (mayores a la estequiométrica) hay una reducción desasimilativa de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_3$ , por lo que hay evidencia de que la modificación en la relación C/N tiene un efecto sobre la ruta metabólica desnitrificante, el cual se ve reflejado en el rendimiento desnitrificante ( $Y\text{-N}_2$ ).



**Figura 15.** En la foto A, se puede observar el sedimentador acoplado a la salida del RLFI. En la foto B se puede observar la presencia de azufre elemental en el sedimentador

Un mecanismo que podría ayudar a entender por qué se forma  $S^{\circ}$ , es el propuesto por Reyes-Ávila *et al.* (2004), quienes observaron que bajo condiciones desnitrificantes durante la eliminación de acetato, nitrato y sulfuro a una relación C/N de 1.4, la velocidad de reacción más rápida fue la oxidación de sulfuro a azufre elemental ( $r_1$ ), la segunda fue la oxidación del acetato a dióxido de carbono ( $r_2$ ) y la reacción más lenta fue la oxidación del azufre elemental a sulfato ( $r_3$ ), (Figura 16). Los productos principales fueron, azufre elemental,  $N_2$  y  $CO_2$ . Esto podría significar que al trabajar con relaciones C/N bajas (menor a la estequiométrica), se tiene menor concentración de electrones proveniente de la fuente orgánica y dado que la velocidad de reacción depende principalmente de la concentración de acetato ( $r_2$ ), en consecuencia si esta disminuye, también la velocidad de reacción, de tal manera que la reducción de nitrato podría depender de la oxidación del azufre elemental a sulfato ( $r_3$ ). Kim y Son (2000), realizaron un estudio en lote, utilizando un cultivo axénico para evaluar la eliminación de ácido acético, nitrato y tiosulfato. Trabajaron diferentes relaciones DQO:N:S, manteniendo constante la concentración de  $N-NO_3^-$  y S-tiosulfato. Observaron que al ir disminuyendo la relación DQO:N:S (3.3:1:3.3 a 0.3:1:3.3), la velocidad de consumo de acetato iba incrementando. Estos resultados son contrarios a la suposición arriba descrita. Sin embargo, estas evidencias no son

del todo comparables, debido a que las condiciones de trabajo para los experimentos fueron diferentes (mientras en uno la fuente de energía fue el sulfuro, en el otro la fuente de energía fue el tiosulfato, así como en uno se utilizó un consorcio, mientras que en el otro un cultivo axénico, etc.). Para entender este fenómeno con mayor detalle será necesario llevar a cabo más trabajo experimental adicional, alrededor de las velocidades de reacción. Esto es obtener más evidencia que muestre que al reducir la velocidad de carga de acetato (o la concentración, si se experimenta en cultivo lote), la reducción de nitrato depende del sulfuro presente, por lo que este es oxidado hasta sulfato.



**Figura 16.** Orden de las velocidades de reacción en la eliminación de acetato, nitrato y sulfuro bajo condiciones desnitrificantes (Reyes-Ávila *et al.*, 2004).

#### 4.4.1 Balance de materiales en el RLFI bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.4

Se realizó el balance de masa de los diferentes compuestos en la etapa III en el estado estacionario.

En la Tabla 12, se puede observar que los principales productos fueron  $N_2$ ,  $CO_2$  y  $S^0$ . En el efluente se detectaron c-biomasa y c-exopolímeros, que representan el 21 y 4% de la alimentación de acetato respectivamente. Este último está posiblemente involucrado en la disminución de la sedimentabilidad del azufre elemental. El porcentaje de recuperación de carbono, nitrógeno y azufre fue de 94.4, 96.6 y 94% respectivamente. Reyes-Ávila *et al.* (2000), observaron bajo condiciones DOL en un reactor continuo de tanque agitado, TRH de 2 días, C/N de 1.4, alimentado con acetato, nitrato y sulfuro ( $84 \text{ mg S}^2/\text{L-d}$ ) una eficiencia de consumo de 75, 100 y 32% respectivamente, con un rendimiento desnitrificante ( $Y-N_2$ ) de

0.84. Analizando los resultados se observa que la hidrodinámica del RLFI y la capacidad del sistema de retener mayor cantidad de biomasa con respecto a los sistemas que trabajan con células libres, se favorece la transferencia de masa y el consumo de sustratos respectivamente. Este resultado se vio reflejado en las eficiencias de consumo de los sustratos (100%). Sin embargo, la ruta metabólica desnitrificante no se modificó, ya que el rendimiento desnitrificante para los dos sistemas fue similar (0.81 y 0.84 respectivamente).

**Tabla 12.** Composición promedio de nitrógeno, carbono y azufre del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.4 en el RLFI.

mg/L-d	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N <sub>2</sub>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-P	N-biomasa	Total N
Influente	229.6 ± 2	0.00	0.00	0.00	0.00	229.6 ± 1.8
Efluente	0.00	185.3 ± 6	0.00	14.45 ± 3	21.4 ± 1.3	221.9 ± 4
	C-acetato	C-I	C-CO <sub>2</sub> gas	C-E	C-biomasa	Total C
Influente	335 ± 1.1	0.00	0.00	0.00	0.00	335 ± 1.1
Efluente	0.00	217 ± 7	0.2 ± 0.1	14 ± 4.2	71.2 ± 4	316 ± 13.5
	S-S <sup>2-</sup>	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	S-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	S-S <sup>0</sup>	S-biomasa	Total S
Influente	70.7 ± 2.1	0.00	0.00	0.00	0.00	70.7 ± 2.1
Efluente	0.00	13.2 ± 0.6	0.19 ± 0.1	48.8 ± 0.2	4.3 ± 0.3	66.4 ± 0.6

N-P: N-proteína exopolimérica soluble, C-I: C-inorgánico soluble y C-E: C-exopolímeros solubles.

**Nota:** El azufre elemental y la biomasa cuantificada en el sedimentador, fue convertido a velocidad de carga y sumada al efluente, en base a la siguiente ecuación:

$$Q = \left[ \frac{p}{V * t} \right] = \left[ \frac{mg}{L * d} \right]$$

$p$  = Biomasa o azufre elemental en el sedimentador (mg)

$V$  = volumen de operación del RLFI (L)

$t$  = días de sedimentación del sólido (d)

#### 4.4.2 Balance de masa en el RLFI bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.1.

Se llevó a cabo el balance de materiales de los compuestos carbonados, nitrogenados y azufrados cuando se disminuyó la relación C/N de 1.4 a 1.1 en el estado estacionario.

Los productos principales fueron SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. En la Tabla 13 se observa que el porcentaje de recuperación de carbono, nitrógeno y azufre fue de 97.9, 91.6 y 96% respectivamente. La proteína exopolimérica soluble disminuyó en un 70%, con respecto a la relación C/N de 1.4. Este resultado es muy relevante para aquellos lodos que presentan esponjamiento (bulking), ya

que un control de las sustancias exopoliméricas puede ser a través de la relación C/N. Mediante este control muchos lodos podrían ser extremadamente más estables.

