



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**ELIMINACIÓN SIMULTÁNEA DE *p*-CRESOL, NITRATO Y SULFURO POR
DESNITRIFICACIÓN LITOTRÓFICA-ORGANOTRÓFICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

FERNANDA A. GUERRERO BAQUEDANO

DIRECTOR

CO-DIRECTOR

DR. JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ

DR. ELÍAS RAZO FLORES

UAM-IZTAPALAPA

IPICYT

México, D.F.

Abril, 2007.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Microbiana del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y en laboratorios del Departamento de Química e Ingeniería Ambiental de la Universidad de Arizona en Tucson con recursos del proyecto “Simultaneous biological removal of C, N and S from refinery effluents by denitrification: A technological approach” dentro del convenio NSF-CONACYT No. 35982-U

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O.

Iztapalapa, D.F. a 16 de abril de 2007.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis
**ELIMINACIÓN SIMULTÁNEA DE *p*-CRESOL, NITRATO Y SULFURO POR
DESNITRIFICACIÓN LITOTRÓFICA-ORGANOTRÓFICA**

Que presentó

FERNANDA A. GUERRERO BAQUEDANO

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge G. Gómez Hernández

Co-Director: Dr. Elías Razo Flores.

Jurado:

Presidente: Dra. Flor de María Cuervo López. _____

Secretaria: Dra. Anne-Claire Texier. _____

Vocal: Dra. Patricia Olguín Lora. _____

Vocal: Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo. _____

Agradecimientos

A los doctores Jorge Gómez y Elías Razo por su apoyo, paciencia y por compartir sus conocimientos y experiencia que me guiaron durante el proceso.

A Jesús Reyes por su invaluable ayuda y consejos.

A todos mis compañeros del Laboratorio W-103 por la convivencia y el trabajo de todos los días, especialmente a Armando, Emir, Anne Claire, Flor, Felipe, Sergio, Alejandro, Ricardo, Arturo.

A los doctores Reyes Sierra y Jim Field por su amistad y conducción, son para mí un ejemplo a seguir.

A los compañeros del Departamento de Química e Ingeniería Ambiental, Irail, Sri, Peter, Jeremy, Umur por los momentos de trabajo y experiencias que compartimos.

Al Ing. Guillermo Fernández de la Garza de quien he aprendido valores importantes para el desempeño de mi trabajo y por creer en mí.

A mis padres, familia y amigos quienes siempre han estado a mi lado.

***A mi esposo por su amor, comprensión
y apoyo incondicionales.***

***A Raziel quien me inspiró y
reconfortó en los momentos difíciles.***

A mis padres y a Sandy mi hermana y amiga.

INDICE

Resumen	1
Summary	2
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Contaminación del agua	3
1.2 Ciclo del nitrógeno	6
1.2.1. Nitrificación	6
1.2.2. Desnitrificación	7
1.3.1. Química del azufre	14
1.3.2. Ciclo biológico del azufre	16
1.3.2.1. Reducción desasimilativa de compuestos oxidados del azufre	17
1.3.2.2. Oxidación desasimilativa de compuestos reducidos del azufre	18
1.3.2.3. Modelos propuestos para explicar las vías de oxidación del azufre	20
Capítulo 2.	
2.1 Antecedentes	23
2.2 Justificación	24
2.3 Objetivo general	24
2.3.1. Objetivos particulares	25
Capítulo 3. Materiales y Métodos	
3.1. Metodología	26
3.2. Condiciones de operación	27
3.3. Técnicas analíticas	32
Capítulo 4. Resultados y Discusión	
4.1. Etapa 1.Reactor de tanque agitado	38
4.2 .Etapa 2. Reactores UASB	50
4.3. Etapa 3.Pruebas en lote para el estudio de la toxicidad del sulfuro	57
4.4. Etapa 3. Pruebas en lote con <i>p</i> -cresol y sulfuro	63
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones	67
Bibliografía	69

Anexo. Artículo.

Comparison of chemo-hetero- and mixotrophic denitrification in laboratory-scale UASBs. Sierra R., Guerrero F., Rowlette P., Freeman S. Field J. (2005). *Water Science and Technology*. **52**: (1-2). 337-342.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales compuestos presentes en las aguas amargas producidas durante la refinación del petróleo	5
Tabla 2 Estados de oxidación del azufre	15
Tabla 3 Composición del medio de cultivo inicial. Reactor de tanque agitado	28
Tabla 4 Velocidad de carga de sulfuro, acetato y bicarbonato para las diferentes fases en el reactor de tanque agitado	29
Tabla 5 Concentración en el medio de cultivo de nitrato, sulfuro y <i>p</i> -cresol en los reactores UASB 1, 2 y 3	30
Tabla 6 Velocidades de carga del nitrógeno, sulfuro y carbono aplicadas a los reactores UASB 1, 2 y 3	31
Tabla 7 Eficiencias y rendimientos en el reactor de tanque agitado de los compuestos del azufre bajo condiciones desnitrificantes lito-organotróficas	40
Tabla 8 Eficiencia de eliminación de nitrato y acetato, rendimientos compuestos del nitrógeno en el reactor de tanque agitado condiciones desnitrificantes lito-organotróficas	41
Tabla 9 Eficiencias de eliminación de nitrato y sulfuro, rendimiento de N ₂ y sulfato para los reactores UASB 1, 2 y 3	56
Tabla 10 Velocidades específicas de consumo de sulfuro, nitrato y nitrito pruebas en lote con 40, 70 y 225 mg S ²⁻ /L	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biológico del nitrógeno	6
Figura 2 Pasos de la desnitrificación	7
Figura 3 Vía periférica anaerobia de oxidación del <i>p</i> -cresol	10
Figura 4 Ciclo biológico del azufre	17
Figura 5 Árbol filogenético procariotes que oxidan el azufre en base a la secuencia 16S del ARN ribosomal	19
Figura 6 Vía ramificada de oxidación del tiosulfato	21
Figura 7 Reactor de tanque agitado	27
Figura 8 Reactor UASB	29
Figura 9 Reactor de tanque agitado en condiciones lito-organotróficas Perfil de velocidad de los compuestos nitrogenados en las fases I, II, III, IV y V	39
Figura 10 Reactor de tanque agitado en condiciones lito-organotróficas durante las fases I, II, III, IV, V. Valores de rendimiento en la producción de nitrógeno	40
Figura 11 Porcentaje de compuestos del nitrógeno en el reactor UASB 1	51
Figura 12 Porcentaje de los compuestos del azufre en el reactor UASB 1	52
Figura 13 Porcentaje compuestos del azufre en el reactor UASB 2	55
Figura 14 Prueba en lote 1 {40 mg S ²⁻ /L}. Perfil de los compuestos del Azufre	58
Figura 15 Prueba en lote 1 {40 mg S ²⁻ /L}. Perfil de compuestos del Nitrógeno	58
Figura 16 Prueba en lote 2 {70 mg S ²⁻ /L}. Perfil compuestos del azufre	59
Figura 17 Prueba en lote 2 {70 mg S ²⁻ /L}. Perfil compuestos del nitrógeno	60

Figura 18 Prueba en lote 3 {225 mg S ₂ -/L}. Concentración de compuestos del azufre en el tiempo	61
Figura 19 Prueba en lote 3 {225 mg S ₂ -/L}. Concentración de compuestos del nitrógeno en el tiempo	61
Figura 20 Perfil del consumo de sulfuro en el tiempo. Tratamiento 1: sulfuro y nitrato	64
Figura 21 Perfil del consumo de <i>p</i> -cresol en el tiempo. Tratamiento 2: sulfuro, <i>p</i> -cresol y nitrato	65

RESUMEN

En algunos efluentes de la refinación y transformación del petróleo (aguas amargas) es común encontrar concentraciones altas de sulfuro junto con compuestos orgánicos y nitrogenados. De las distintas opciones que existen para el tratamiento y eliminación de los contaminantes, los métodos biológicos tienen la ventaja de ser eficientes y a través de su manejo adecuado, los productos finales pueden ser más compatibles con el ambiente y los sistemas ecológicos.

Para este proyecto se seleccionó a la desnitrificación como una opción para eliminar nitrato, sulfuro y materia orgánica en forma simultánea de aguas amargas sintéticas. Se llevaron a cabo pruebas en continuo y en lote. Para el trabajo en continuo se utilizó un reactor de tanque agitado, teniendo como referencia al consorcio en estado estacionario, en condiciones desnitrificantes con acetato (a una relación C/N estequiométrica). El trabajo consistió en disminuir gradualmente la velocidad de carga del acetato, sustituyéndola con el sulfuro necesario para reducir biológicamente al nitrato presente. Se trabajó a una relación S/N estequiométrica para oxidar el sulfuro hasta sulfato, presentándose períodos oscilatorios en la producción de éste último; se detectó también azufre elemental y en menor proporción tiosulfato. En todos los casos, las eficiencias de eliminación de los compuestos de interés (nitrato, acetato, sulfuro) fueron mayores que 90%. Al aumentar gradualmente la velocidad volumétrica de sulfuro, el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular disminuyó hasta tener aproximadamente 50% del nitrato consumido como nitrito y transitoriamente se detectó óxido nitroso.

Se operaron también 3 reactores UASB: R1 en condiciones desnitrificantes litotróficas con sulfuro, R2 en condiciones de lito-organotrofia con sulfuro y *p*-cresol y R3 en condiciones organotróficas con *p*-cresol. Para los tres reactores se alcanzaron eficiencias de eliminación mayores que 90%. En los tres casos se manejaron relaciones estequiométricas y para R2 el nitrato se encontraba en forma limitada. En R1 la producción de sulfato presentó un patrón oscilatorio representando en promedio el 56% del sulfuro consumido. La desnitrificación no se llevó a cabo en forma completa detectándose nitrito en el efluente. En R2 una parte del sulfuro consumido fue oxidado hasta sulfato (67%), se detectó acetato como intermediario de la oxidación del *p*-cresol, y el producto final de la desnitrificación fue N₂. En el caso de R3 no se detectaron intermediarios de la desnitrificación; sin embargo, se detectó acetato en el efluente.

Se realizaron pruebas en lote para estudiar el posible efecto tóxico del sulfuro (40, 70 y 225 mg S²⁻/L). Los resultados indicaron que el aumento en la concentración inicial de sulfuro produce un efecto inhibitorio en el cultivo afectando la velocidad específica de consumo del sulfuro, nitrato y nitrito. Con la mayor concentración probada (225 mg S²⁻/L) se detectaron intermediarios de la desnitrificación (nitrito y óxido nitroso) por un tiempo prolongado en comparación con las concentraciones menores.

Para analizar la competencia entre el sulfuro y *p*-cresol presentes en forma simultánea en un proceso desnitrificante, se llevaron a cabo pruebas en lote (sulfuro, sulfuro/*p*-cresol y *p*-cresol). Los resultados indicaron que el consumo del sulfuro no se ve afectado por la presencia de *p*-cresol, siendo el sulfuro el sustrato que se consume más rápidamente.

SUMMARY

The effluents coming from the petroleum refineries (sour water) contain sulfide, ammonium and phenols among other contaminants. If we compare the different options for treatment and removal the contaminants, the biological methods have the advantage to be efficient and, if properly managed, their final products are environment friendly and minimize the ecological impact.

For this project denitrification was chosen as an option to remove simultaneously nitrate, sulfide and organic matter using synthetic sour water. Continuous and batch cultures were carried out. The continuous experiment was performed in a continuous stirred tank reactor; the point of reference was the culture in steady-state denitrifying conditions with acetate (C/N stoichiometric ratio). Afterwards the acetate load was gradually reduced and at the same time the sulfide load was increased to reduce the nitrate. An S/N stoichiometric ratio was considered to oxidize sulfide to sulfate, oscillatory periods of sulfate production were detected as well as sulfur periods of accumulation and consumption. Additionally thiosulfate was detected but in less proportion. In all cases removal efficiencies were higher than 90% for the target contaminants (nitrate, acetate, sulfide). Increasing sulfide load resulted in molecular nitrogen reduction as 50% of the consumed nitrate was reduced to nitrite and N₂O was temporarily detected.

Three UASB denitrifying reactors were run in parallel: R1 operated under chemolithoautotrophic conditions with sulfide, R2 under litho-organotrophic conditions with sulfide and *p*-cresol and R3 under organotrophic conditions with *p*-cresol. For all the reactors the removal efficiencies were higher than 90%. Stoichiometric ratios were considered for all three reactors and in R2 nitrate was the limited substrate. R1 had an oscillatory sulfate production representing an average of 56% of the consumed sulfide, denitrification was incomplete and nitrite was detected in the effluent. In R2 67% of the consumed sulfide was oxidized to sulfate, acetate was detected as an intermediary of the *p*-cresol oxidation and a large fraction of the nitrate removal was recovered as N₂. In R3 no denitrification intermediates were detected but acetate was present in the effluent.

Batch assays to study possible sulfide toxic effect were conducted (40, 70 y 225 mg S²⁻/L). The results showed that increasing sulfide concentration causes an inhibitory effect over the culture, affecting mainly the specific consumption rates. With the highest concentration (225 mg S²⁻/L) some denitrification intermediates were detected (nitrite, nitrous oxide) over a long period of time compared with lower concentrations.

In order to analyze the competition between sulfide and *p*-cresol in a denitrification process, 3 batch assays were run (sulfide, sulfide/*p*-cresol and *p*-cresol). The results pointed out that sulfide consumption was not affected by *p*-cresol, sulfide was consumed faster compared with *p*-cresol.

CAPÍTULO 1

1. Introducción

1.1. Contaminación del agua

El agua es un recurso natural indispensable que escasea cada vez más como resultado de su creciente demanda para el suministro de las poblaciones, su uso en la agricultura y en las actividades industriales y, por otro lado, la contaminación de este recurso, derivada de los usos antes mencionados.

En México, de acuerdo a una clasificación hecha por la Comisión para el Desarrollo Sustentable de la ONU, las zonas del centro, norte y noroeste del país se encuentran en el índice más crítico en donde el agua se convierte en un elemento sujeto a alta presión y limitante del desarrollo. A nivel nacional, los sectores que consumen una mayor proporción de agua son: sector agrícola 78%, uso público urbano 12%, industrial 8% y pecuario 2% (Programa Nacional Hidráulico 2001-2006). El volumen que se destina para uso industrial es relativamente pequeño, pero es de especial interés por la concentración y diversidad de contaminantes que descargan algunas industrias. Los aportes de carga contaminante están concentrados en un número limitado de actividades, entre las que destacan la industria azucarera, la fabricación de alcohol y bebidas alcohólicas, la industria del papel y celulosa, química, petrolera, alimenticia y las actividades agropecuarias, principalmente porcícola y beneficio del café, además de los giros de minería, metalmecánica y textil (Programa Nacional Hidráulico 2001-2006).