Al operar el sistema bajo condiciones limitadas del donador de electrones, se modificó tanto la ruta metabólica oxidante del sulfuro como la estructura del lecho, adquiriendo un aspecto como de lecho empacado. Existe evidencia de la oxidación completa del sulfuro a sulfato en un reactor de lecho fluidificado de flujo ascendente bajo condiciones desnitrificantes, operado con condiciones limitadas de los donadores de electrones (sulfuro y acetato) a una relación C/N y S/N menor a 0.5. La desnitrificación fue incompleta, acumulándose nitrito, representando el 40% del nitrógeno de la alimentación, el cual comúnmente se forma a relaciones C/N o S/N por debajo de la estequiométrica (Cervantes *et al.* 1999; Matejúj *et al.* 1992). Annachhatre y Suktrakoolvait (2001), reportaron que al tener una concentración de oxígeno disuelto por arriba de 0.1 mg, en un reactor de lecho fluidizado bajo condiciones sulfooxidantes, la oxidación biológica del  $S^{-2}$  fue completa hasta  $SO_4^{2-}$ . Estos resultados muestran que al tener un exceso del aceptor final de electrones, el sulfuro es oxidado completamente hasta sulfato. El rendimiento de biomasa ( $Y_x$ ) no se vio afectado al disminuir la relación C/N, el cual fue de 0.22, similar al rendimiento obtenido con la relación C/N de 1.4 ( $Y_x$ ; 0.21)

**Tabla 13.** Composición promedio de nitrógeno, carbono y azufre del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.1 en el RLFI.

mg/L-d	N- $NO_3^-$	$N_2$	N- $NO_2^-$	N-P	N-biomasa	Total N
Influente	218 ± 1.5	0.00	0.00	0.00	0.00	218 ± 1.5
Efluente	1.91 ± 3	158.34 ± 3	19.22 ± 7	3.97 ± 3	16.45 ± 2	199.9 ± 10
	C-acetato	C-I	C- $CO_2$ gas	C-E	C-biomasa	Total C
Influente	244.7 ± 3.9	0.00	0.00	0.00	0.00	244.7 ± 3.9
Efluente	0.00	174.5 ± 9.1	0.97 ± 0.1	9.39 ± 2.5	54.8 ± 6.2	239.7 ± 12
	S- $S^{-2}$	S- $SO_4^{2-}$	S- $S_2O_3^{2-}$	S- $S^0$	S-biomasa	Total S
Influente	68.6 ± 2.3	0.00	0.00	0.00	0.00	68.6 ± 2.3
Efluente	5.57 ± 3.6	57.11 ± 4.5	0.00	0.00	3.25 ± 0.36	65.93 ± 2.3

N-P: N-proteína exopolimérica soluble, C-I: C-inorgánico soluble y C-E: C-exopolímeros solubles

#### 4.4.3 Balance de masa en el RLFI bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.25

Realizando el balance de materiales de los diferentes compuestos, prácticamente se observó un comportamiento similar al de la relación C/N de 1.1. Los productos principales fueron  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{CO}_2$ . En la Tabla 14 se puede observar un porcentaje de recuperación de carbono, nitrógeno y azufre de 93, 96 y 100% respectivamente. Es notable también que la limitación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2$  disminuyó conforme se incremento la relación C/N de 1.1 a 1.25, es decir conforme se aumentó el poder reductor. El nitrito representa menos del 3% de la velocidad de alimentación.

El rendimiento de biomasa ( $Y_x$ ) fue de 0.21. Esto significa que a pesar de tener relaciones C/N cercanas a la estequiométrica, hay fuente de carbono para la síntesis de masa celular, lo que probablemente podría estar relacionado a la presencia de dos fuentes donadores de energía (acetato y sulfuro).

**Tabla 14.** Composición promedio de nitrógeno, carbono y azufre del influente y efluente en el estado estacionario bajo condiciones DOL a una relación C/N de 1.25 en el RLFI.

mg/L-d	N- $\text{NO}_3^-$	$\text{N}_2$	N- $\text{NO}_2^-$	N-P	N-biomasa	Total N
Influente	227 ± 2.8	0.00	0.00	0.00	0.00	227.2 ± 2.8
Efluente	0.00	192 ± 12.8	5.7 ± 7.1	3.1 ± 0.54	17.7 ± 1.2	218.7 ± 15.6
	C-acetato	C-I	C- $\text{CO}_2$ gas	C-E	C-biomasa	Total C
Influente	283.3 ± 2.3	0.00	0.00	0.00	0.00	283.28 ± 2.3
Efluente	0.00	195.6 ± 3.4	0.00	9.8 ± 2.3	59.2 ± 3.4	264 ± 5.3
	S- $\text{S}^{-2}$	S- $\text{SO}_4^{2-}$	S- $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	S- $\text{S}^0$	S-biomasa	Total S
Influente	68.8 ± 2.3	0.00	0.00	0.00	0.00	68.7 ± 2.2
Efluente	0.00	65.4 ± 2.1	0.00	0.00	3.5 ± 0.2	68.9 ± 2.2

N-P: N-proteína exopolimérica soluble, C-I: C-inorgánico soluble y C-E: C-exopolímeros solubles

## **5. CONCLUSIONES**

## 5. Conclusiones y Recomendaciones

Las principales conclusiones con respecto al presente trabajo son:

En condiciones de heterotrofia en el reactor continuo de tanque agitado, con una velocidad de carga de  $\text{N-NO}_3^-$  de  $258.94 \pm 0.5$  mg/L-d, C/N 1.4, el consumo de los substratos nitrogenados y carbonados alcanzaron eficiencias de  $99.99 \pm 0.01$  y  $100\%$  respectivamente, con un rendimiento desnitrificante ( $\text{Y-N}_2$ ) de  $0.94 \pm 0.02$  en el estado estacionario.

Se llevó a cabo la inmovilización de la biopelícula en el soporte plástico de polietileno en el RLF, alcanzando  $8.5 \text{ Kg SVI/m}^3$  de soporte durante 15 días de inmovilización, alcanzando rápidamente el estado estacionario cuando el reactor se operó en continuo, con eficiencias de consumo de los substratos nitrogenados y carbonados del  $99.59 \pm 0.58$  y  $98.89 \pm 0.28\%$  respectivamente, con un rendimiento desnitrificante ( $\text{Y-N}_2$ ) fue de  $0.90 \pm 0.2$ .

A una relación C/N de 1.4 el sulfuro se oxidó parcialmente a azufre elemental, con eficiencias de consumo para acetato, nitrato y sulfuro del  $100\%$  para todos los casos, en el estado estacionario. El rendimiento desnitrificante ( $\text{Y-N}_2$ ) fue de  $0.81 \pm 0.03$ .

Al disminuir la relación C/N de 1.4 a 1.1 el sulfuro se oxidó casi completamente a sulfato, con eficiencias de consumo para acetato, nitrato y sulfuro del  $100$ ,  $99.12 \pm 1.26$  y  $90.42\% \pm 4.51$  respectivamente, en el estado estacionario. El rendimiento desnitrificante ( $\text{Y-N}_2$ ) fue de  $0.73 \pm 0.01$ .

A una relación C/N de 1.25 el sulfuro se oxidó completamente hasta sulfato, con eficiencia de consumo para acetato, nitrato y sulfuro de  $100\%$  para todos los casos, en el estado estacionario. El rendimiento desnitrificante ( $\text{Y-N}_2$ ) fue de  $0.84 \pm 0.06$ .

Los cambios de relación C/N afectan la estabilidad estructural de la biopelícula desnitrificante.

En condiciones desnitrificante organo-litótrofa en el RLF alimentado con sulfuro, el control de la C/N es indispensable para la oxidación del sulfuro al producto deseado.

Lo anterior aporta evidencia de que el proceso desnitrificante puede ser una alternativa tecnológica para la eliminación simultánea de materia orgánica, nitrato y sulfuro.

### ***Recomendaciones***

El acetato que se utilizó en el estudio, es un modelo adecuado para entender el proceso desnitrificante. Por lo tanto es conveniente evaluar el proceso desnitrificante en presencia de otro tipo de compuestos orgánicos, como los compuestos fenólicos provenientes de los efluentes de la industria petroquímica.

Se sugiere realizar un estudio detallado sobre la presencia de sustancias exopoliméricas que se producen durante la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental, con la finalidad de obtener una alternativa tecnológica al operar el RLFÍ sin la necesidad de un sedimentador y sin la interferencia de la proteína, ya que con el tiempo parece ser que dicha proteína afecta la estructura y estabilidad del lecho.

Un estudio utilizando como herramienta la biología molecular sería interesante, con el objetivo de conocer si es una o varias poblaciones microbianas las que están participando en la desnitrificación organo-litótrofa.

## **6. ANEXO I**

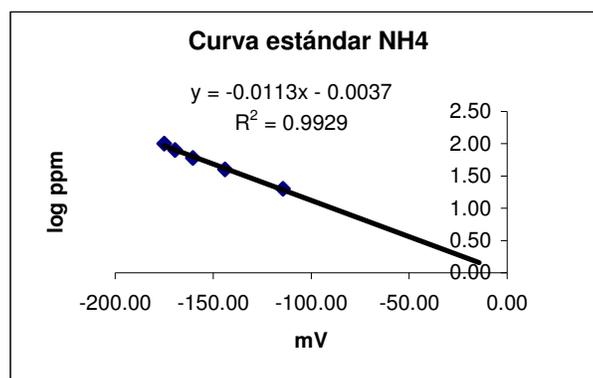
## 6. ANEXO I

Procedimientos y curvas estándar que muestran la reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados en este trabajo.

### Compuestos nitrogenados

#### *Cuantificación de Amoníaco*

La concentración de amoníaco se determina de una curva de calibración construida a partir de una solución estándar de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . En cada ocasión que se va a cuantificar  $\text{NH}_3$  en muestras, es necesario elaborar la curva de calibración, por lo menos con tres estándares de concentración conocida. El valor es proporcional al logaritmo de la concentración cuyo valor puede ser calculado directamente de la gráfica por extrapolación. La Figura 1 presenta los valores promedios obtenidos de tres estándares, cada uno trabajado con cinco diferentes concentraciones de amonio (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L). El valor promedio de la pendiente de la recta estimada y la ordenada al origen es -0.0113 y 0.0037 respectivamente, con un grado de reproducibilidad mayor que 95% (Tabla 1).



**Figura 1.** Curva de calibración con concentraciones estándar de amonio, de 20 a 100 mg/L.

**Tabla 1.** Estimadores del potencial en mV a diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$

	$\text{NH}_4^+$ mg/L				
	20	40	60	80	100
promedio mV	-114.33	-144	-160.33	-169.33	-175
DS	0.58	1.0	0.58	1.15	1.0
% C.V	<b>0.5</b>	<b>0.69</b>	<b>0.36</b>	<b>0.68</b>	<b>0.57</b>

DS: desviación estándar, C.V: coeficiente de variación.

*Procedimiento.* Un volumen de muestra de 50 mL se alcaliniza con 0.5 mL de NaOH 10N, tomándose la lectura cuando el valor en mV del potenciómetro es estable. Las muestras deben medirse inmediatamente después de adicionar NaOH para evitar pérdidas de NH<sub>3</sub> por arrastre.

Cálculo de concentración de amonio:

$$\text{Log [ppm]} = (-0.0113) \times [\text{mV}] - (0.0037)$$

*Interferencia:* Las presencia de aminas da resultados falsos, el mercurio y la plata interfieren al formar complejos con el amonio.

### ***Cuantificación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>***

Soluciones requeridas:

*Electrolito de Cromato.* Adicionar 4.6 mL de OFM Anion-BT (Waters) a un matraz volumétrico de 200 mL, posteriormente adicionar 9.2 mL de cromato concentrado (4.2mM) y aforar con agua desionizada.

*Solución estándar de concentración conocida.* 50 ppm de nitrato, nitrito, sulfato y tiosulfato en forma de ión.

Procedimiento:

Filtrar el electrolito y la solución estándar de concentración conocida, utilizando un filtro de membrana de 0.45 µm de tamaño de poro. La muestra problema previamente centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos, se filtra con una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro. Se depositan 0.5 mL de filtrado en un vial Eppendorf, evitando la formación de burbujas.

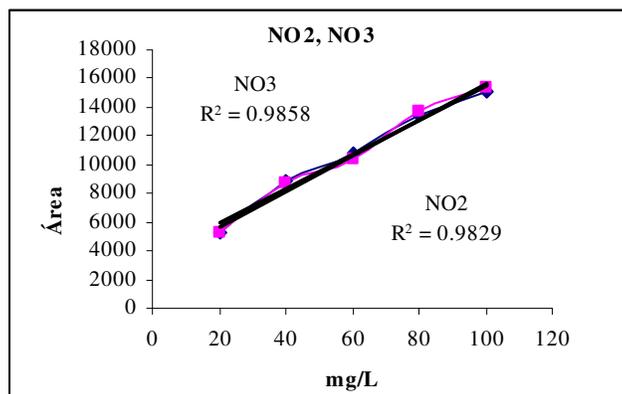
Durante la rutina de análisis en el equipo, después de cada 5 muestras, se incluyó una solución de concentración conocida para determinar el estado de calibración del equipo, a su vez sirve como estándar de referencia par calcular la concentración de la muestra. El análisis se hizo por duplicado.

Cálculos de concentración:

$$\text{ppm del Compuesto} = \frac{((\text{ppm estándar compuesto}) \times (\text{Área muestra}))}{\text{Área estándar compuesto}}$$

Para corroborar la reproducibilidad del método, se emplearon diferentes concentraciones de estándares de nitrato, nitrito, sulfato y tiosulfato (20, 40, 60, 80, y 100 ppm) repitiéndose por

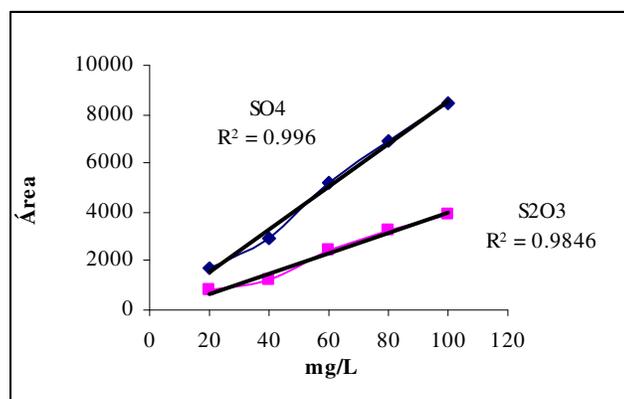
lo menos tres veces la medición. Las soluciones fueron preparadas a partir de una solución patrón de 1000 ppm de nitrato, nitrito, sulfato y tiosulfato. Se construyó una gráfica del valor del área bajo la curva con respecto a la concentración de nitrato y nitrito, encontrándose que la respuesta del método fue lineal (Figura 2 y 3). La medida de reproducibilidad fue mayor que 91% (Tabla 2 y 3).