Como producto de la contaminación, el agua puede presentar alteraciones físicas importantes como son: color (debido a sustancias orgánicas y compuestos de hierro), olor y sabor (debida a compuestos químicos como fenoles, cloro, materia orgánica en descomposición, etc.), temperatura, pH, conductividad, entre otras.

En cuanto a la contaminación de origen químico, esta puede deberse tanto a productos orgánicos como inorgánicos. El aspecto fundamental de la contaminación por compuestos orgánicos es la disminución del oxígeno disuelto como consecuencia de su consumo durante la oxidación de los contaminantes. La importancia de los contaminantes inorgánicos radica principalmente en su efecto tóxico hacia los microorganismos.

Los contaminantes como el nitrato y el fósforo son de especial interés, ya que en concentraciones excesivas aceleran la eutrofización de los cuerpos receptores (Yang y Zhang 1995); es decir, el crecimiento de las algas verdes cianofíceas, impidiendo con esto la oxigenación del agua.

Para preservar la calidad de los cuerpos receptores, el marco legal está definido en forma conjunta por la Ley de Aguas Nacionales y las normas oficiales mexicanas. La NOM-001-ECOL-1996 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales. La norma oficial mexicana NOM-CCA-031-ECOL/1993 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicios y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal.

Para lograr los estándares de calidad del agua residual que será vertida en los cuerpos receptores, se tienen las siguientes alternativas para el tratamiento:

a) sistemas físicos y químicos y b) sistemas biológicos. Los métodos físicos incluyen el tamizado, sedimentación, filtración y flotación. Los químicos incluyen la desinfección, absorción y precipitación. Los procesos biológicos pueden dividirse en aerobios y anaerobios (Yang y Zhang 1995). Los procesos biológicos tienen la ventaja de ser efectivos y proporcionan una verdadera biodegradación de la sustancia que se desea eliminar, ya que con los métodos físicos y químicos los

contaminantes se concentran para ser dispuestos posteriormente en otro lugar (Cervantes y col. 2000).

Las aguas residuales que se producen en algunos procesos de la refinación del petróleo tales como las aguas amargas, contienen elevadas concentraciones de sulfuro, nitrógeno y derivados fenólicos, entre otros contaminantes, como se observa en la Tabla 1, lo que constituye un problema de contaminación. El sulfuro (Sublette y col. 1998) y los derivados fenólicos (Autenrieth y col. 1991 en Veeresh y col. 2005) son compuestos tóxicos.

Tabla 1. Principales compuestos presentes en las aguas amargas producidas durante la refinación del petróleo (Berné y Cordonnier, 1995). (pH 8 – 9.5)

Compuesto	Concentración (mg/L)
<i>HS⁻, RSH</i>	500-3000
<i>NH₄</i>	300-3000
<i>Fenoles</i>	80-300
<i>HC</i>	5-60
<i>CN⁻</i>	5-200

RSH (Sales de bisulfuro, ejemplo: bisulfuro de amonio HNH₄S)
HC (Hidrocarburos)

Una alternativa para el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria petroquímica son los procesos biológicos. En el caso particular de los ciclos biológicos del nitrógeno y del azufre, han sido estudiados y descritos con detalle; también, se tiene información sobre las rutas de la biodegradación del carbono orgánico y del acoplamiento entre los ciclos como carbono-nitrógeno y carbono-azufre. Sin embargo, hace falta tener más información de interacciones como nitrógeno-azufre y azufre-carbono-nitrógeno (Fdz-Polanco y col. 2001). A continuación se describen algunos aspectos relevantes del ciclo biológico del nitrógeno y del azufre.

1.2. Ciclo del nitrógeno

En cuanto a los procesos desasimilativos se refiere, el ciclo del nitrógeno se divide básicamente en una parte aerobia conocida como nitrificación, y una anaerobia que corresponde a la desnitrificación, aunque existen vías alternas, como la amonificación, que se dan bajo condiciones particulares (Figura 1).

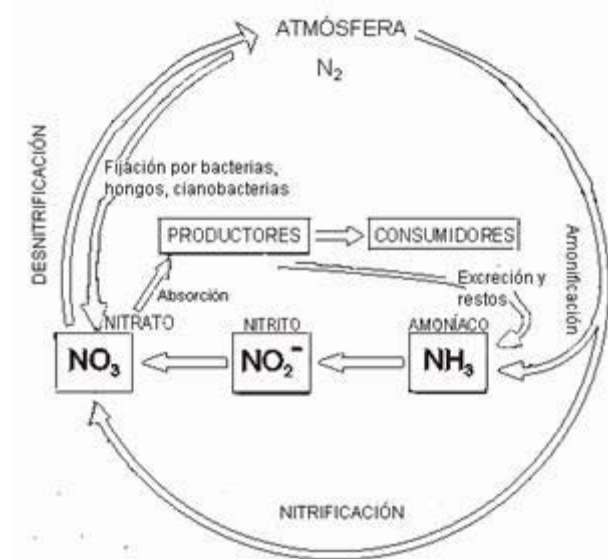


Figura 1. Ciclo biológico del nitrógeno

1.2.1. **Nitrificación**

Durante la nitrificación bacterias que pertenecen a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus* (entre otros), llevan a cabo la transformación de amonio en hidroxilamina, a través de la enzima amonio mono-oxigenasa. La hidroxilamina es convertida posteriormente en nitrito, por la acción de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa. Posteriormente otro tipo de bacterias (*Nitrobacter*, *Nitrosococcus*, etc.)

realizan la oxidación de nitrito a nitrato. El factor ambiental que tiene más influencia en este proceso parece ser el oxígeno (Cervantes y col. 2000).

1.2.2. Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso biológico de reducción desasimilativa en el cual el nitrato se reduce a nitrógeno molecular en ausencia de oxígeno. Este proceso se lleva a cabo en diferentes etapas en las cuales intervienen las siguientes enzimas: nitrato reductasa (NaR), nitrito reductasa (NiR), óxido nítrico reductasa (NOR), óxido nitroso reductasa (N₂OR), tal como se muestra en la Figura 2 (Knowles R., 1982).

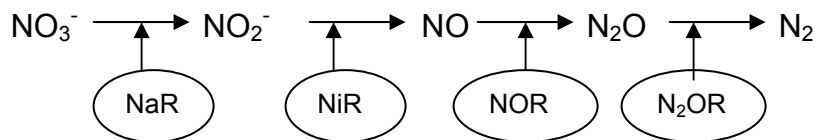


Figura 2. Pasos de la desnitrificación

En un principio se pensaba que los microorganismos desnitrificantes pertenecían a un número limitado de géneros. Con el avance en las técnicas de biología molecular se han reclasificado muchos microorganismos y también se han detectado otros que tienen la capacidad metabólica de desnitrificar. Actualmente no es posible tener caracterizaciones de los microorganismos rígidas, ya que los datos encontrados muestran que los microorganismos poseen una enorme diversificación y flexibilidad desde el punto de vista metabólico. La capacidad de desnitrificar se ha detectado en bacterias que pertenecen a diferentes subclases de las *Proteobacteria* e incluso hay representantes de las *Archaea* (Zumft 1997).

Existe otra vía conocida como reducción desasimilativa de nitrato a amonio en la cual actúa una enzima nitrato reductasa diferente a la de la vía desnitrificante (Magonigal, y col. 2004). Esta vía no permite que el nitrato sea reducido sólo a nitrógeno molecular. Se ha visto que algunos factores pueden influir en la orientación de la vía,

tales como el manejo de la relación C/N, el tipo de fuente reductora o el tipo de microorganismos presentes, pero finalmente las condiciones de cultivo en general parecen ser el factor determinante (Cervantes y col. 2000).

A continuación se describen algunos de los principales datos encontrados, en cuanto a las enzimas desnitrificantes se refiere:

El primer paso (Figura 2) de la desnitrificación es catalizado por la enzima NaR ligada a la membrana y la reacción está asociada con la conservación de energía a través de la generación de un gradiente de protones, o por medio de una reacción de fosforilación con el sustrato (Mateju y col. 1992). Las enzimas nitrato reductasa pueden ser del tipo asimilativo o desasimilativo y se han encontrado evidencia de que una sola bacteria puede tener varios tipos de nitrato reductasas (Zumft 1997).

La NiR es una enzima clave en la desnitrificación, ya que cataliza el primer paso que da origen a un intermediario gaseoso, óxido nítrico (NO) [Zumft 1997] y se han caracterizado dos tipos de enzimas diferentes, una contiene un centro de cobre y la otra contiene dos grupos hemo que se localizan en el periplasma (Mateju y col. 1992). A finales de 1980 se aceptó la existencia del NO como intermediario obligado (Ye y col. 1994).

Se han aislado y caracterizado dos tipos diferentes de NO reductasas. Ambas enzimas contienen complejos de citocromos y grupos hemo. Además de la función del NO como aceptor de electrones se piensa también que cumple con una función detoxificante para evitar reacciones indeseables del óxido nítrico (Ye y col. 1994).

La enzima N₂OR esta localizada en el periplasma y la reacción que cataliza esta acoplada a la producción de ATP. Esta enzima puede ser inhibida por acetileno, sulfuro, monóxido de carbono, cianuro; la evidencia encontrada indica que es una proteína que contiene cobre (Hochstein y Tomlinson 1988). El transporte de

electrones en el último paso en el que interviene esta enzima, genera un potencial de membrana un poco menor que el asociado con la utilización de oxígeno (Knowles 1982).

La desnitrificación se puede clasificar en organotrófica cuando se utiliza una fuente orgánica de electrones. Hasta la década de los ochenta los sustratos más comúnmente utilizados eran: metanol, etanol, glucosa, acetato o aspartato. Se tiene información de microorganismos y consorcios que son capaces de llevar a cabo la desnitrificación con compuestos aromáticos como los llamados fenólicos (fenol, cresoles), los cuales son considerados tóxicos para los microorganismos (Puig y col. 2003). La oxidación biológica de los compuestos aromáticos, se había estudiado principalmente a través de procesos aerobios, pero a partir de 1990 se ha prestado mayor atención a los tratamientos anaerobios (Veeresh y col. 2005). Entre los microorganismos que pueden utilizar compuestos aromáticos como fuente de carbono se encuentran: *Rhodopseudomonas palustris*, proteobacteria fototrófica que pertenece al subgrupo α , *Thauera aromatica* (bacteria desnitrificante) y *Azoarcus evansii*. Estas dos últimas proteobacterias pertenecen al subgrupo β (Harwood y col. 1999). Otro ejemplo es el género *Magnetospirillum*, proteobacterias del subgrupo α , el cual es capaz de asimilar fenol en condiciones desnitrificantes (Shinoda y col. 2000).

Se ha reportado que diversos compuestos aromáticos como el fenol, cresoles, tolueno, anilina, etc. son metabolizados por los microorganismos a través de rutas conocidas como vías periféricas en donde los sustratos son transformados a un intermediario común (benzoil-CoA) (Cornelus y col. 1995, Harwood y col. 1999). Se ha encontrado que la vía central por la cual se metaboliza el benzoil-CoA puede ser diferente para el tipo de bacteria estudiada, en el caso de especies desnitrificantes el producto final puede ser CO_2 y en algunas condiciones además del CO_2 se produce también 3 acetil-CoA (Harwood y col. 1999).

Para los isómeros del cresol (*orto*, *meta* y *para*), se han propuesto diferentes reacciones iniciales que pueden ser de carboxilación u oxidación, y que dan origen al benzoil Co-A (Rudolphi y col. 1990, Cornelus y col. 1995). En un estudio (Rudolphi y col. 1991) se reportó que una cepa de *Pseudomonas* oxidó el *p*-cresol hasta CO₂ utilizando nitrato como aceptor de electrones. A través de la detección de intermediarios y medición de actividades enzimáticas se sugirió la ruta metabólica de la oxidación del *p*-cresol. Esta ruta fue confirmada posteriormente (Harwood y col. 1998) y se encuentra representada en la Figura 3.

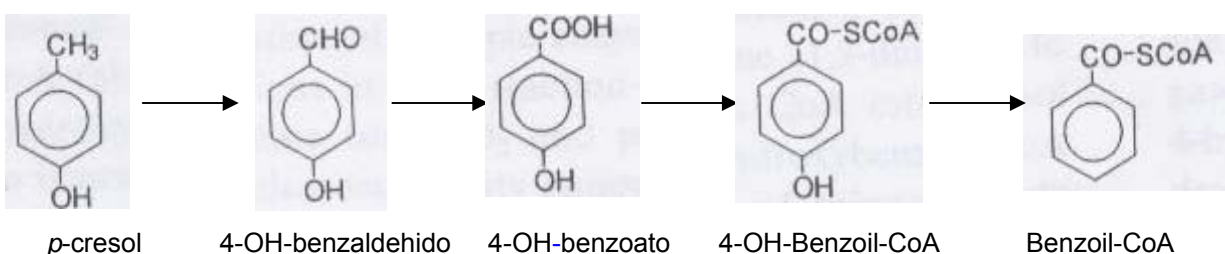
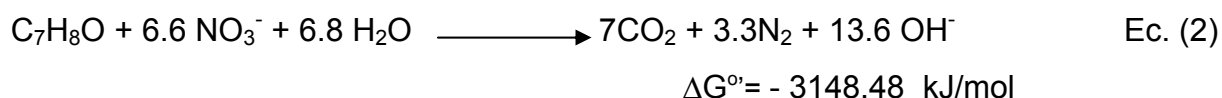
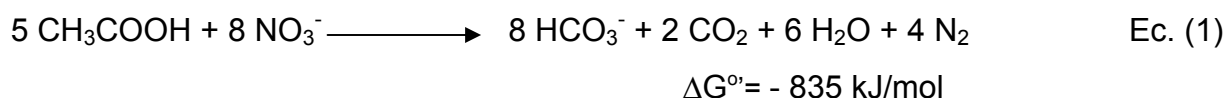


Figura 3. Vía periférica anaerobia de oxidación del *p*-cresol.