**Figura 2.** Respuesta (m<sup>2</sup>) para diferentes concentraciones de nitrito y nitrato de 20 a 100 ppm.

**Tabla 2.** Estimadores del área para diferentes concentraciones de nitrito y nitrato.

	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/L				
	20	40	60	80	100
Área promedio	5328.16	8925.17	11136.67	13348.67	15109.33
DS	267.5	52.32	714.49	342.94	449.66
% C.V	<b>5.02</b>	<b>0.59</b>	<b>6.42</b>	<b>2.57</b>	<b>2.98</b>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L				
	20	40	60	80	100
Área promedio	5211.83	8772.67	10910.17	113428.33	15497.67
DS	259.9	160.57	931.35	490.1	416.31
% C.V	<b>4.99</b>	<b>1.83</b>	<b>8.54</b>	<b>3.65</b>	<b>2.69</b>



**Figura 3.** Respuesta ( $m^2$ ) para diferentes concentraciones de sulfato y tiosulfato de 20 a 100 ppm.

**Tabla 3.** Estimadores del área para diferentes concentraciones de sulfato y tiosulfato

	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mg/L</b>				
	20	40	60	80	100
Área promedio	1692.00	3006.67	5087.33	6842.67	8569.00
DS	36.43	7.64	76.05	18.50	30.05
<b>% C.V</b>	<b>2.15</b>	<b>3.98</b>	<b>3.92</b>	<b>2.42</b>	<b>2.28</b>
	<b>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> mg/L</b>				
	20	40	60	80	100
Área promedio	804.33	1198.33	2379.33	3173.33	3969.33
DS	13.01	12.50	6.03	7.64	8.14
<b>% C.V</b>	<b>1.62</b>	<b>4.68</b>	<b>4.06</b>	<b>2.34</b>	<b>3.23</b>

## Compuestos azufrados

### *Cuantificación de azufre elemental*

Soluciones requeridas:

- Solvente de acetona. Mezclar 50 mL de agua destilada con 950 mL de acetona grado reactivo (5% agua, 95% acetona).
- Solución de cianuro de sodio. Disolver 0.1 g de cianuro de sodio en 100 mL del solvente de acetona. Al inicio la solución parece turbia, aclarándose después de algunas horas.

- c) Solución de cloruro férrico. Disolver 0.4 g de cloruro férrico hexahidratado en 100 mL del solvente de acetona. El hierro precipita después de la preparación, por lo que se recomienda dejar reposar el reactivo por 24 horas y decantar el sobrenadante. Esta solución es estable por unas cuantas semanas.
- d) Solución estándar de azufre. Disolver 50 mg de azufre en polvo en 1 L de éter de petróleo para obtener un estándar de 50 ppm.

Procedimiento (para muestras que no contienen mercaptanos, sulfuros o bisulfuros). Tomar 5 mL de muestra y ponerlos en un matraz volumétrico de 25 mL. Si la muestra problema tiene una concentración mayor a 50 ppm, realizar las diluciones necesarias con éter de petróleo para tener un contenido entre 5 y 50 ppm de azufre elemental. Adicionar 15 mL de la solución de cianuro de sodio, mezclar y dejar reposar por dos minutos aproximadamente y aforar con solvente de acetona. Posteriormente tomar una alícuota de 5 mL y adicionarle 5 mL de la solución de cloruro férrico y mezclar. Determinar la absorbancia a 465 nm.

Preparación del blanco: Mezclar 5 mL del solvente de acetona y 5 mL de la solución de cloruro férrico.

Para determinar azufre elemental en muestras de un reactor en condiciones de litotrofia, se toma una alícuota del efluente del reactor y se evaporara el líquido a 100° C, por una hora. El sólido es pulverizado y se pesan aproximadamente 0.04 g que son mezclados en un matraz con 25 mL de éter de petróleo. La relación peso - volumen, representa la concentración del total de sólidos (masa seca) en la alícuota. Se deja en reposo alrededor de 4 horas para permitir la disolución del azufre elemental en el éter. Según la concentración esperada, se toma una alícuota de 5 mL que se pone en solución con el solvente de acetona, para que se lleve a cabo la reacción con cianuro de sodio formándose tiocianato en presencia de azufre que se determina con cloruro férrico midiendo la absorbancia.

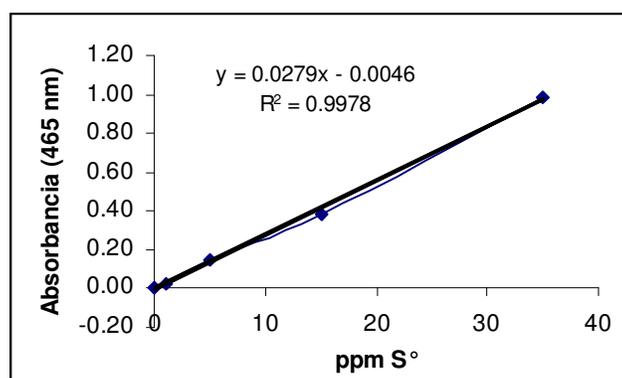
La concentración es obtenida de una curva de calibración preparada con estándares de azufre elemental. Dicha concentración se relaciona con la concentración de sólidos totales para obtener la fracción peso equivalente. Por lo anterior para conocer la concentración total en el reactor, debe conocerse la masa seca de sólidos, determinados como sólidos totales (Standar Methods, 1985).

Además de la preparación de las muestras del reactor, se recomienda preparar una muestra de concentración conocida (20 ppm), una vez determinada la concentración de azufre elemental con la curva patrón y de ser así considerando el factor de dilución, se calcula el porcentaje de azufre elemental en la muestra dada la concentración inicial de sólidos totales.

Se recomienda tomar las lecturas de absorbancia después de 10 minutos de la preparación de las muestras. Si la lectura es hecha más tarde, se deben guardar las soluciones coloridas en total obscuridad. Si la muestra está muy colorida, tomar una corrección del blanco llevando una alícuota (de la muestra problema) a través del procedimiento, con la excepción de que no se le agrega cianuro.

Interferencia. El peróxido, sulfuro, bisulfuro y mercaptano interfieren cuando están presentes en grandes concentraciones.

Para corroborar la reproducibilidad del método, se emplearon diferentes concentraciones de azufre elemental, S<sup>o</sup> (0, 1, 5, 15, y 35 ppm) repitiéndose por lo menos tres veces la medición. . Se construyó una gráfica de la absorbancia respecto a la concentración de S<sup>o</sup>, encontrándose que la respuesta del método fue lineal (Figura 4). La medida de reproducibilidad fue mayor que 95% (Tabla 4).



**Figura 4.** Respuesta (nm) para diferentes concentraciones de S<sup>o</sup> de 0 a 35 ppm.

**Tabla 4.** Estimadores para concentraciones estándar de S<sup>o</sup>.

	S <sup>o</sup> mg/L				
	0	1	5	15	35
Promedio(abs.)	0	0.029	0.146	0.380	0.985
DS	0	0.001	0.007	0.018	0.008
% C.V	<b>0</b>	<b>3.807</b>	<b>4.790</b>	<b>4.714</b>	<b>0.801</b>

## Cuantificación de Sulfuro

Soluciones requeridas:

- a) Solución de tiosulfato de sodio 0.025 N. Calentar y mantener en ebullición por 10 min. 0.7 L de agua destilada. Dejar enfriar y guardar. Pesar 3 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  disolver en el agua destilada previamente preparada aforando a 0.5 L. Guardar en un frasco ámbar y agregar 2 gotas de tolueno como conservador.

Para su valoración; pesar 0.25 g de patrón primario de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  previamente secado a  $100^\circ\text{C}$  por 1h, aforar a 200 mL. Esta solución tiene una normalidad de 0.025N

Procedimiento: En 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, disolver 1.5 g de KI y 1 g de  $\text{NaHCO}_3$ , agregar 20 mL de la solución de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , posteriormente agregar 5 mL de HCl concentrado sin agitar, cubrir y dejar en reposo aproximadamente 10 min. A continuación agregar 0.5 a 1 mL de indicador de almidón y titular con la solución preparada de tiosulfato de sodio. Detener la titulación hasta el punto final, dado por el cambio de color canela a azul ligero.

$$\text{Cálculo: } N - \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \frac{(20 \text{ mL de dicromato}) \times (N_{\text{dicromato}})}{\text{mL de tiosulfato}}$$

- b) Solución de yodo 0.025N. Disolver de 10 – 12.5 g de KI en un volumen pequeño de agua. Adicionar 1.6 g  $\text{I}_2$ , después de disolver el yodo verter en un matraz aforando con 500 mL de agua destilada. Almacenar en un frasco ámbar.

Para su valoración, en un matraz Erlenmeyer poner 20 mL de la solución de yodo. Agregar 1 mL de HCl 3N sin agitar, dejar en reposo de 8 a 10 min. Adicionar un gotero de indicador almidón y titular con la solución de tiosulfato. Registrar el volumen de tiosulfato consumido hasta el vire del color.

$$\text{Cálculo: } N - \text{yodo} = \frac{(N_{\text{tiosulfato}} - V_{\text{tiosulfato}})}{V_{\text{yodo}}}$$

*Indicador de almidón.* Pesar 3 g de almidón soluble y con un pequeño volumen de agua se prepara una emulsión. Verter la emulsión en 500 mL de agua destilada en ebullición, continuar hirviendo por 3 a 5 min., dejar enfriar y sedimentar por 12 h. Recuperar por decantación el

líquido claro sobrenadante. Guardar en un frasco ámbar. Se puede preservar usando 0.8 g de ácido salicílico o unas gotas de tolueno.

*Procedimiento de cuantificación de sulfuro en fase acuosa*, para muestras a analizar inmediatamente. En un matraz Erlenmeyer de 100 mL adicionar 5 mL de solución de yodo, agregar 10 mL de agua destilada y 1 mL de HCL 3N sin agitar. Enseguida medir un volumen (10 mL) de la muestra problema y adicionarlo sin agitar, dejar en reposo por 10 min. y proceder a titular lentamente con la solución de tiosulfato de sodio. Al alcanzar el contenido en el matraz una coloración amarilla adicionar 0.5 a 1 mL del indicador de almidón. Adquirirá una coloración oscura que al continuar la titulación en el punto final cambiará a incoloro o simplemente hasta observar el vire del color violeta-oscuro debido a la reacción del almidón con el yodo.

Nota: Si al agregar la muestra problema el yodo es consumido, adicionar otros 3 mL de yodo. Registrar el volumen total adicionado de este último. En caso de no mantener una coloración residual debida al yodo, es posible que se tenga una muestra con alto contenido de sulfuro por lo que deberá disminuirse el volumen de la muestra.

$$\text{Cálculo: } \frac{mg S^{2-}}{L} = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 16000}{mL_{muestra}}$$

*B*= normalidad de la solución de yodo,

*C*= mL de la solución de tiosulfato,

*D*= normalidad de la solución de tiosulfato

Interferencia. El método yodométrico puede tener interferencias por la presencia de sustancias reductoras que reaccionan con el yoduro, como por ejemplo el tiosulfato, sulfito y varios compuestos orgánicos. La presencia de ciertos metales, como Hg, Cd, Cu, Mo y Fe, puede dar bajos valores por la sal insoluble del sulfuro que se forma. Para eliminar las interferencias de sustancias solubles (sulfito y tiosulfato) se precipita primero el sulfuro con acetato de zinc, se remueve el sobrenadante y se reemplaza con agua destilada. Este procedimiento se puede utilizar también para concentrar el sulfuro.

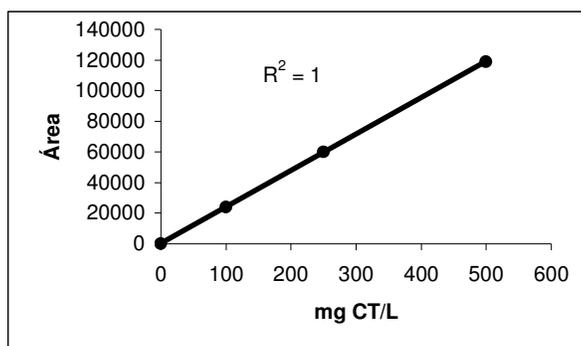
Para corroborar la reproducibilidad del método, se preparó un estándar de concentración conocida. El valor de los estimadores de la respuesta en 3 determinaciones fue, como promedio 11.2 mgS<sup>2</sup>/L, desviación estándar de 1.1 y un coeficiente de variación de 9.82 %.

## Compuestos carbonados

### *Cuantificación de carbono orgánico total*

La muestra se introduce mediante un inyector al tubo de combustión en donde los componentes del carbón total se descomponen. Los productos de la combustión pasan por un analizador de gas infrarrojo en donde es detectado el CO<sub>2</sub> generando como señal un pico cuya área es calculada por un procesador de datos. El área es proporcional a la concentración de carbono en la muestra y es calculada en base a una curva de calibración previamente preparada. Para referencia, el carbono total está compuesto de carbono orgánico y carbono inorgánico.

En la Figura 5, se muestra la curva de calibración para diferentes concentraciones de carbono total, preparados con una solución estándar de pftalato hidrógeno de potasio de concentración equivalente a 1,000 mg C/L.



**Figura 5.** Respuesta (m<sup>2</sup>) para concentraciones estándar de C-total.

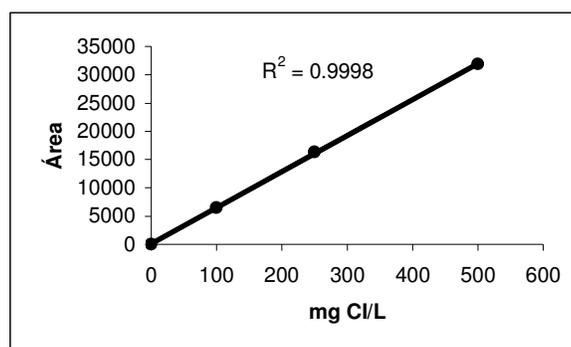
En el intervalo de concentración de 0 a 500 mg CT/L se observó un comportamiento lineal de la respuesta. De acuerdo a los estimadores del área, en general, el coeficiente de variación fue menor a 5 % (Tabla 5).

**Tabla 5.** Estimadores del área para concentraciones estándar de carbono total.

	Estándar C-total, mg/L		
	100	250	500
Área Promedio	6494.67	16305.67	31880.67
DS	87.69	688.93	894.02
<b>%C.V</b>	<b>1.35</b>	<b>4.23</b>	<b>2.80</b>

### *Cuantificación de carbono inorgánico*

En la Figura 6 Se muestra la curva de calibración para diferentes concentraciones de carbono inorgánico, preparados con una solución estándar de bicarbonato de sodio y carbonato de sodio, equivalente a 1,000 mg C/L.

**Figura 6.** Respuesta del analizador total, para concentraciones estándar de C-Inorgánico.

En el intervalo de concentración de 0 a 500 mg CI/L se observó un comportamiento lineal de la respuesta. De acuerdo a los estimadores del área, el coeficiente de variación fue menor que 5 % (Tabla 6).