O'Connor y Young (1996) realizaron un estudio con un consorcio para probar el efecto de algunos grupos funcionales en el metabolismo de los fenoles monosustituidos en condiciones anaerobias (metanogénesis y desnitrificación). Para las pruebas en lote con *o*-, *m*- y *p*-cresol utilizaron una concentración inicial de 0.5 mM del sustrato y 30 mM de KNO₃. En cuanto al porcentaje de recuperación de nitrógeno molecular en relación al teórico esperado obtuvieron 56% para el *o*-cresol y más del 100% para el *m*- y *p*-cresol. Determinaron la fase lag como el punto en el cual la concentración de sustrato cambió en más de 10% expresada en semanas, *o*-cresol: 21, *m*-cresol: 14, y *p*-cresol: 5. Ellos definen este período como aclimatación siendo el *p*-cresol el que tiene el período más corto. Cabe mencionar que sus muestreos fueron realizados de 1 a 3 semanas. Los tres isómeros del cresol fueron consumidos en su totalidad en 42, 31 y 34 semanas respectivamente. Las velocidades de consumo de sustrato (μmol/L-d) que reportaron son: *o*-cresol (5.49), *m*-cresol (5.70) y *p*-cresol (>97). El *p*-cresol es consumido a velocidades

considerablemente mayores. La producción inicial de nitrógeno molecular $k_{(ID)}$ fue calculada como el cociente de la velocidad de producción de nitrógeno de la muestra entre la del control, el cual fue preparado con las mismas condiciones de la muestra pero sin tener el sustrato. Este valor adimensional lo toman como un indicativo de la toxicidad del compuesto y su degradación. Para el *o*-cresol $k_{(ID)} = 0.65$, *m*-cresol $k_{(ID)} = 0.72$ y *p*-cresol $k_{(ID)} = 1.20$. La producción inicial de nitrógeno molecular es mayor para el *p*-cresol. Ellos concluyen, considerando el período de aclimatación y los datos cinéticos, que el patrón de degradación de los cresoles es: *p*-cresol > *m*-cresol >> *o*-cresol.

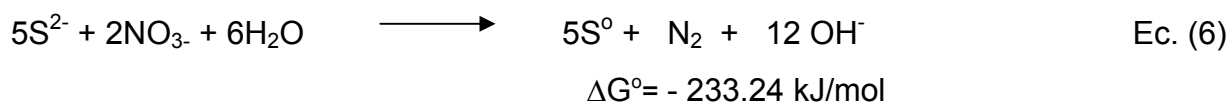
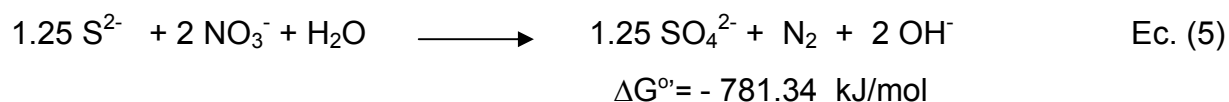
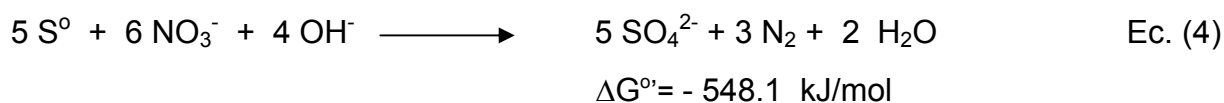
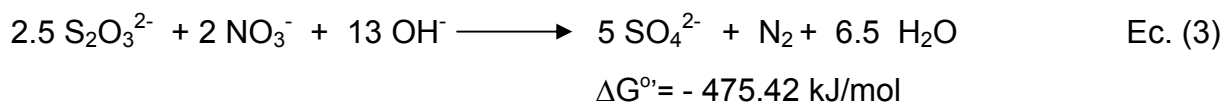
Las siguientes ecuaciones (1, 2) representan la desnitrificación con acetato y *p*-cresol sin considerar la formación de biomasa:



Para el caso de la desnitrificación con acetato y *p*-cresol los valores de ΔG° nos indican que ambas reacciones son favorables desde el punto de vista termodinámico.

En la desnitrificación conocida como litotrófica, los microorganismos utilizan como fuente de electrones compuestos ferrosos o compuestos reducidos del azufre. Bajo condiciones autotróficas el dióxido de carbono o bicarbonato es usado por los microorganismos como fuente de carbono. En cuanto a la desnitrificación con compuestos reducidos del azufre, se ha estudiado el tiosulfato (Gunter y Kutzner 1985), el azufre elemental (Kim y Bae 2000), el sulfuro (Aminuddin y Nicholas 1973; Bisogni y Driscoll 1977; Krishnakumar y Manilal 1999; Sublette y Sylvester 1987; Sublette y col. 1998; Cadenhead y Sublette, 1990; McComas y Sublette 2001).

Las ecuaciones que representan la desnitrificación utilizando diferentes compuestos de azufre, sin considerar la formación de biomasa son:



Para las ecuaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se calculó la energía libre de Gibbs en condiciones estándar (ΔG°) por diferencia de la suma de la energía de formación (ΔG°_f) de productos y de reactivos (Thauer y col. 1977). Estos datos nos indican la factibilidad de la reacción desde el punto de vista termodinámico (Fdez-Polanco y col. 2001). Para la desnitrificación litotrófica con compuestos reducidos del azufre, la oxidación del sulfuro hasta sulfato representa la mayor ganancia de energía, mientras que la del azufre elemental y el tiosulfato tiene valores similares. Es importante conocer esta información para explicar posibles rutas del metabolismo microbiano sin dejar de considerar aspectos fundamentales como la toxicidad de algunos compuestos y la información cinética de la reacción.

Koenig y Liu (2001) realizaron una comparación de datos cinéticos y velocidades específicas de consumo de nitrato (q_{NO_3}) de la desnitrificación heterotrófica y

litrófica. Utilizando azufre elemental en una prueba en lote la velocidad específica fue: 0.15 g N-NO₃/g SSV-d, con tiosulfato en una prueba en continuo fue: 4.23 g N-NO₃/g SSV-d y con metanol (no describen bajo qué condiciones) la velocidad fue: 4.41 g N-NO₃/g SSV-d. Refieren que a pesar de que el rendimiento energético es similar para el azufre elemental y el tiosulfato (91.15 y 92.97 kJ/electrón equivalente, respectivamente) la velocidad específica de consumo de nitrato es un orden de magnitud menor para el caso del azufre elemental. El factor limitante puede ser la baja solubilidad del azufre. Las velocidades específicas de consumo de nitrato con metanol y con tiosulfato son similares, para el metanol el rendimiento energético es 109.18 kJ/electrón equivalente.

Reyes y col. (2004) reportaron para un estudio en lote las siguientes velocidades específicas de consumo de nitrato: con acetato a una concentración de 102.2 mg C_{ace}/L la q_{NO₃} fue 1.9 g N-NO₃/g SSV-d, con sulfuro a una concentración de 104 mg S²⁻/L la q_{NO₃} fue 0.38 g N-NO₃/g SSV-d y con ambos donadores de electrones a las concentraciones arriba mencionadas la q_{NO₃} fue 1.1 g N-NO₃/g SSV-d. En este caso la velocidad específica de consumo de nitrato con sulfuro es un orden de magnitud menor en comparación con el acetato. Aun cuando la concentración inicial de los sustratos es similar, la actividad metabólica varía.

Se han reportado temperaturas y valores de pH considerados como óptimos para el proceso desnitrificante (Knowles 1982, Claus y Kutzner 1985, Oh y col. 2000). Sin embargo, la experiencia en laboratorio indica que el proceso desnitrificante puede funcionar adecuadamente en un intervalo amplio de temperatura (15 °C - 35 °C) y pH (6-9) (Bernet y col. 1995).

La disponibilidad de electrones es uno de los factores más importantes que controlan la capacidad desnitrificante de los microorganismos. En este sentido y con el propósito de tener un proceso principalmente desasimilativo por un lado, y para evitar la acumulación de intermediarios de la vía desnitrificante por el otro, es

importante conservar las relaciones C/N y/o S/N muy cercanas a la estequiometría de la reacción (Cervantes y col. 2000). En este contexto, se han llevado a cabo estudios probando diferentes relaciones C/N y su influencia en el proceso desnitrificante (Cervantes y col. 2001) con sustratos fácilmente degradables (metanol, etanol, glucosa, ácidos grasos volátiles, etc.). También se tienen datos de la influencia de la relación S/N utilizando tiosulfato (Mateju y col. 1992). En el caso de sustratos considerados como tóxicos como los compuestos aromáticos o el sulfuro, su concentración es un aspecto relevante que puede influir en la acumulación de intermediarios.

La desnitrificación representa una opción viable para el tratamiento de aguas residuales provenientes de la refinación del petróleo, ya que permitiría eliminar nitrato, sulfuro y fenoles en forma simultánea.

1.3.1. Química del azufre

El presente trabajo se enfoca a una parte del ciclo biológico del azufre (oxidación desasimilativa); sin embargo, es importante considerar los aspectos químicos de los diferentes estados de oxidación de este compuesto que son comunes con el ciclo biológico. Parte de la complejidad de la química del azufre proviene de los diferentes estados de oxidación que puede tener. En la Tabla 2 se presentan los diferentes estados de oxidación del azufre.

Tabla 2. Estados de oxidación del azufre.

Estado de oxidación	Compuesto
-2	Ion sulfuro S_2^{2-} . Sulfuro de hierro FeS
-1	Ion Disulfuro. Pirita FeS_2
0	Azufre elemental Sn
+1	Disulfano. Diclorodisulfano Cl-S-S-Cl
+2	Tiosulfato $S_2O_3^{2-}$
+3	Ditionito $S_2O_4^{2-}$
+4	Sulfito SO_3^{2-}
+5	Ditionato $S_2O_6^{2-}$
+6	Sulfato SO_4^{2-}

(Steudel, 2000)

En un sistema acuoso la especie predominante de azufre depende del potencial redox, el valor de pH y de la temperatura (Williamson y Rimstidt 1992). Los átomos de azufre pueden formar enlaces covalentes con otros átomos de azufre para formar cadenas largas (catenación) y pueden dar lugar a anillos de varios tamaños. A condiciones ambiente de temperatura y presión el azufre elemental está presente formando anillos de diferentes tamaños. La forma más estable desde el punto de vista termodinámico es la ortorrómbica (α -S8), la cual tiene un color amarillo-verdoso y como todos los alótopos del sulfuro es hidrofóbico, prácticamente es insoluble en agua a 20°C (Boulegue 1978). Cuando una solución de azufre elemental disuelto en un compuesto orgánico como acetona o etanol, es diluida o puesta en un exceso de agua, forma precipitados coloidales en forma de pequeñas esferas de apariencia blanca y lechosa (Steudel 2000).

En solución acuosa los iones de sulfuro se encuentran protonados dependiendo del valor de pH. En una solución a pH de 7, a una concentración 1 mM de sulfuro total, 50% del sulfuro esta presente como HS^- y el resto como H_2S ; a pH de 10 todo el sulfuro está presente en forma de HS^- . Los sulfuros de los metales alcalino y alcalinotérreos son solubles en agua a pH neutro, pero son reacciones de hidrólisis y por lo tanto fuertemente alcalinas de acuerdo con la siguiente reacción (Steudel 2000):



Los iones sulfuro en solución acuosa pueden ser oxidados por el oxígeno a azufre elemental, el cual precipita. La velocidad de auto-oxidación de estas soluciones depende de la concentración de sulfuro, el valor de pH y la temperatura (Chen y Morris 1972). El azufre elemental sólo se forma en soluciones cercanas a la neutralidad. Soluciones alcalinas de sulfuro y sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$) son oxidados por oxígeno a polisulfuros, tiosulfato y eventualmente sulfato. El anión sulfato es químicamente inerte y para ser reducido a temperatura ambiente es necesaria la acción biológica de los microorganismos (Steudel 2000).

A pesar de que algunas especies químicas del azufre son altamente reactivas en presencia del oxígeno, las reacciones biológicas tienen lugar a velocidades que pueden ser de 100 a 1000 veces mayores, comparadas con las reacciones en las que no intervienen los microorganismos (Lens y Kuenen 2001).

1.3.2. Ciclo biológico del azufre

El azufre es transformado con respecto a su estado de oxidación como parte del ciclo biogeoquímico global, formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos y con diferentes estados físicos (gas, líquido, sólido). Dentro de este ciclo, los microorganismos desempeñan una función importante y, a la fecha, se han estudiado con mayor atención a las bacterias involucradas en el ciclo del azufre con enfoques para aplicación en la biorremediación y el estudio de la corrosión en metales (Lens y col. 2000). La Figura 4 representa el ciclo biológico del azufre. Tanto la reducción como la oxidación desasimilativa son procesos que tienen aplicación en la biorremediación. En la reducción desasimilativa las condiciones son anaerobias ya que el sulfato es utilizado como aceptor de electrones. En el caso de la oxidación desasimilativa, compuestos reducidos del azufre son oxidados en presencia de

oxígeno o algún otro aceptor de electrones como el nitrato. A continuación se describen con más detalle ambos procesos.

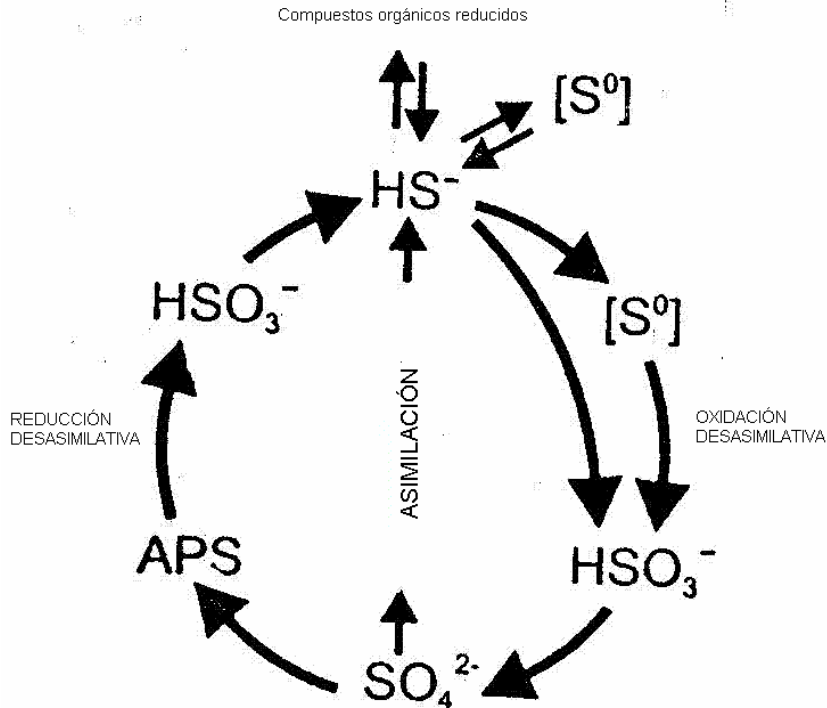


Figura 4. Ciclo biológico del azufre (Brüser y col. 2000)

1.3.2.1. Reducción desasimilativa de compuestos oxidados del azufre.

Las bacterias capaces de reducir el sulfato hasta sulfuro son conocidas como bacterias sulfato reductoras (BSR). En este proceso respiratorio, el sulfato es utilizado como aceptor de electrones. Los sustratos reductores más comúnmente utilizados son el acetato, metanol, propionato, butirato, hidrógeno, lactato e incluso compuestos aromáticos. Algunos de los géneros más representativos que presentan este tipo de respiración son: *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* entre otros. Algunas BSR son capaces de oxidar los ácidos grasos volátiles hasta CO_2 , pero otras no poseen las enzimas necesarias y tienen como resultado de la oxidación de la materia orgánica al acetato (Brüser y col. 2000). En ambos casos el producto final de la reducción del sulfato es el sulfuro. Por otro lado,

algunas de estas bacterias también pueden utilizar como aceptor final de electrones otros compuestos oxidados del azufre como el sulfito y tiosulfato. A pesar de haber sido clasificadas como anaerobias estrictas se ha observado que algunas sulfato reductoras son capaces de respirar con oxígeno (Brüser y col. 2000).

1.3.2.2. Oxidación desasimilativa de compuestos reducidos del azufre

De las bacterias que pueden oxidar compuestos reducidos del azufre muchas pertenecen al dominio Eubacteria y algunas a Archaeobacteria. En el pasado el término con el que se conocían era “bacterias del azufre” y se dividían en: bacterias verdes del azufre (*Chlorobiaceae*), bacterias púrpuras (*Chromatiaceae*) y bacterias incoloras que pertenecían a las proteobacterias (géneros *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thiospira*) o a las Archaeobacteria (*Sulfolobus* y *Acidianus*). Esta clasificación ya no se utiliza ya que se han encontrado bacterias del azufre que pueden crecer organo-heterotróficamente (Brune 1989). En la figura 5 se presenta el árbol filogenético de los procariotes que oxidan compuestos del azufre basado en la secuencia conservada 16S del ARN ribosomal.

1.3.2.3. Modelos propuestos para explicar las vías de oxidación del azufre

Se han propuesto hasta el momento tres vías diferentes para explicar la oxidación de compuestos reducidos del azufre: la vía ramificada del tiosulfato, la vía del complejo multi-enzimático (también conocida como la vía de oxidación del azufre del *Paracoccus* "PSO" por sus siglas en inglés) y la vía del tetrionato.

Vía ramificada de oxidación del tiosulfato.

En la Figura 6 se presenta el esquema propuesto para esta vía, la cual se basa en estudios hechos con *Chromatiaceae* y *Thiobacillus denitrificans* en condiciones anaerobias. Utilizando tiosulfato como sustrato, se pudo demostrar que cada azufre de la molécula de tiosulfato sigue una vía de oxidación diferente. Una acumula azufre elemental antes de su oxidación y otra se convierte a sulfito y este se oxida posteriormente a sulfato (Schedel y Trüper 1980). Reyes y col (2004), sugieren que el tipo de producto final (azufre elemental, tiosulfato o sulfato) está fuertemente vinculado con las condiciones estequiométricas, o bien con la relación C/S. Hay dos enzimas que pueden llevar a cabo la ruptura del tiosulfato, una es la rodanasa y la otra es la tiosulfato reductasa (Brune 1989). La acción de la enzima tiosulfato reductasa tiene como productos el sulfuro y sulfito. El sulfito es oxidado a sulfato por la enzima sulfito oxidoreductasa. En *T. denitrificans* esta enzima está acoplada a la reducción del citocromo tipo-c (Aminuddin y Nicholas 1974). Se sugiere que tanto el sulfuro formado por la tiosulfato reductasa, como el que pudiera ser proporcionado exógenamente, siguen la misma vía. El sulfuro es oxidado por la enzima sulfuro quinona oxidoreductasa a cadenas de azufre elemental (Schedel y Trüper 1980), el cual es acumulado hasta que no hay sulfuro libre disponible en el periplasma o en el medio. El azufre acumulado en el periplasma es transportado al citoplasma por el sistema acarreador de sulfuro (Pott y Dahl 1998) y posteriormente oxidado a sulfito y por último a sulfato.

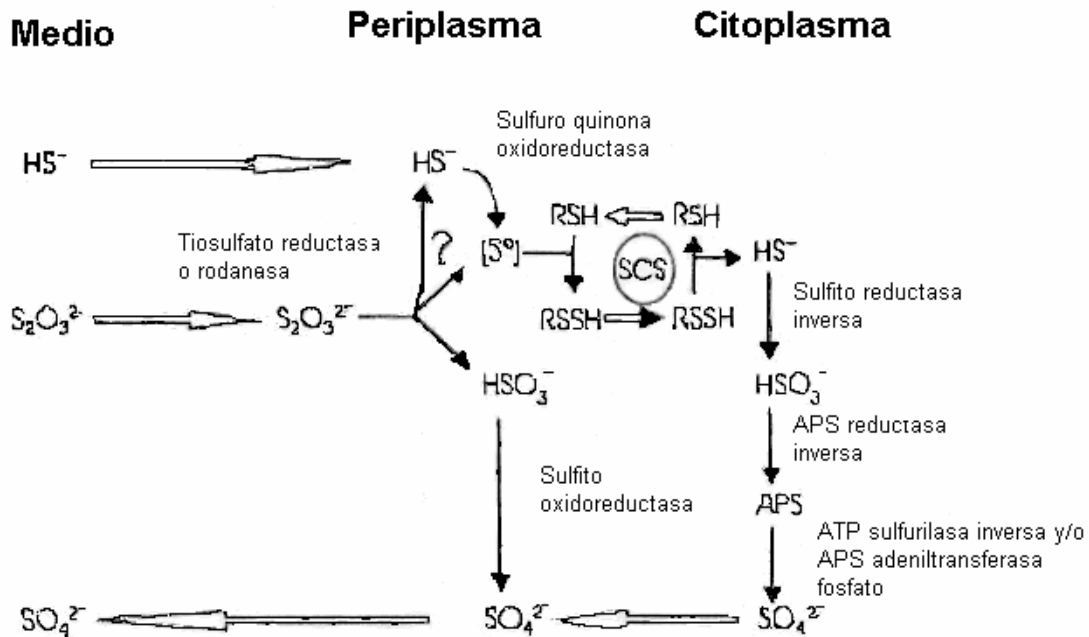


Figura 6. Vía ramificada de oxidación del tiosulfato (Brüser y col. 2000)

Vía del complejo multi-enzimático

Esta vía fue propuesta para *Paracoccus versutus* (Lu y Kelly 1983) pero también está presente en *Paracoccus denitrificans* (Wodara y col. 1994). Se conoce también como la vía PSO (*Paracoccus sulfur oxidation*) y el sistema enzimático se conoce como “sistema multi-enzimático tiosulfato-oxidante”. El sistema multi-enzimático que consiste en cinco diferentes polipéptidos ya ha sido caracterizado y está localizado en el periplasma (Wodara y col. 1994). El complejo multi-enzimático oxida el tiosulfato a sulfato sin que sean liberados intermediarios transitorios.

Vía del tetratonato

En esta vía se propuso que el tiosulfato era oxidado a sulfato con la formación de tetratonato (Vishniac 1952). La información para explicar esta vía no es suficiente y en algunos casos parece contradictoria. Esta vía ha sido propuesta para

microorganismos aerobios autótrofos Thiobacilli que pertenecen a los γ -proteobacteria y α -proteobacteria (Lu y Kelly 1988, Kelly y col. 1997). En esta vía el tiosulfato es estequiométricamente convertido a tetracionato. La información experimental más reciente parece indicar que los productos de la oxidación del tetracionato son tiosulfato, azufre elemental y sulfato. La enzima tetracionato hidrolasa ha sido purificada y caracterizada (DeJong y col. 1997). Aun no se sabe con certeza cómo se oxida el azufre elemental que se produce en esta vía. Se han purificado dos enzimas sulfuro deshidrogenasas de microorganismos para los que se propone esta vía y se han reportado como citocromos del tipo *c* (Visser y col. 1997).

Un nuevo enfoque

Friedrich y col. (2001) basándose en estudios genómicos concluyen que las diferentes reacciones metabólicas de la oxidación de compuestos del azufre tienen un mecanismo común en bacterias litotróficas y fototróficas. Los autores compararon el grupo de genes de *P. pantotrophus* que codifica para la oxidación de compuestos de azufre denominado Sox con el de otros microorganismos que pueden oxidar el azufre. Ellos concluyen que hay proteínas homólogas a las proteínas Sox en miembros del dominio *Bacteria* pero no en miembros del dominio *Archaea*, por lo que la oxidación de sulfuro a sulfato puede estar mediada por sistemas muy similares en las bacterias. Proponen que las diferencias pueden deberse al mecanismo por el cual el átomo que será oxidado con SoxY se une a la proteína. Los sistemas también podrían diferir en lo relacionado con las especificidades de los sustratos de azufre.

CAPÍTULO 2

2.1. Antecedentes

Como se mencionó anteriormente, la desnitrificación puede llevarse a cabo con una fuente de carbono orgánica, pudiendo también ser ésta la fuente donadora de electrones (organotrófica) o con un compuesto inorgánico como fuente de electrones (litotrófica) y una fuente de carbono inorgánica. La desnitrificación organotrófica y la litotrófica han sido estudiadas ampliamente en forma separada. Sin embargo, se tiene información de que se pueden llevar a cabo en forma simultánea. Se ha estudiado la desnitrificación con azufre elemental como soporte y donador de electrones en presencia de materia orgánica (Oh y col. 2001; Lee y col. 2001) y con sulfuro y materia orgánica (Gommers y col. 1988; Reyes 2000, Reyes y col. 2004, Beristain 2004). Considerando que en el presente estudio se describe una alternativa para el tratamiento de las aguas amargas provenientes de la refinación del petróleo, los trabajos previos con sulfuro y materia orgánica, en condiciones desnitrificantes son de especial interés. Gommers y col. (1988) eliminaron acetato ($4 - 6 \text{ g } C_{ace}/\text{L-d}$) y sulfuro ($2 - 3 \text{ g } S^{2-}/\text{L-d}$) por desnitrificación ($5 \text{ g } N\text{-NO}_3/\text{L-d}$) en un reactor de lecho fluidificado. El nitrato estuvo presente en exceso en cuanto a la relaciones estequiométricas S/N y C/N y reportaron períodos transitorios en los que se acumuló azufre elemental sin encontrar una explicación. El nitrato no se consumió en su totalidad y detectaron nitrito en el efluente. Reyes (2000) reporta la eliminación de sulfuro ($0.044 - 0.295 \text{ g } S^{2-}/\text{L-d}$), acetato ($0.290 \text{ g } C_{ace}/\text{L-d}$), y nitrato ($0.203 \text{ g } N\text{-NO}_3/\text{L-d}$) en un reactor de tanque agitado, en condiciones limitadas respecto al aceptor de electrones (nitrato). La oxidación del sulfuro fue parcial hasta azufre elemental, al incrementar la velocidad de carga del sulfuro al reactor la eficiencia de eliminación del acetato disminuyó y el nitrato se consumió en su totalidad. Beristain (2004) trabajó con un reactor de lecho fluidificado inverso con acetato, sulfuro y nitrato. A una velocidad de carga constante de sulfuro ($70 \text{ mg } S^{2-}/\text{L-d}$) y de nitrato ($217 \text{ mg } N\text{-NO}_3/\text{L-d}$) probó diferentes relaciones C/N (1.4, 1.1 y 1.25) y encontró que

a una relación C/N de 1.4 el producto principal de la oxidación del sulfuro fue el azufre elemental, mientras que a relaciones C/N de 1.1 y 1.25 el producto principal fue sulfato. En cuanto al metabolismo desnitrificante también reportó variaciones en la producción de nitrógeno molecular como resultado de las diferentes relaciones C/N. El mayor rendimiento Y_{N_2} (0.84) lo obtuvo a una relación C/N de 1.25; las eficiencias de eliminación del nitrato, acetato y sulfuro fueron mayores que 90% en todos los casos. Otro aspecto importante observado fue el cambio en el material exopolimérico del cultivo, específicamente en el contenido de proteína soluble que es mayor a una relación C/N de 1.4 y disminuye con las otras relaciones C/N probadas.

2.2. Justificación

Considerando los antecedentes antes citados, es necesario tener mayor información que permita explicar en qué condiciones la oxidación del sulfuro es completa (hasta sulfato) o parcial (azufre elemental) y cómo afecta la presencia de materia orgánica, en forma de compuestos fenólicos, en el proceso litotrófico. Esto servirá como base para tener un mejor control del proceso de oxidación de sulfuro y lograr una eliminación eficiente de los compuestos de interés (nitrato, sulfuro y compuestos fenólicos) de las aguas residuales provenientes de la refinación del petróleo.

2.3. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo fue evaluar, a través de las variables respuesta eficiencia y rendimiento, un proceso desnitrificante lito-organotrófico utilizando sulfuro y compuestos fenólicos como fuente de electrones en un mismo reactor.

2.3.1. Objetivos particulares

Los objetivos particulares fueron:

- Caracterizar a través de las variables respuesta eficiencia de eliminación y rendimiento, la sustitución gradual de materia orgánica (organotrofia) por sulfuro (lito-organotrofia) en un reactor desnitrificante de tanque agitado.
- Caracterizar la desnitrificación en reactores UASB con diferentes donadores de electrones (sulfuro, sulfuro y *p*-cresol y *p*-cresol).
- Evaluar la toxicidad del sulfuro en un cultivo en lote.
- Evaluar el efecto del *p*-cresol y el sulfuro cuando están presentes en forma simultánea en una prueba en lote.

CAPÍTULO 3

3. Materiales y Métodos.

3.1. Metodología.

El presente trabajo se llevó a cabo en tres etapas. En la primera, utilizando un reactor de tanque agitado, se obtuvo un cultivo en estado estacionario desnitrificante con acetato y nitrato. Posteriormente, se disminuyó gradualmente la velocidad de carga del acetato y se adicionó sulfuro sin que el nitrato estuviera limitado.

En una segunda etapa, se operaron 3 reactores UASB. Uno trabajó con sulfuro y nitrato (reactor 1), otro con *p*-cresol y nitrato (reactor 3) ambos como referencia; y otro con nitrato, sulfuro y *p*-cresol (reactor 2).