**Tabla 6.** Estimadores del área para concentraciones estándar de carbono inorgánico.

	C-inorgánico estándar, mg/L		
	100	250	500
Área Promedio	8021	20023.67	39621.33
DS	68.69	926.94	1045.48
<b>%C.V</b>	<b>0.86</b>	<b>4.63</b>	<b>2.64</b>

### ***Cuantificación de acetato***

Soluciones requeridas:

- a) *Pftalato hidrógeno de potasio (5mM)*. Adicionar 5 mL de OFM Anion-BT en un matraz volumétrico de 200 mL, posteriormente adicionar 0.204 g de ftalato hidrógeno de potasio y aforar. Ajustar el pH a 5.6 utilizando una solución de 100 mN de NaOH.
- b) *Solución estándar de concentración conocida* 30 ppm de C-acetato

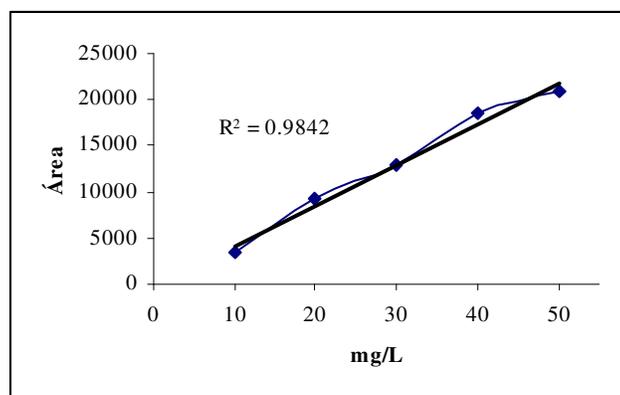
Procedimiento. Filtrar el electrolito y la solución estándar de concentración conocida, utilizando un filtro de membrana de 0.45 µm de tamaño de poro. La muestra problema previamente centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos, se filtra con una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro. Se depositan 0.5 mL de filtrado en un vial Eppendorf.

Durante la rutina del análisis en el equipo, después de cada 5 muestras, se incluyó una solución de concentración conocida para determinar el estado de calibración del equipo, que a su vez sirve como estándar de referencia par calcular la concentración de la muestra. El análisis se hizo por duplicado.

Cálculos de concentración C-acetato:

$$ppm \text{ de } C - \text{acetato} = \frac{[(ppm \text{ estándar } C - \text{acetato}) \times (\text{Área muestra})]}{\text{Área estándar } C - \text{acetato}}$$

Para corroborar la reproducibilidad del método, se emplearon diferentes estándares de C-acetato (10, 20, 30, 40 y 50 ppm) repitiéndose al menos tres veces la medición. Las soluciones fueron preparadas a partir de una solución patrón de 1000 ppm C-acetato. Se construyó una gráfica del valor del área bajo la curva con respecto a la concentración C-acetato, encontrándose que la respuesta del método fue lineal (Figura 7). La medida de reproducibilidad fue mayor a 95% (Tabla 7).



**Figura 7.** Respuesta ( $m^2$ ) para diferentes concentraciones de C-acetato.

**Tabla 7.** Estimadores del área para diferentes concentraciones de C-acetato.

	C-acetato mg/L				
	10	20	30	40	50
Área promedio	3456.00	9257.33	12849.67	18501.00	20854.00
D.S	5.57	13.58	14.05	16.37	24.00
%C.V	<b>0.16</b>	<b>0.15</b>	<b>0.11</b>	<b>0.09</b>	<b>0.12</b>

### **Cuantificación de proteína soluble** (Lowry *et al.*, 1951)

Soluciones requeridas.

*Solución A.* Diluir 20 g  $Na_2CO_3$  en 1 L. de NaOH 0.1 N

*Solución B.* Diluir 1g  $CuSO_4$  en 100 mL de  $H_2O$  destilada

*Solución C.* Diluir 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100 mL de agua destilada.

Albúmina. Disolver 0.03 g de albúmina en 100 mL de agua (Tabla 8)

**Tabla 8.** Curva estándar de concentración de albúmina.

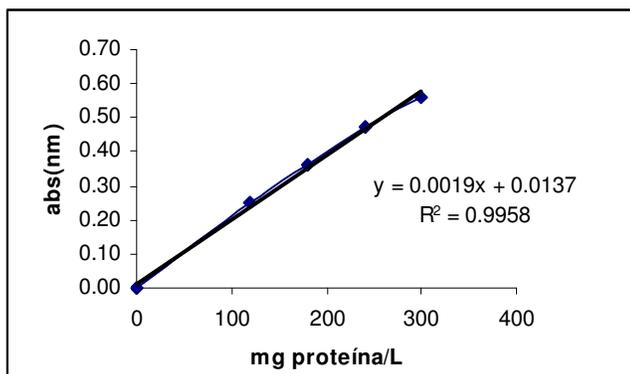
Tubo	Estándar (ml)	Agua destilada (ml)	mg/L
0	0.0	1	0
1	0.4	0.6	120
2	0.6	0.4	180
3	0.8	0.2	240
4	1.0	0.0	300

Procedimiento:

1) Adicionar 1 mL de la muestra en cada tubo, posteriormente 0.1 mL de NaOH 10 N, agitar y calentar los tubos durante 20-30 min. a  $90^\circ C$ .

- 2) preparar la solución D con la siguiente proporción.
  - 1 mL de la solución B
  - 1 mL de la solución C
- 3) Aforar a 50 mL con la solución A.
- 4) Adicionar 5 mL a cada tubo, agitar y dejar reposar en la oscuridad (30 min.).
- 5) Adicionar 1 mL de reactivo folin sin diluir, agitar vigorosamente y dejar reposar en la oscuridad durante 2 horas.
- 6) Medir la absorbancia de las muestras a 750 nm.
- 7) Por interpolación lineal se obtendrá la concentración de la muestra.

Para corroborar la reproducibilidad del método, se emplearon diferentes estándares de proteína (120, 180, 240, 300 ppm) repitiéndose tres veces la medición. Se construyó una gráfica del valor de la absorbancia con respecto a la concentración de proteína, encontrándose que la respuesta del método fue lineal (Figura 8). La medida de reproducibilidad fue mayor que 95% (Tabla 9).



**Figura 8.** Respuesta (nm.) para diferentes concentraciones de proteína; de 120 a 300 ppm

**Tabla 9.** Estimadores de la absorbancia para diferentes concentraciones de proteína.

mg proteína/L	120	180	240	300
Promedio (abs)	0.25	0.36	0.47	0.56
D.S	0	0.02	0.01	0.01
<b>%C.V</b>	<b>0.54</b>	<b>4.55</b>	<b>2.93</b>	<b>1.71</b>

### ***Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)***

Los crisoles se ponen a peso constante, posteriormente un volumen de 10 mL de muestra homogénea se deposita en el crisol y se evapora el líquido en una parrilla a baja temperatura, antes de alcanzar la evaporación total, para evitar pérdidas. Los crisoles se transfieren a una estufa a 105° C por una hora, y una vez transcurrido el tiempo se colocan en un desecador por 15 min. De aquí se pesan y se obtiene el contenido de sólidos suspendidos totales. A continuación, la muestra se transfiere a una mufla a 550° C durante 30-45 min. y se obtienen los sólidos suspendidos fijos.

La concentración de sólidos totales, se calcula de la siguiente forma.

$$\frac{g \text{ SST}}{L} = \frac{(B - A)}{V}$$

Donde A = peso del crisol en gramos.

B = peso del crisol + residuo (g)

V = volumen de muestra (L)

Los sólidos suspendidos fijos (SSF).

$$\frac{g \text{ SSF}}{L} = \frac{(C - A)}{V}$$

A = peso de crisol (g)

C = peso del crisol + residuo (g)

V = volumen de la muestra (L).