Por último, en una tercera etapa, se realizaron dos pruebas en lote. La primera con sulfuro y nitrato para determinar el efecto del aumento de la concentración de sulfuro (40, 70 y 225 mg S²⁻/L) en el cultivo y la segunda prueba para determinar la competencia entre el sulfuro y *p*-cresol con tres tratamientos. El tratamiento 1 contenía sulfuro y nitrato, el tratamiento 2 sulfuro, *p*-cresol y nitrato, y el tratamiento 3 *p*-cresol y nitrato. A continuación se desglosan con más detalle los experimentos realizados.

3.2. Condiciones de Operación

Reactor de Tanque Agitado.

Se trabajó con un reactor de tanque agitado (Figura 7) bajo las siguientes condiciones: volumen de trabajo 1.3 litros, pH de 8.0, a 200 rpm, con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2 días, inoculado con lodo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UAM Iztapalapa. La concentración de lodos inoculados fue de 2.3 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV)/L. El sistema incluyó un sedimentador para recuperación y posterior recirculación de los lodos.

El trabajo con este reactor tuvo como propósito caracterizar el proceso desnitrificante en condiciones de lito-organotrofia (sulfuro y acetato como donadores de electrones) en un sistema no limitado por el aceptor de electrones (nitrato).

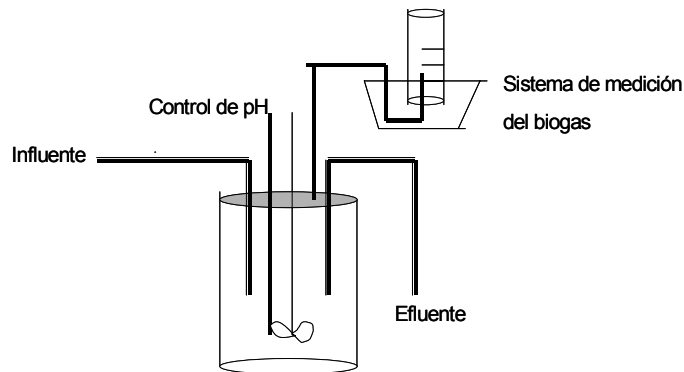


Figura 7. Reactor de tanque agitado

El reactor fue alimentado inicialmente con un medio químicamente definido, conteniendo acetato y nitrato como donador y aceptor de electrones respectivamente, considerando una relación C/N estequiométrica de 1.43 para oxidar todo el carbono presente hasta CO_2 . Estos dos compuestos y las sales restantes del medio basal, se alimentaron desde dos contenedores diferentes denominado Medio 1 y Medio 2 para evitar por un lado, la contaminación microbiana y por otro, la

precipitación de algunas sales. Los medios se alimentaron en forma separada al reactor y el flujo de cada uno fue 0.325 L/d. En la Tabla 3 se muestran los componentes del medio de cultivo inicial y la concentración del Medio 1 y Medio 2.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo inicial. Reactor de tanque agitado

Medio 1. Fuente de carbono		Medio 2. Fuente de nitrato	
Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
CH ₃ COONa	9.8	NaNO ₃	12.14
KH ₂ PO ₄	0.3	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.017
Na ₂ MoO ₄	0.01	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.075
MgSO ₄	0.06	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.005
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.015		

Para las diferentes fases de operación del reactor denominadas I, II, III, IV y V, la velocidad de carga del nitrógeno de nitrato fue constante ($Q_{N-NO_3} = 0.504$ g/L-d). Partiendo de un estado inicial en el que se alimentó solamente acetato se probaron diferentes velocidades (Fases I, II, III, IV y V) de carga de carbono y sulfuro. Durante estas Fases se disminuyó gradualmente la velocidad de carga del acetato y se adicionó el sulfuro necesario considerando el nitrato restante para su oxidación hasta sulfato, por lo que las relaciones C/N y S/N fueron variables sin que el sistema estuviera limitado por el nitrato. En todas las Fases se adicionó bicarbonato de sodio como fuente de carbono inorgánica (Perez y Matin 1982). En la Tabla 4 se presentan las fases y las diferentes velocidades de carga volumétricas de sulfuro, acetato y bicarbonato de sodio que se aplicaron al reactor.

Tabla 4. Velocidad de carga de sulfuro, acetato y bicarbonato para las diferentes fases en el reactor de tanque agitado.

Compuesto	Fase I (Q)	Fase II (Q)	Fase III (Q)	Fase IV (Q)	Fase V (Q)
S_2^-	0.179	0.285	0.285	0.395	0.502
C^- Acetato	0.537	0.430	0.430	0.322	0.215
$NaHCO_3$	0.0625	0.0625	0.0825	0.0825	0.0825

Q = (g/L-d)

Para este reactor se cuantificaron los siguientes compuestos con las técnicas descritas en la sección correspondiente: compuestos nitrogenados: nitrito, nitrato, óxido nitroso, nitrógeno molecular; compuestos del azufre: sulfuro, sulfato, tiosulfato, azufre elemental; compuestos del carbono: acetato, dióxido de carbono, bicarbonato, así como crecimiento de la biomasa.

Reactor tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket)

Se operaron tres reactores UASB con las siguientes características: volumen de trabajo 0.5 litros, TRH de 12 horas y temperatura de 30°C (Figura 8).

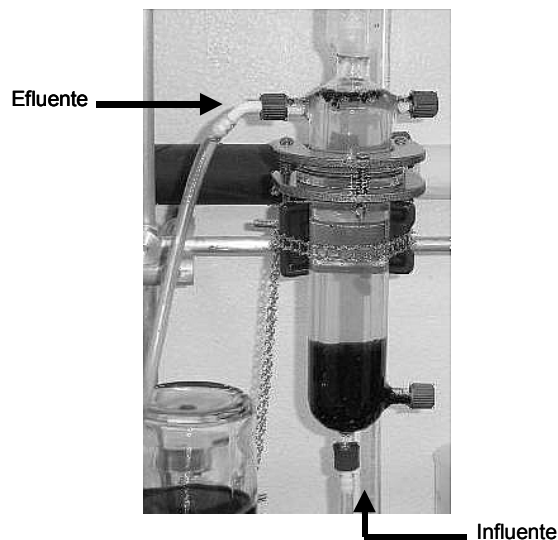


Figura 8. Reactor UASB

El biogás producido en los reactores se hizo pasar por una solución de hidróxido de sodio 3N con el propósito de que el CO₂ se disolviera en la solución en forma de bicarbonato. El biogás producido se cuantificó en forma rutinaria asumiéndose que estaba compuesto exclusivamente de nitrógeno molecular. Se analizaron muestras en el cromatógrafo de gases en las que no se detectó la presencia de óxido nitroso. La concentración de inóculo para cada reactor UASB fue de 10 g SSV/L. Con estos reactores se caracterizó la desnitrificación simultánea con sulfuro y *p*-cresol en un sistema limitado en cuanto al aceptor de electrones, teniendo como referencia la desnitrificación litotrófica (sulfuro) y organotrófica (*p*-cresol). Los reactores fueron inoculados con lodos granulares provenientes de un reactor continuo de flujo ascendente en condiciones desnitrificantes litotróficas alimentado con tiosulfato. El medio de cultivo basal para los reactores UASB se compuso de (g/L): K₂HPO₄ (2.17); MgCl₂.6H₂O (0.056); extracto de levadura (0.003); NH₄Cl (0.068); NaHCO₃, (0.84) y solución de elementos traza (1 ml/L). La solución de elementos traza fue de (mg/L): EDTA (500); ZnSO₄ (22); CaCl₂ (55); MnCl₂.4H₂O; (50.6) (NH₄)₆MoO₂₄.4H₂O (11); CuSO₄.5H₂O (15.7) y CoCl₂.6H₂O (16.1). El pH del medio se ajustó de 7.1 a 7.2. En la Tabla 5 se describe la concentración de nitrato de potasio, sulfuro de sodio y *p*-cresol de los tres reactores UASB.

Tabla 5. Concentración en el medio de cultivo de nitrato, sulfuro y *p*-cresol en los reactores UASB 1, 2 y 3

Compuesto	Reactor 1 (g/L)	Reactor 2 (g/L)	Reactor 3 (g/L)
KNO ₃	0.647	0.647	0.647
Na ₂ S.9H ₂ O	0.96	0.96	N.C.
<i>p</i> -cresol	N.C.	0.101	0.101
N.C. No contiene			

Considerando que el flujo de alimentación del reactor fue de 1 L/d y el volumen de 0.5 L, las velocidades de carga de los compuestos de interés se presentan en la Tabla 6. Para estos reactores se realizaron las siguientes determinaciones con las técnicas que se describen más adelante: compuestos nitrogenados; nitrito, nitrato;

compuestos del azufre: sulfuro, sulfato, tiosulfato; compuestos del carbono: ácidos grasos volátiles, *p*-cresol, carbono orgánico total; cuantificación del biogás producido. A partir del día 130 se tomaron muestras para detectar óxido nitroso.

Tabla 6. Velocidades de carga del nitrógeno, sulfuro y carbono aplicadas a los reactores UASB 1, 2 y 3.

Compuesto	Reactor 1 (Q)	Reactor 2 (Q)	Reactor 3 (Q)
N-NO ₃ ⁻	0.179	0.179	0.179
S ²⁻	0.256	0.256	N.C.
C <i>p</i> -cresol	N.C.	0.157	0.157

Q (g/L-d)

N.C. No contiene

Pruebas de toxicidad del sulfuro en lote

Con el propósito de evaluar el posible efecto tóxico del sulfuro en el consorcio, se llevaron a cabo pruebas en lote en botellas serológicas de 60 ml. El volumen de trabajo fue de 40 ml, a una temperatura de 30°C y con agitación constante de 100 rpm. El inóculo que se utilizó para estas pruebas fue tomado de un lodo floculento de un reactor de tanque agitado, el cual fue reactivado con nitrato y fenol. La concentración del inóculo en las botellas fue 0.66 g SSV/L.

El medio de cultivo basal consistió en (mg/L): CaCl₂.2H₂O (36); Na₂MoO₄.2H₂O (0.7); CuSO₄.5H₂O (4); KH₂PO₄ (15); MgCl (50); FeCl₃.6H₂O (1); NaHCO₃ (65). El nitrato se adicionó en exceso para todas estas pruebas a una concentración de NaNO₃ de 1.86 g/L. La concentración de sulfuro adicionada fue variable y se especifica en la descripción de cada prueba. El pH del medio de cultivo se ajustó a 8.0

Después de inocular las botellas serológicas, se hizo pasar una corriente de helio por tres minutos con el propósito de desplazar el oxígeno presente. El sulfuro se cuantificó con el método yodométrico, el sulfato, tiosulfato, nitrato y nitrito se

cuantificaron por electroforesis capilar. Para cuantificar el nitrógeno molecular se realizó una curva estándar con las mismas condiciones de las pruebas de lote.

Prueba en lote *p*-cresol y sulfuro

El propósito de esta prueba fue estudiar la competencia entre el *p*-cresol y el sulfuro cuando están presentes en forma simultánea en un proceso desnitrificante. Esta prueba se llevó a cabo en botellas serológicas de 125 ml con un volumen de trabajo de 54 ml, a una temperatura de 30°C y con agitación. El inóculo para estas pruebas fue 0.5 g SSV/L de lodo granular proveniente de un reactor UASB que trataba efluentes de la industria del papel con alto contenido de sulfuro.

El medio de cultivo fue (mg/L): K₂HPO₄ (800); KH₂PO₄ (300); NH₄Cl (400); MgSO₄ 7H₂O (400); NaHCO₃ (5000); extracto de levadura (20), solución de elementos traza (2 ml); KNO₃ (1616); Na₂S 9H₂O (2401); *p*-cresol (254). El pH del medio se ajustó a 7.2. El sulfuro se adicionó después de pasar una corriente de CO₂/N₂ para desplazar el oxígeno. El sulfuro se cuantificó con el método del azul de metileno, el sulfato, tiosulfato, nitrato y nitrito se cuantificaron por cromatografía iónica.

3.3. Técnicas Analíticas

Cuantificación de nitrito, nitrato, tiosulfato y sulfato

Para la determinación y cuantificación de estos iones se utilizó la electroforesis capilar y la cromatografía iónica. En ambos casos se determinaron inicialmente los tiempos de retención de cada uno de los iones por separado. Posteriormente, se prepararon estándares de los iones mezclados en concentraciones desde 1 hasta 50 mg/L, intervalo en donde se tiene una respuesta lineal al graficar el área contra la concentración.

Para los análisis con electroforesis capilar las especificaciones fueron: analizador capilar 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 20 KV. La absorbancia se midió en la región ultravioleta con lámpara de mercurio a 254 nm. El electrolito empleado fue a base de cromato de potasio que se prepara para un volumen de 100 ml con 2.3 ml de la solución CIA-Pak OFM Anion-BT (Waters) y 4.6 ml de concentrado de electrolito base cromato con una concentración de 4.6 mM.

Para la validación de los métodos se prepararon muestras estándar y se realizaron tres mediciones por muestra. Para determinar la reproducibilidad del método se calcularon valores promedio de las áreas respuesta, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada estándar. La reproducibilidad de este método fue mayor que 90%.

Para la cuantificación del tiosulfato la desviación estándar promedio ($D.S._{prom}$) fue 27.5 y el coeficiente de variación promedio ($C.V._{prom}$) fue 7.8%

Para la cuantificación del sulfato $D.S._{prom} = 56$ y $C.V._{prom} = 9.7\%$

Para la cuantificación del nitrito $D.S._{prom} = 195$ y $C.V._{prom} = 7.2\%$

Para la cuantificación del nitrato $D.S._{prom} = 76.8$ y $C.V._{prom} = 3.3\%$

Para la cromatografía iónica se utilizó un equipo dionex, con una columna tipo AS11-HC4, utilizando como eluente KOH a 30 mM a un flujo de 1.2 ml/min con un detector de conductividad. Para este caso la reproducibilidad del método fue 95%.

Para la cuantificación del tiosulfato $D.S._{prom} = 51095$ y $C.V._{prom} = 3.9\%$

Para la cuantificación del sulfato $D.S._{prom} = 490934$ y $C.V._{prom} = 9.3\%$

Para la cuantificación del nitrito $D.S._{prom} = 117065$ y $C.V._{prom} = 4.08\%$

Para la cuantificación del nitrato $D.S._{prom} = 70340$ y $C.V._{prom} = 2.59\%$

Cuantificación de nitrógeno, óxido nitroso, metano y bióxido de carbono.