Y por diferencia se obtienen los sólidos suspendidos volátiles.

$$\frac{g \text{ SSV}}{L} = SST - SSF$$

### ***Cuantificación de sólidos volátiles inmovilizados (SVI)***

En una probeta de 100 mL de tipo cola de rata se adicionan 5 mL de soporte con biomasa inmovilizada, posteriormente se adiciona agua destilada para retirar los sólidos suspendidos o sedimentables que estuvieran presentes en la muestra, drenándolos por la parte inferior de la probeta. Posteriormente se toman con una espátula los 5 mL del soporte y se introducen en una botella serológica adicionando 20 mL de agua destilada, esta se tapa y se sella con un

arillo metálico. La botella se sonica durante 5 minutos, después de este tiempo con una jeringa de 10 mL se extrae la fase líquida, y se filtra (utilizando filtros Whatman de fibra de vidrio de 55 mm de diámetro) con una bomba de vacío. Estos son secados en una mufla durante 30 minutos a una temperatura de 550 °C, una vez fríos se registra el peso constante.

Este procedimiento se repite hasta que el soporte se encuentre libre de biomasa. Al final el soporte se seca en la estufa a una temperatura de 55 °C, y se pesa.

*Sólidos Totales.* Los filtros utilizados se secan en una estufa a 100 °C durante 60 minutos, se enfrían y se pesan.

Cálculos:

$$mgST = A - B$$

Donde:

$mgST$  = miligramos de sólidos totales

$A$  = Peso del filtro + muestra seca.

$B$  = Peso del filtro sin muestra

*Sólidos Fijos.* Una vez secados los filtros se calcinan en la mufla a 550 °C durante 30 minutos, se enfrían y se registra su peso.

Cálculos:

$$mgSF = C - B$$

Donde:

$C$  = Peso del filtro + muestra calcinada.

*Sólidos volátiles inmovilizados.*

$$mg\ SVI = ST - SF$$

La biomasa inmovilizada se reporta como Kg. de SVI/m<sup>3</sup> de soporte seco.

## **7. BIBLIOGRAFÍA.**

## 7. Bibliografía

Achtnich, C., Bak, F., Conrad, R. (1995). Competitions for electron donor among nitrate reducers, ferric iron reducer, sulfate reducer and methanogens in anoxic paddy. *Biol. Fertil. Soils*. 19:65-72.

Akunna, J. C., Bizeau, C. and Moletta, R. (1993). Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Wat. Res.* 27, 1303-1312.

Akunna, J. C., C. Bizeau and R. Moletta. (1994) Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: Ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Technol.* 15:41-49.

Alcántara, S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfooxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

American Society for Testing Materials (1992). ASTM-D 1426-89. Standard Methods for Ammonia Nitrogen in Water. Test Method B: Selective Ion Electrode. Annual Book of ASTM Standards. 11.01: 331-333

Annachatre A. y Suktrakoolvait S. (2001) Biological sulfide oxidation in a fluidized bed reactor. Environmental engineering Program, Aisan Institute of Technology, Pathumthani, Thailand. *Environ. Technol.*, 22 (6): 661-672.

Andrew, C., J, Han, S. de Vries, J. van de Oost, B. Averill, T. Loehr and J. Sanders-Loehr. (1994). CuA of cytochrome c oxidase and the A site of N<sub>2</sub>O reductase are tetrahedrally distorted type 1 Cu cysteinates. *J. Am. Chem. Soc.* 116:10805-10806

APHA (1985). Standard methods for examination of water and wastewater, 16<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Barret, E. and Clark, M.A (1987) Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiological Reviews* 51, 192-205

Bartlett, J.K., Skoog. D.A.(1954). Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. *Analytical chemistry* 26:6. 1008-11.

Barrenstein. A., Kramer, U., Obermann, P. (1986). Underground treatment of nitrate rich groundwater by infiltration with treated wastewater or methane rich natural gas. *DVGW-Schriftreihe, Wasser*. Frankfurt, Germany. 116:99-116.

- Bernet, N., Bizeau, C., Moletta, R., Corner, J. C., Deguin, A. (1995). Study of physicochemical factors controlling nitrite build-up during heterotrophic denitrification. *Environ. Technol.* 16:165-172.
- Carr, G. and S. Ferguson. (1990). The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 269:423-429
- Chang R. (1998). Ácidos y bases. En: Química. 6ª Ed. Mcgraw Hill. Cap. 15 pp. 616-624
- Characklis, W.G., (1990) Biofilm processes. In: Characklis, W.G., Marshall, K.C (Eds.), Biofilms. Wiley, New York.
- Cervantes, F., Monroy, O., Gómez, J. (1999). Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Applied Biochem and Biotech.* 81:13-22.
- Cervantes, F., Pérez, J., Gómez, J. (2000). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 42:73-82
- Cuervo-López F., Martínez, F., Gutierrez-Rojas, M., Noyola. R. A., Gómez, J. (1999). Effect of nitrogen loading rater and carbon source on denitrification sludge settles ability in upflow anaerobic sludgsblanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* 40(8):123-130.
- Christtensen, M.H and Harremoes, P. (1977) Biological denitrification of sewage: a literature review. *Prog. Water Technol.* 8: 509-555
- Cooper, P. F. (1981). The use of biological fluidised beds for the treatment of domestic and industrial watewaters. *Chem. Eng.* 371, 373-376.
- Cooper, P.F., Sutton, P.M. (1983). Treatment of watewaters using biological fluidized beds. *Chem. Eng.* 392, 392.
- Delwiche, C.C and Bryan, B.A. (1976). Denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.* 30: 241-262.
- Fass. S., Ganaye, V., Urbain, V., Manem, J., Block, J.C. (1994). Volatile fatty acids as organic carbon sources in denitrification. *Environ. Tech.* 15: 459-467.
- Ferguson, S. 1994. Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* 66:89-110
- Fleming, C. H. (1995).Sortion Sites in Biofilms. International IAWQ Conference Workshop Biofilm Structure, Growth and Dynamics Need for New Concepts. 30 august-1 september. Noordwijkerhout, the Netherlands. Pp: 13-20.
- Foroulis, Z.A (1993). Role of solution pH on wet H<sub>2</sub>S cracking in hydrocarbon production. *Corrosion. Prevent. & Control.* August.

Fulop, V., J. Moir, S. Ferguson and J. Hajdu. 1995. The anatomy of bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd 1. *Cell* 31:369-377

García-Calderon D., Buffiere P., Moletta R. and Elmaleh S. (1998a). Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in downflow fluidized bed. *Water Res.* 32(12), 3593-3600.

Godden, J., S. Turley, D. Teller, E. Adman, M. Liu, W. Payne and J. Legall. (1991). The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* 253:438-442.

Gommers, P. J., Buleveld, W., Zuiderwijk, F.J., Kuenen, J. Gijs. (1988a). simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Wat. Res.* 22: (9). 1075-1083.

Goretski, J. and T.C. Hollocher. 1990. The Kinetic and isotopic competence of nitric oxide as an intermediate in denitrification. *J. Biol. Chem.* 265:889-895.

Günter C., Hans J.K. (1985). Physiology and Kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 283-288

Halling-Sorensen B. And Jorgensen, S. (1993). Process chemistry and biochemistry of denitrification. In: the removal of nitrogen compounds form wastewater. Eds. Elsevier, Netherlands. Pp. 119-152.

Harper D. (1992). *Eutrophication of freshwaters: principles, problems and restoration*. First edition. Ed: CHAPMAN & HALL. pp. 5-16,31 London.

Hedderich, R., Klimmek, O., Kroger, A., Dirmeier, R., Keller, M. and Stetter, K.O. (1998) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *Fems Microbiol. Rev.* 22, 353-381.