Estos gases se cuantificaron por cromatografía de gases con un detector de conductividad térmica en una misma corrida. Para su cuantificación en el reactor operando en proceso continuo se consideró el volumen de gas producido por unidad de tiempo y el porcentaje del gas. Las especificaciones fueron: cromatógrafo de gases Varian 3350 con un detector de conductividad térmica y un integrador Shimadzu CR501 Chromatopac. La fase móvil fue helio a un flujo de 16 ml/min. Columna: 1.20 m de largo y 1/8 in de diámetro, empacada con Poropak Q de malla 80/100. Temperatura: columna 35 °C, inyector 100 °C, detector 110 °C, filamento 135 °C y un volumen de inyección de 50 µl de muestra.

Para la medición en lote, se prepararon estándares con botellas serológicas bajo las mismas condiciones de la prueba (espacio de cabeza, medio de cultivo) posteriormente se hizo pasar una corriente de helio y con una jeringa se tomó un volumen conocido del espacio de cabeza, este mismo volumen fue reemplazado con nitrógeno molecular, por último se tomó la muestra para determinar el área de respuesta en el cromatógrafo. Para calcular la concentración de nitrógeno en milimoles y posteriormente en mg/L en el espacio de cabeza, se consideró el volumen que ocupa una mol de nitrógeno en las condiciones de trabajo (30.54 L a $T = 25\text{ °C}$ y $P = 0.8\text{ atm}$), el espacio de cabeza (33 ml) y los mililitros de nitrógeno inyectados en las botellas. Se prepararon curvas estándar para concentraciones desde 90 hasta 450 mg/l de nitrógeno. La reproducibilidad de este método fue mayor que 95%. $D.S._{prom} = 29838$ y $C.V._{prom} = 3.8\%$

Cuantificación de carbono total.

El carbono orgánico e inorgánico se cuantificó con un analizador de carbón orgánico total (TOC) en un equipo Shimadzu. Se prepararon curvas patrón para concentraciones bajas (de 1 a 20 mg/l) y para concentraciones altas (de 100 a 500

mg/l), en donde se tuvo una respuesta lineal. Para el carbono orgánico se utilizó como reactivo el ftalato hidrógeno de potasio y para el inorgánico una mezcla de bicarbonato y carbonato. El equipo determina el carbono total y el carbono inorgánico. Por diferencia se puede obtener el carbono orgánico presente en la muestra. Las características del equipo son: TOC-5000 de ShimadzuTM, temperatura de combustión para determinar el carbono total: 680 °C, gas de arrastre: aire de alta pureza. Para la validación del método se prepararon seis muestras estándar y se realizaron tres mediciones por muestra. La reproducibilidad del método fue mayor que 95%. $D.S._{prom} = 264$ y $C.V._{prom} = 3.5\%$

Cuantificación de Sulfuro

El sulfuro se analizó con el método yodométrico descrito en el APHA (1985). El principio en el cual se basa ésta técnica es la reacción de óxido-reducción que se lleva a cabo entre el yodo y el sulfuro en solución ácida, éste último es oxidado por el yodo a azufre. La titulación de esta reacción estequiométrica permite determinar sulfuro a concentraciones superiores a 1 mg/L si no hay interferencias, por ejemplo, de sustancias reductoras que reaccionan con el yodo como el tiosulfato.

Se utilizó también el método de azul de metileno (Trüper y Schlegel 1964), en el cual el sulfuro reacciona con la dimetil-p-fenilendiamina para formar un complejo que posteriormente es oxidado por los iones de Fe (III) a azul de metileno. El volumen final de la muestra y reactivos fue 25 ml. El intervalo de concentraciones para el cual se tiene una respuesta lineal con esta técnica es de 0.1 a 0.9 mg S²⁻/L. Para determinar la reproducibilidad del método se prepararon cinco muestras de concentración conocida, se realizaron las lecturas a 670 nm, se tomaron los promedios, se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación. La reproducibilidad del método fue 95%. $D.S._{prom} = 0.014$ y $C.V._{prom} = 5\%$

Cuantificación de azufre elemental

El azufre elemental se cuantificó por la técnica de cianólisis (Bartlett y Skoog 1954), cuyo principio se basa en la formación de un complejo entre el cianuro y el sulfuro que se determina colorimétricamente por la adición de cloruro férrico y acetona. Este método es sensible para un intervalo de concentraciones entre 2 y 50 mg/L de azufre elemental. Para determinar la reproducibilidad del método se prepararon cinco muestras estándar, se efectuaron tres mediciones de absorbancia a 465 nm como se describe en la técnica. La reproducibilidad del método fue 93%. $D.S._{prom} = 0.042$ y $C.V._{prom} = 7\%$

Para la determinación de azufre elemental en la biomasa se tomó una muestra de lodos del reactor, se secó y posteriormente se dejó por espacio de 24 horas en éter de petróleo con el propósito de que el azufre se disolviera en el éter. Una vez hecho lo anterior se siguió la técnica de cianólisis tomando la muestra del éter de petróleo

Cuantificación de p-cresol y ácidos grasos volátiles

El *p*-cresol y los ácidos grasos volátiles se cuantificaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 con un detector de ionización de flama. Se prepararon curvas patrón de *p*-cresol y acetato en mezcla ya que se desarrolló un método para detectarlos en la misma corrida. El gas acarreador que se utilizó fue helio, el volumen de inyección fue de 1 μ L, temperatura inicial del horno 175 °C con una rampa de temperatura a los 2.5 minutos para disminuir 40 °C en un minuto, temperatura final del horno 135 °C. Columna capilar Nukol de sílica de 3 m de largo, 0.53 mm de diámetro. Para calcular la reproducibilidad del método se prepararon cinco muestras estándar, se calcularon los promedios de las áreas respuesta de cada una, la desviación estándar y el coeficiente de variación. La reproducibilidad del método para ambos compuestos fue mayor que 95%. Para el *p*-cresol $D.S._{prom} = 339$ y $C.V._{prom} = 0.5\%$, para el acetato $D.S._{prom} = 1804$ y $C.V._{prom} = 3.2\%$.

Determinación de sólidos suspendidos volátiles

Se determinaron de acuerdo al método descrito en el APHA (1985).

Cuantificación de Amonio

Para detectar el amonio se utilizó un electrodo de ion selectivo. La técnica consistió en agregar hidróxido de sodio a la muestra que contiene amonio con el propósito de tener amoniaco. La muestra se coloca en agitación constante y se realiza la lectura con un potenciómetro. El amoniaco se detecta al pasar por la membrana del electrodo y modificando el pH de la solución interna. Con este método se obtiene una respuesta lineal en un intervalo de concentración de 0.01 a 1000 mg/L de amoniaco. Para obtener la curva patrón se graficó el logaritmo de la concentración versus la lectura del potenciómetro en milivolts. Para determinar la reproducibilidad del método se prepararon cinco muestras estándar, se tomaron los valores promedio de la respuesta en milivolts, la desviación estándar y el coeficiente de variación. La reproducibilidad de este método fue mayor que 95%. $D.S._{prom} = 7.3$ y $C.V._{prom} = 4\%$

CAPÍTULO 4

4. Resultados y discusión

4.1. Etapa 1. Reactor de tanque agitado

Condiciones desnitrificantes organotróficas

Estado inicial. $Q_{C-ace}=0.717$ g/L-d, $Q_{N-NO_3^-}=0.504$ g/L-d relación C/N = 1.42 (ecuación 1, página 11). Con estas condiciones de operación se alcanzó el estado estacionario desnitrificante después de 6 TRH. En estas condiciones, la velocidad volumétrica promedio del nitrógeno molecular fue $Q_{N_2}=0.573 \pm 0.04$ g/L-d. El acetato fue mineralizado hasta bióxido de carbono. Dado el valor de pH, el bióxido de carbono se encontró principalmente como bicarbonato (HCO_3^-). La velocidad volumétrica promedio de carbono inorgánico total, calculado como la suma de carbono de bicarbonato y de CO_2 , fue $Q_{Cinorgtot}=0.54 \pm 0.04$ g/L-d.

La eficiencia en la eliminación de nitrato fue en promedio del 100%, y para el acetato fue en promedio $98\% \pm 1.21$. El proceso desnitrificante se llevó a cabo en forma completa, teniendo un rendimiento promedio en la producción de nitrógeno molecular ($Y_{gN_2/gN-NO_3}$) de 1.07 ± 0.1 . Considerando el rendimiento obtenido y que no se tuvo un crecimiento significativo en la biomasa se puede deducir que el proceso fue principalmente desasimilativo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Reyes y col. (2004) para un cultivo en estado estacionario con acetato y nitrato a una relación C/N de 1.45, donde las velocidades de carga fueron $Q_{C-ace}=0.303$ g/L-d y $Q_{N-NO_3^-}=0.209$ g/L-d y el rendimiento en la producción de nitrógeno ($Y_{gN_2/gN-NO_3}$) fue de 0.93 ± 0.05 .

Condiciones desnitrificantes lito-organotróficas.

Tomando como base el estado estacionario del reactor, se disminuyó gradualmente la velocidad de carga del acetato y se sustituyó por sulfuro. Se consideró la relación S/N de 1.43 para oxidar el sulfuro hasta sulfato de acuerdo con la estequiometría de la ecuación 5, página 12. La velocidad de carga del nitrato fue constante para todas las fases, las relaciones C/N y S/N fueron variables sin que el nitrato se encontrara en forma limitada. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 9 y 10 y Tablas 7 y 8.

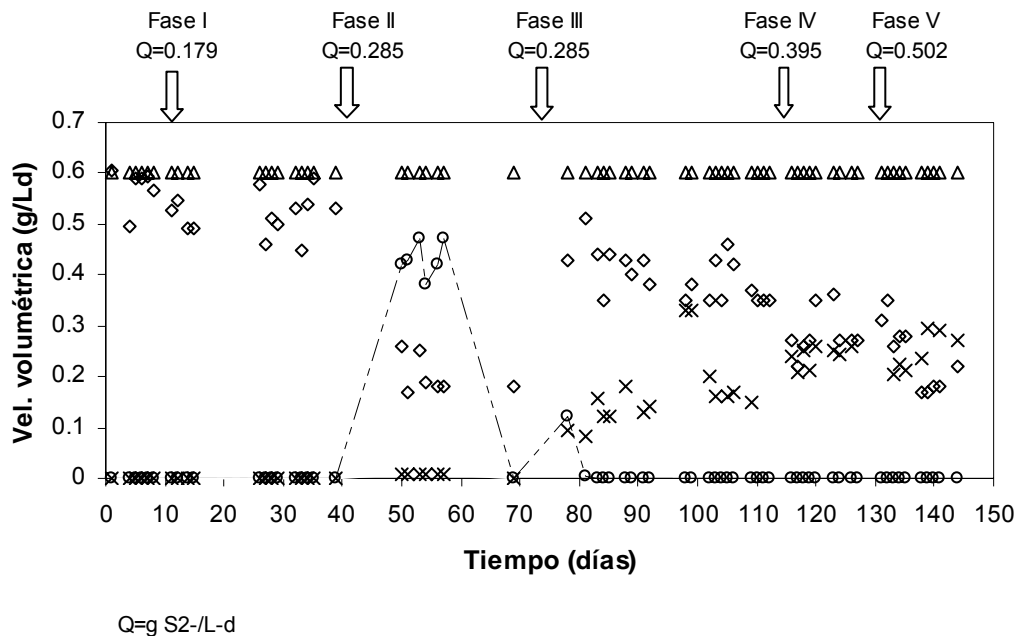


Figura 9. Reactor de tanque agitado en condiciones lito-organotróficas. Perfil de velocidad de los compuestos nitrogenados en las fases I, II, III, IV y V. Velocidad de carga de N-NO₃⁻ (Δ), velocidad volumétrica N₂ (◇), velocidad volumétrica de N-N₂O (--○--), velocidad volumétrica N-NO₂⁻ (x)

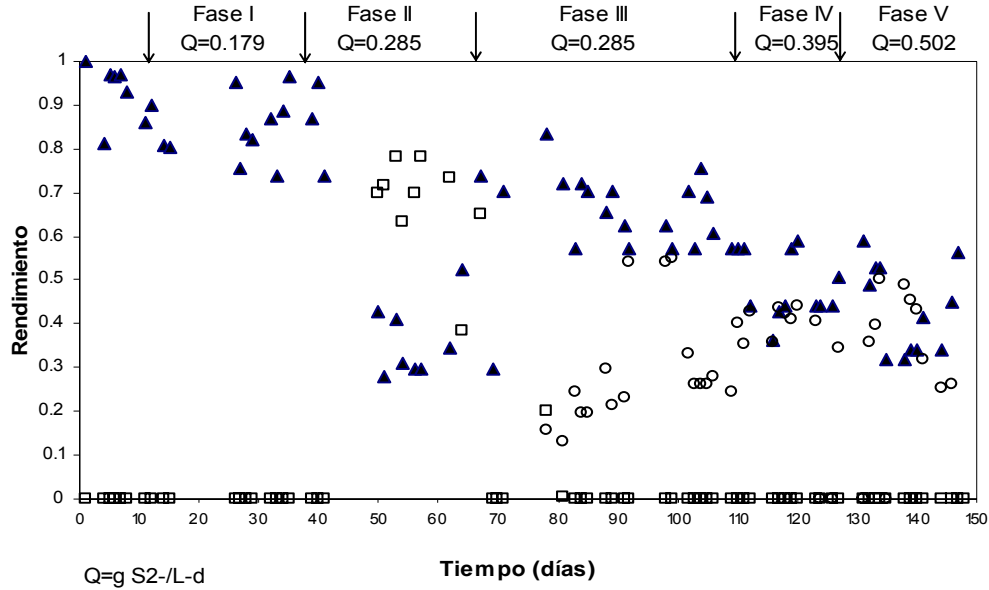


Figura 10. Reactor de tanque agitado en condiciones lito-organotróficas durante las fases I, II, III, IV, V. Valores de rendimiento en la producción de nitrógeno $Y_{gN_2/gN-NO_3}$ (▲), óxido nítrico $Y_{gN-N_2O/gN-NO_3}$ (□) y nitrito $Y_{gN-NO_2/gN-NO_3}$ (○)

Tabla 7. Eficiencias y rendimientos en el reactor de tanque agitado de los compuestos del azufre bajo condiciones desnitrificantes lito-organotróficas

Fases	Eficiencia elimin. S^{2-} (%)	$Y_{S-SO_4/S^{2-}}$ (gS-SO ₄ /gS ²⁻)	$Y_{S_0/S^{2-}}$ (gS ⁰ /gS ²⁻)	$Y_{S-S_2O_3/S^{2-}}$ (gS-S ₂ O ₃ /gS ²⁻)	$Y_{S-total}$ (SO ₄ +S ⁰ +S ₂ O ₃)
Fase I Q=0.179	90 ± 9.74	0.57 ± 0.18	0.42 ± 0.26	0	0.99
Fase II Q=0.285	100	0.11 ± 0.06	0.8 ± 0.88	0	0.91
Fase III Q=0.285	100	0	0.8 ± 0.88	0.2 ± 0.06	1
Fase IV Q=0.395	100	0.33 ± 0.14	0.05	0.14 ± 0.03	0.52
Fase V Q=0.502	100	0.2 ± 0.05	N.D.	0	0.2

Q=g S²⁻/L-d

N.D.= No determinado

Eficiencia = {consumo del compuesto (g/L) / concentración inicial del compuesto (g/L)*100}

Tabla 8. Eficiencia de eliminación de nitrato y acetato, rendimientos compuestos del nitrógeno en el reactor de tanque agitado condiciones desnitrificantes lito-organotróficas

	Eficiencia Elimin. NO_3^- (%)	Eficiencia Elimin. CH_3COO^- (%)	$Y_{\text{N}_2/\text{N-NO}_3}$ (g N_2 /gN- NO_3)	$Y_{\text{N-N}_2\text{O}/\text{N-NO}_3}$ (gN- N_2O /gN- NO_3)	$Y_{\text{N-NO}_2/\text{N-NO}_3}$ (gN- NO_2 /gN- NO_3)	$Y_{\text{N-total}}$ ($\text{N}_2+\text{N}_2\text{O}+\text{NO}_2$)
Estado Inicial	100	98 ± 1.21	0.99 ± 0.06	0	0	0.99
Fase I <i>Q=0.179</i>	100	96 ± 4.26	0.94 ± 0.08	0	0	0.94
Fase II <i>Q=0.285</i>	100	98 ± 2.16	0.3 ± 0.03	0.71 ± 0.05	0	1.01
Fase III <i>Q=0.285</i>	100	96 ± 2.92	0.7 ± 0.06	0	0.2 ± 0.09	0.9
Fase IV <i>Q=0.395</i>	100	98 ± 0.6	0.5 ± 0.09	0	0.38 ± 0.04	0.88
Fase V <i>Q=0.502</i>	97 ± 0.93	98.5 ± 1	0.46 ± 0.12	0	0.45 ± 0.06	0.91

$Q = \text{g S}^2/\text{L-d}$

Eficiencia = {consumo del compuesto (g/L)/concentración inicial del compuesto (g/L)*100}

En la Figura 9 se observa el perfil de velocidad de los diferentes compuestos nitrogenados para las fases I, II, III, IV y V y en la Figura 10 los valores de rendimiento de los compuestos del nitrógeno en las fases.

En la Tabla 7 se muestran los promedios para las variables de respuesta eficiencia y rendimiento de los compuestos del azufre, en las diferentes fases descritas. En la Tabla 8 se presentan los valores promedio de eliminación de nitrato y acetato y rendimientos de nitrógeno, óxido nitroso y nitrito.

Fase I.- En esta fase se disminuyó la velocidad de carga de alimentación del acetato en 25%, para tener $Q_{\text{c-ace}}=0.535$ g/L-d e iniciar con una velocidad de carga de sulfuro de $Q_{\text{S}^{2-}}= 0.179$ g/L-d; a partir de esta fase se adicionó bicarbonato de sodio al medio de cultivo de acuerdo a los datos de la Tabla 4. Estas condiciones de trabajo se mantuvieron por espacio de 14.5 TRH's. Como resultado de este primer cambio, se observó que bajo estas condiciones el metabolismo desnitrificante del cultivo no se

alteró, ya que el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular no se modificó significativamente ($Y_{N_2/N-NO_3}=0.94 \pm 0.08$) y la eficiencia en el consumo del nitrato fue 100%.

En el caso de las especies del azufre, la eficiencia en la eliminación de sulfuro fue en promedio del $90\% \pm 9.74$. Aproximadamente el 50% del sulfuro consumido fue oxidado completamente por el consorcio hasta sulfato ($Y_{S-SO_4/S_2^-}=0.57 \pm 0.18$), mientras que el resto se detectó en forma de azufre elemental contenido en la biomasa ($Y_{S^0/S_2^-}=0.42 \pm 0.26$). Por otro lado, la eficiencia en la eliminación de carbono de acetato fue en este caso del $96\% \pm 4.26$. El carbono consumido por el consorcio fue mineralizado hasta carbono inorgánico, dadas las condiciones de pH el CO_2 se encontraba principalmente como bicarbonato.

Estos períodos de acumulación y consumo de azufre elemental coinciden con lo reportado por Gommers y col. (1988), aunque en el caso de éstos investigadores el nitrato se encontraba presente en exceso con respecto a las relaciones estequiométricas del sulfuro y acetato presentes.

Fase II.-El siguiente cambio consistió en disminuir la velocidad de carga del acetato en 40% respecto a la original. Las velocidades de carga de carbono de acetato y sulfuro para esta etapa fueron de: $Q_{C-ace}=0.43$ g/L-d y $Q_{S^{2-}}=0.285$ g/L-d respectivamente. El reactor se operó durante 14 TRH's. Como resultado de este cambio, el metabolismo desnitrificante del cultivo se afectó, produciendo principalmente óxido nitroso ($Y_{N-N_2O/N-NO_3}=0.71 \pm 0.05$), la eficiencia en la eliminación del nitrato se mantuvo en niveles del 100%. El consumo de carbono de acetato fue en promedio del $98\% \pm 2.16$. El consumo de sulfuro fue total, oxidándose parcialmente y acumulándose como azufre elemental en la biomasa. La disminución del rendimiento en la producción de nitrógeno molecular y la acumulación de azufre elemental en la biomasa podrían deberse a la inhibición de la enzima que reduce el óxido nitroso hasta nitrógeno. En un estudio llevado a cabo por Sorensen y col.

(1980) con *Pseudomonas fluorescens* en condiciones desnitrificantes, encontraron que el sulfuro inhibe la reducción del óxido nitroso hasta nitrógeno molecular, provocando la acumulación del primero durante el proceso desnitrificante.

Fase III.- En esta fase, coincidiendo con un aumento del 32%, respecto al bicarbonato de sodio adicionado al medio, el metabolismo desnitrificante del cultivo cambió, teniendo como principal producto nitrógeno molecular y se detectó en menor proporción nitrito. Una vez alcanzado el estado estacionario, los rendimientos promedio fueron: $Y_{N_2/N-NO_3} = 0.7 \pm 0.06$ y $Y_{N-NO_2/N-NO_3} = 0.2 \pm 0.09$. Kim y Bae (2000) detectaron óxido nitroso (N_2O) en un reactor de lecho empacado utilizando azufre elemental en condiciones desnitrificantes. Reportaron que el N_2O disminuía al disminuir la velocidad de carga del nitrógeno de 2.5 g N- $NO_3/L-d$ a 1.7 g N- $NO_3/L-d$ y por otro lado al incrementar la velocidad de carga del $CaCO_3$ en el influente de 8.2 g/L-d a 13.1 g/L-d, el N_2O producido a partir del nitrato que se consumió, disminuyó de 40% a 28% con un incremento en la producción de nitrógeno molecular de 56%. Ellos proponen que el incremento en la alcalinidad puede disminuir la producción de N_2O logrando que la desnitrificación sea completa aunque no mencionan cuál sería el fundamento.

En el caso del trabajo realizado por Reyes y col. (2004) para un proceso desnitrificante teniendo acetato y sulfuro como fuentes reductoras, no reportan la presencia significativa de intermediarios de la vía desnitrificante. Es importante mencionar que en su caso el sistema se encontraba limitado en cuanto al nitrato.

Durante la Fase III del presente estudio el sulfuro fue consumido en su totalidad manteniéndose esta tendencia en las siguientes fases. El principal producto de la oxidación del sulfuro fue azufre elemental acumulado en la biomasa. Se detectó tiosulfato con un rendimiento de $Y_{S-S_2O_3} = 0.2 \pm 0.06$ y no se detectó la presencia de sulfato. En la Figura 10 se puede observar el rendimiento de los productos encontrados para el proceso desnitrificante en las fases I, II y III. Una vez que el

sistema recuperó su capacidad desnitrificante, se trabajó con las mismas condiciones por espacio de 23 TRH's.

Fase IV.- La velocidad de carga de acetato se disminuyó para tener el 45% con respecto a la original. Las condiciones fueron: $Q_{c-ace} = 0.322$ g/L-d y $Q_S^{2-} = 0.395$ g/L-d. En esta fase, el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular ($Y_{N_2/N-NO_3}$) fue de 0.5 ± 0.09 , de nitrito ($Y_{N-NO_2/N-NO_3}$) fue 0.38 ± 0.038 y no se detectó óxido nitroso. El porcentaje de eliminación del sulfuro fue del 100%, los productos de la oxidación del sulfuro fueron tiosulfato, azufre elemental y sulfato, que presentaron un perfil oscilatorio; pudiendo estar presentes otros intermediarios, dado los valores de rendimiento de los productos de la oxidación del sulfuro que se muestran en la tabla 7. El reactor se operó en estas condiciones por 8 TRH's. La tendencia al aumentar la velocidad de carga del sulfuro y disminuir la del acetato es un menor rendimiento en la producción de nitrógeno molecular, con el aumento en la producción de nitrito.

Fase V.- La velocidad de carga del acetato se disminuyó 70% respecto a la carga inicial. Las condiciones fueron las siguientes: $Q_{c-ace} = 0.215$ g/L-d y $Q_S^{2-} = 0.502$ g/L-d. En estas condiciones, el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular ($Y_{N_2/N-NO_3}$) fue de 0.46 ± 0.12 , de nitrito ($Y_{N-NO_2/N-NO_3}$) fue 0.45 ± 0.06 . El consumo de sulfuro fue total, se detectó la presencia de sulfato en forma oscilatoria. No se cuantificó el azufre elemental.

La disminución de la capacidad de los microorganismos para llevar a cabo el proceso desnitrificante en forma completa, que tiene como consecuencia la producción de intermediarios como el óxido nitroso o el nitrito, parece estar en función del aumento de la velocidad de carga del sulfuro (Visser y col. 1997) y del metabolismo en la oxidación del sulfuro hasta sulfato (Gevertz y col. 2000). Los datos parecen indicar que el paso limitante es la oxidación del azufre elemental a sulfato. Una posible explicación podría ser la inhibición de la enzima óxido nitroso reductasa con la consecuente acumulación de óxido nitroso (Sorensen 1980, Schönharting y col.

1998). Otra teoría (Betlach y Tiedje 1981) para explicar los resultados está relacionada con la velocidad de reacción del paso limitante. La velocidad de reacción de la oxidación del azufre a sulfato sería menor que la de la reacción que da origen a la formación de azufre elemental.

Hooper y DiSpirito (1985) mencionan que la enzima azufre oxigenasa ha sido parcialmente purificada en algunos miembros del género *Thiobacillus* y que esta enzima cataliza la oxidación de azufre a sulfito, el sulfito se oxida por vía no enzimática a tiosulfato y este posteriormente es oxidado a sulfato por acción de la tiosulfato citocromo c oxidoreductasa, aunque los autores mencionan que los intermediarios propuestos no habían sido detectados. Esto último podría deberse a los métodos de detección utilizados, o a que los microorganismos utilizan una vía diferente a la propuesta. Para tratar de explicar la acumulación de azufre elemental pueden postularse las siguientes teorías:

- a) la cadena de transporte de electrones se encuentra afectada,
- b) el producto final depende del tipo de microorganismo,
- c) la(s) enzima(s) que oxida(n) el azufre elemental se encuentra(n) inhibida(s) (lleva a cabo la reacción a menor velocidad o su actividad específica es menor),
- d) si suponemos que la formación de azufre elemental se lleva a cabo en el periplasma (de acuerdo con la vía ramificada de oxidación del tiosulfato), entonces el transporte al citoplasma podría ser el paso limitante (Brüser y col. 2000).

Los resultados del presente trabajo indican que además de la relación S/N existen otros factores que pueden afectar la vía de oxidación del sulfuro y por lo tanto la obtención del producto final (sulfato o azufre elemental). Son varios los autores que describen al sulfuro como tóxico para los microorganismos pero no dan información que detalle los mecanismos por los cuales resulta tóxico. Durante el tiempo que se operó el reactor de tanque agitado en este proyecto no se detectó la presencia de sulfuro en el efluente, por lo que no es posible sustentar la teoría de la inhibición

enzimática por sulfuro. La teoría que parece explicar mejor la acumulación de azufre elemental que se detectó en el presente estudio es la de la saturación de la cadena de electrones.

Visser y col. (1997) realizaron un estudio con *Thiobacillus neapolitanus* y *Thiobacillus* sp. cepa W5 con sulfuro y nitrato en condiciones aerobias en un reactor de tanque agitado y determinaron a través de un espectrofotómetro con luz UV visible la reserva del citocromo c. Probaron diferentes velocidades de carga del sulfuro (manteniendo la concentración de oxígeno disuelto al 50% con relación a la saturación del aire) observando en *Thiobacillus* sp. que, hasta una velocidad de carga de 6.91 g/L-d de sulfuro, el sulfato es el único producto detectable y notaron una reducción en los niveles de reserva del citocromo c conforme se incrementaba la velocidad de carga del sulfuro. Velocidades de carga de sulfuro de 6.92 a 21.88 g/L-d dieron como productos sulfato y azufre elemental, a partir de 21.88 g/L-d de sulfuro el azufre elemental fue el producto principal y la reducción de los niveles del citocromo c alcanzó el 95%. Los investigadores mencionan que cuando la velocidad de carga del sulfuro excede la capacidad oxidativa del sistema, en términos del flujo de electrones, hay una redistribución de los mismos, produciéndose entonces azufre elemental y de continuar el incremento de velocidad de carga de sulfuro su eficiencia de eliminación disminuye.

La acumulación de azufre elemental en el presente estudio se podría deber entonces a la saturación de la cadena de electrones, que estaría en función de la capacidad oxidativa de los microorganismos presentes. Relacionando esta información con la vía desnitrificante, y para un sistema no limitado por el nitrato, los intermediarios en la reducción del nitrato a nitrógeno molecular pueden explicarse como la falta de poder reductor (oxidación incompleta del sulfuro). Para tener entonces un mayor control sobre el proceso sería necesario determinar la capacidad máxima oxidativa, es decir la velocidad de carga de sulfuro máxima en la cual el único producto sea sulfato (de acuerdo con la relación estequiométrica S/N) teniendo en cuenta que a

velocidades de carga de sulfuro mayores se tendrá entonces, además de sulfato, azufre elemental.