Hendriksen, H.V. and Ahring, B.K. (1996). Integrate removal of nitrate and carbon in and upflow anaerobic sludge blanket (UASB) rector: operating performance. *Wat. Res.* 30:(6). 1451-1458.

Hong Z., K. Hanaki and T. Matsuo. (1994). Greenhouse gas- N<sub>2</sub>O production during denitrification in wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 28:203-207

Janssen A. y Webb C. (1995) Treatment of H<sub>2</sub>S-containing gases: a review of microbiological alternatives. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 2-10.

Hooper A, DiSpirito A (1985). In bacteria which grow on simple reductans, generation of a proton gradient involves extracitoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev.* 49(2), 140-157.

Janssen A (1996) Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from biological oxidation of hydrogenosulfide. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.

Janssen, A.J.H, Ma, S.C., Lens, P. and Lettinga, G. (1997). Performance of a sulphide-oxidizing expanded bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnology and Bioengineering* 53(1), 32-40.

Janssen, A.J.H, Meijer, S., Bontsema, J. and Lettinga, G. (1998). Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotech. Bioeng.* 60, 147-155

Jetten, M., S. Horn and M. van Loosdrecht. 1997. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Water Sci. Technol.* 35:171-180

Juana B. Eweis, Sarina J. Ergas. Daniel P.Y. Chang , Edward D. Schroeder (2000). Principios de Biorrecuperación. *Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos.* Mcgraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. pp. 124.

Kelly D, Shergill J, Lu W, Wood A (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71, 195-107

Kelly D. P. Harrison A.P. (1989). Genus *Thiobacillus* Beijerinck 1904b, 597. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore

Kim I. And Son J. (2000). Impact de COD/N/S ratio on denitrification by the mixed cultures of sulfate reducing bacteria and sulfur denitrifying bacteria. *Water Science and Technology* Vol. 42 No. 3-4 pp 69-76.

Kroneck, P. M. M., J. Beuerle and R.W. Schumacher. 1992. Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, p. 455-505. In: H. Siegel and A. Siegel (ed.). Metal ions in biological systems, v. 28. Marcel Dekker, U.S.A.

Kunni D. and Levenspiel O. (1991). *Fluidization Engineering.* 2a edición. Butterworth-Heinemann. Pp 1-2. London.

Li, S.F.Y. (1993). Capillary electrophoresis- principle, practice and applications. Elsevier, Netherlands. Pp.797

Lens, P.N.L. and Hulshoff Pol, L.W. (2000) *Environmental Technologies To Treat Sulfur Pollution.* First edition. Ed: IWA publishing. pp. 49-51 London.

Lens P. and Kuenen J. (2001) The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Wat. Sci. and Tech.* 44 (8) 57-66.

Lesley, A., Robertson, L. A., Kuenen J. G. (1992) The colorless sulfur bacteria. In: *The Prokaryotes.* 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag. I:16. pp. 385-412.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Madigan M.T. Martinko J. M & Parker J. (1998). Cap. 13. Diversidad metabólica de los microorganismos y Cap. 16. Diversidad procariótica: Dominio bacteria. *En Brock Biología de los microorganismos*. Editorial Prentice Hall, Inc. Pp 494, 636-637, 661-664.

Matejů, V., Cizinská, S., Krejčí, J., Janoch, T. (1992). Biological water denitrification a review. *Enzyme Microb. Tech.* 14. 170-183.

Matthew, A. and Scout, J. (2000). Adhesion bacterial. *Encyclopedia of Microbiology. Volumen I*. second edition. pp. 42-51

Meier-Schneiders M, Busch C and Diekert G. (1993). The attachment of bacterial cells to surfaces under anaerobic conditions. *Applied Microbiol Biotech.* 38:667-673.

Meraz, M., O. Monroy., A. Noyola and K. Ilangovan (1995). Studies on the Dynamics of Immobilization of Anaerobic Bacteria on a Plastic Support. *Wat. Sci. Tech.* 32(8): 243-249.

Nikolov L. and Karamanev D. (1987) Experimental study of the inverse fluidized bed biofilm reactor. *The Can. J. Chem. Engng* 65, 214-217

Oliver, J., Jin, M., Li, H., and Buglass, L. (1996) Sulfate-Reducing Bacteria. *Critical Reviews in Environmental science and technology.* 26(1):155-187.

Ongcharit, C, Dauben P, Sublette K . (1989) Immobilization of an autotrophic bacterium by coculture with floc forming heterotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1077-1080.

Prange, A., Arzberger, I., Engemann, C., Modrow, H., Schumann, O., Trüper, H.G., Steudel, R., Dahl, C. and Hormes, J. (1999) In situ analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.*

Pérez T.J. (1998). Estudio y Evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México.

Revah S, Acosta M, Hugler W, Trinidad R, Avila C, Estrada I, Hinojosa A, (1995) Air Biodesulfuration from Viscose Plants: Carbon Disulfide Elimination, Conference on Biofiltración (an Air pollution Control Technology), Los Angeles, California, Oct. 5-6.

Robertson L, Kuenen J. (1992) The colorless sulfur bacteria, In: Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder H, Schleifer K (eds) The prokaryotes, vol. 1, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp.385-413.

Reyes-Ávila, R. J. (2000). Eliminación biológica simultánea de nitrógeno, carbono y azufre, por desnitrificación. Tesis de la maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

Reyes-Ávila J; Razo-Flores E. and Gómez J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification . *Wat. Res.* (en prensa)

Schedel M, Truper H. (1979). Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties. *Biochim. Biophys Acta.*56, 454-467.

Schmidt, M. (1984) Chemical problems of flue-gas desulfurization, in: *Sulfur, its significance for chemistry, for the geo-, bio- and cosmosphere and technology* (Ed: Müller, A. and Krebs, B.) pp. 259-276, Elsevier, Amsterdam.

Shimadzu Co. Instruction manual. Total Organic Carbon Analyzer, Model TOC-5000A.

Stetter, K.O. and Gaag, G. (1983). Reduction of molecular sulfur by methanogenic bacteria. *Nature* 305, 309-311.

Stefess G, Torremans A, Schrijver R, Robertson L, Kuenen J (1996) Quantitative measurement of sulphur formation by steady-state and transient-state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species. *App. Microbiol. Biotechnol.* 45, 169-175.

Stouthamer, A.H. (1988). Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds, p. 245-303. In: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms* Wiley-Liss, New York.

Sublette K., Sylvester N. (1987). Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of natural gas. *Biotech. and Bioeng.* 29:249-257

Sublette K, Ravindra K., Raterman K. (1998). Technological aspects of the microbial treatment of sulfide-rich wastewaters: a case study. *Biodegradation.* 9:259-271.

Sutton, P.M., Mishra, P.N. (1990). Fluidized bed biological wastewater treatment: effects of scale-up on system performance. In: P.M. Sutton and Associates, *Biological Fluidized Beds for Water and Wastewaters Treatment: a User's Forum*. Conference Proceedings, Ann Arbor, pp. 1-12.

Van Loosdrecht M.C.M, D. Eikelboom, A. Gjaltema, A. Mulder, L. Tjihuis and J. Heijnen (1995). Sortion Sites in Biofilms. International IAWQ Conference Workshop Biofilm Structure, Growth and Dynamics Need for New Concepts. 30 august-1 september. Noordwijkerhout, the Netherlands. Pp: 21-28.

Varian Associates, Inc. (1996). User's Guide. Varian Gas Chromatographs.

Zumft, W.G. (1997). Cell Biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular biology reviews*. 61(4): 533-616