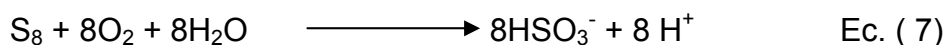
Para comparar el presente estudio (condiciones desnitrificantes) con lo reportado por Visser y col. 1997, es importante considerar la información encontrada sobre el genoma de *Thiobacillus denitrificans*. Beller y col. (2006) reportan que *Thiobacillus denitrificans* tiene varias vías de oxidación y copias múltiples de genes asociados con la oxidación del azufre. Los genes que se detectaron como críticos en la oxidación de compuestos del azufre son: *sox* (oxidación del azufre), genes *dsr* (sulfito reductasa desasimilativos) y genes asociados con la oxidación dependiente del AMP del sulfito a sulfato. Dentro del complejo de genes tipo *sox* se encuentran genes que codifican para los citocromos tipo *c* (*soxE*), para una proteína oxidoreductasa flavocitocromo-*c* (*soxRS*) y otros que han sido reportados con una función regulatoria (*soxGH*). La cepa ATCC 25259 *T. denitrificans* tiene un mayor número de genes para citocromos tipo *c* en comparación con la mayoría de las bacterias de las cuales se ha secuenciado su genoma (aproximadamente 2% de la secuencia codificadora).

En el caso de la teoría para explicar la producción de azufre elemental, en términos del tipo de microorganismo, se tiene la siguiente información de referencia: Gevertz y col. (2000) trabajaron con dos géneros bacterianos con diferentes relaciones S/N y encontraron que ambos fueron capaces de oxidar el sulfuro hasta azufre elemental en presencia de nitrato. Sólo una (*Thiomicrospira* sp. cepa CVO) fue capaz de completar la oxidación hasta sulfato lo cual estaba en función de la relación S/N, el sulfuro es oxidado parcialmente hasta azufre elemental cuando el nitrato es limitante. Detectaron óxido nitroso como intermediario de la reducción del nitrato para la cepa CVO a una concentración de 3.0 mM de sulfuro. Ellos afirman que la acumulación de óxido nitroso se debe a la inhibición de la enzima óxido nitroso reductasa por la presencia del sulfuro, en este caso en una prueba en lote.

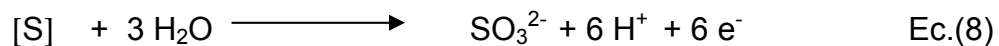
La información que permitiría explicar la teoría relacionada con la inhibición enzimática y las velocidades de reacción no es muy clara debido a que se han descrito diversas vías de oxidación del azufre y a la falta de información de las enzimas involucradas. Kelly y col. (1997) mencionan que existen al menos dos vías principales para explicar la oxidación del tiosulfato (sulfuro y azufre). Una de ellas se conoce como la vía PSO por sus siglas en inglés (*Paracoccus sulfur oxidation*), o del complejo multi-enzimático (descritas anteriormente), esta vía parece prevalecer entre los organismos heterótrofos facultativos como *Paracoccus* y *Xanthobacter*. La otra se conoce como la vía de los intermediarios S4 o S4I por sus siglas en inglés (descrita como vía del tetrionato en la introducción), la cual involucra la presencia de politionatos como intermediarios y es característica de los organismos quimiolitotróficos obligados como el género *Thiobacillus*.

Mencionan que un factor que ha llamado la atención es la acumulación frecuente y transitoria de azufre elemental y/o politionatos durante la oxidación de sulfuro y tiosulfato. La formación de azufre o tetrionato no siempre es estequiométrica, lo que da origen a una confusión en cuanto al papel y origen de estos intermediarios. El problema parece radicar en que hay algunas pruebas en donde se ha comprobado a qué nivel se da la oxidación (citoplasma, periplasma) para un sustrato, pero sólo hay evidencia indirecta de dónde se lleva a cabo la oxidación del siguiente sustrato.

Dentro de las dos vías principales mencionadas anteriormente, solamente pocas enzimas han sido demostradas como catalizadoras de reacciones clave (Kelly y col. 1997). Uno de los problemas que no ha sido resuelto completamente es la enzimología de la conversión de azufre elemental a sulfato y si el sulfito está implicado como intermediario en algunos casos o en todos. Kelly y col. (1997) refieren que una enzima que se ha caracterizado de algunas fuentes es la sulfuro oxigenasa (*Thiobacillus* y *Sulfolobus*) que cataliza la oxidación directa de azufre para producir sulfito de acuerdo con la siguiente reacción:



Sin embargo, esta reacción no podría explicar la oxidación de compuestos inorgánicos del azufre por vía aneorobia como es el caso de la desnitrificación. Beffa y col. (1991, 1992, 1993) han estudiado algunas cepas de *Thiobacillus* y *Paracoccus* en donde han obtenido evidencia de que la oxidación del azufre no se lleva a cabo por una oxigenasa, sino que se da a través de reacciones oxidativas que transfieren electrones a través de la cadena respiratoria a diferentes niveles redox, dependiendo del microorganismo involucrado (por ejemplo quinona/citocromo *b* o al citocromo *c*). Lo que aún no se ha explicado en detalle es el mecanismo por el cual el azufre es transformado a sulfito (SO_3^{2-}) o a sulfato directamente. Se ha descrito la presencia de una enzima sulfito reductasa sirohemo en *T. denitrificans* la cual, para esta bacteria y para otros quimiolitótrofos, puede estar asociada a la oxidación del azufre a sulfito mediante una reacción de fosforilación por transporte de electrones (Kelly 1999). La reacción propuesta para *T. denitrificans* en condiciones anaerobias es:



Debido a que uno de los objetivos de este estudio fue aportar mayor información para la caracterización del proceso utilizando compuestos fenólicos, se montaron tres reactores UASB bajo condiciones desnitrificantes, el reactor 1 trabajó con sulfuro, el reactor 2 con sulfuro y *p*-cresol y el reactor 3 con *p*-cresol. Los reactores 1 y 3 sirvieron como referencia para comparar los resultados del reactor 2.

4.2. Etapa 2. Reactores UASB

Características del inóculo

El inóculo para los reactores UASB (10 g SSV/L) se tomó de un reactor continuo de flujo ascendente el cual operaba en condiciones desnitrificantes litotróficas con tiosulfato como donador de electrones. La eficiencia promedio de eliminación de nitrato en este reactor fue de 84% y para el tiosulfato fue de 99.8%. El rendimiento en la producción de sulfato fue 0.78. Cabe mencionar que las velocidades volumétricas de alimentación del nitrato y del tiosulfato, así como las de producción del sulfato presentaron variaciones mayores que 10%.

Condiciones desnitrificantes litotróficas, organotróficas y lito-organotróficas

Reactor 1.- Este reactor trabajó en condiciones desnitrificantes litotróficas con sulfuro como donador de electrones durante 152 días con las siguientes velocidades de carga: $Q_{S^{2-}} = 0.256$ g/L-d, $Q_{N-NO_3^-} = 0.179$ g/L-d, con una relación molar S/N de 1.43 que corresponde con la estequiometría para oxidar el sulfuro presente hasta sulfato de acuerdo con la ecuación 5, página 12. Bajo estas condiciones, la eficiencia en la eliminación de nitrato fue en promedio de $90\% \pm 8.74$. La desnitrificación no se llevó a cabo completamente detectándose nitrito como intermediario, el cual alcanzó un rendimiento promedio de $Y_{N-NO_2/N-NO_3} = 0.49 \pm 0.25$. Al comienzo del experimento no se analizó el biogás, sin embargo, se asumió que sólo hubo N_2 . Bajo este supuesto, para el reactor 1 el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular ($Y_{N_2/N-NO_3}$) fue de 0.39 ± 0.33 , posteriormente se llevaron a cabo algunas pruebas en el cromatógrafo en las cuales no se detectó óxido nitroso. En la Figura 11 se presenta el porcentaje de nitrato consumido así como el porcentaje de nitrito y nitrógeno molecular producido en el tiempo.

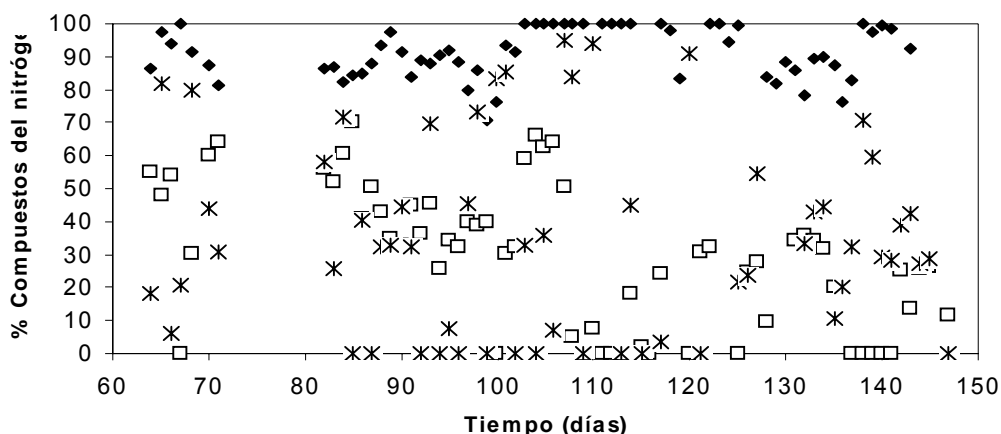


Figura 11. Porcentaje de compuestos del nitrógeno en el reactor UASB 1. Porcentaje de eliminación de nitrato $\%N-NO_{3elim}$ (◆), porcentaje de producción de nitrito $\%N-NO_{2prod}/N-NO_{3elim}$, (□) porcentaje de producción de nitrógeno molecular $\%N_{2prod}/N-NO_{3elim}$ (*) en el tiempo.

Como se puede observar el metabolismo desnitrificante del cultivo fue irregular, sin alcanzar el estado estacionario durante el lapso de tiempo en que fue operado el reactor. Considerando los rendimientos de las especies de nitrógeno formadas, se puede notar que del total de nitrógeno consumido existe una fracción que no fue cuantificado como producto (nitrito y nitrógeno molecular). La fracción faltante pudo ser óxido nitroso dado que el reactor no se encontraba en estado estacionario (Sublette y Sylvester 1987).

La eficiencia en la eliminación de sulfuro fue en promedio $99\% \pm 0.79$, una fracción del sulfuro fue oxidado completamente hasta sulfato ($Y_{S-SO_4/S_2} = 0.56 \pm 0.27$) y no se detectó la presencia de tiosulfato en el efluente. Se dedujo la presencia de azufre elemental debido a la formación de una película blanquecina en la biomasa.

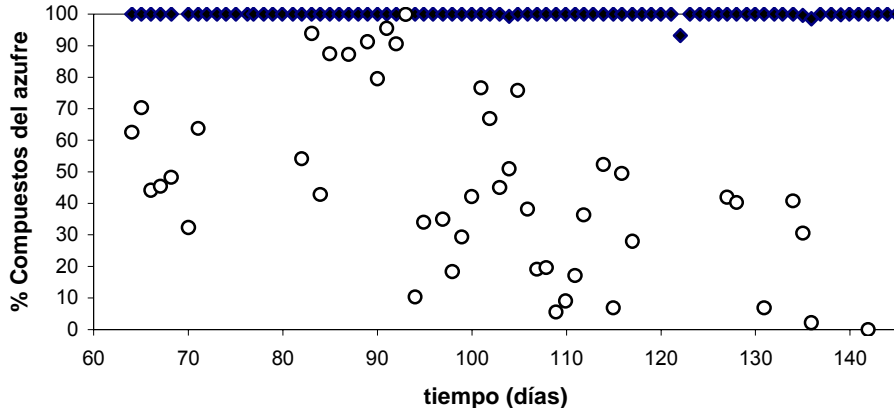


Figura 12. Porcentaje de los compuestos del azufre en el reactor UASB 1. Porcentaje de eliminación de sulfuro $\%S^{2-}_{elim}$ (♦), porcentaje de producción de sulfato $\%S-SO_4_{prod}/S^{2-}_{elim}$ (O) en el tiempo.

En la Figura 12 está representado el porcentaje de sulfuro consumido y de sulfato producido a lo largo del tiempo. En este caso también se pueden observar periodos oscilatorios en la producción de sulfato. Son pocos los trabajos encontrados que hacen referencia a la desnitrificación con sulfuro ya que éste es considerado un sustrato inhibitorio. En algunos casos se han realizado pruebas en lote (Krishnakumar y Manilal 1999) y también se han reportado trabajos en continuo con sulfuro (Sublette y Sylvester 1987; Kleerebezem y Méndez 2002). Sublette y Sylvester (1987) utilizaron un reactor de tanque agitado en continuo para eliminar sulfuro a través de la desnitrificación. Probaron diferentes concentraciones de sulfuro: 1.45 - 3.35 mmol H_2S/h a una velocidad de dilución de $0.029 h^{-1}$ que en términos de velocidad de carga de sulfuro fueron de 0.737 - 1.7 g $S^{2-}/L-d$ y mencionan que en el estado estacionario no detectaron óxido nitroso ni nitrito en forma significativa (0.3 - 5.4 μM). Posteriormente incrementaron en forma paulatina la velocidad de alimentación del H_2S hasta que el reactor se desestabilizaba, detectando un incremento en la producción de N_2O y acumulación de azufre elemental en el reactor, con esos datos calcularon las velocidades máximas de operación. Los autores reportaron una velocidad máxima volumétrica de 2.3 mmol $H_2S/L-h$ (1.87 g $H_2S/L-d$), las relaciones S/N que aplicaron variaron de 1.6 a 1.9 y

encontraron crecimiento de la biomasa. En el caso del reactor UASB 1 la velocidad de carga del sulfuro fue de $0.33 \text{ mmol S}^{2-}/\text{L-h}$ ($0.256 \text{ g S}^{2-}/\text{L-d}$) que es un orden de magnitud menor en comparación con la velocidad máxima volumétrica del trabajo de Subbete y Sylvester (1987). A velocidades menores, ellos no detectan intermediarios de la desnitrificación y el sulfuro es oxidado hasta sulfato. Kleerebezem y Méndez (2002) reportan para un reactor de lecho fijo que a velocidades de carga de 0.3 a $3 \text{ g S}^{2-}/\text{L-d}$, el 80% del sulfuro es oxidado a sulfato. Al incrementar la velocidad de carga de 3 a $4 \text{ g S}^{2-}/\text{L-d}$ ellos mencionan que se alcanzó la capacidad máxima de producción de sulfato, ya que en el efluente no se detectó un aumento en el sulfato y el balance indicó que se tenían otros productos del azufre. No cuantificaron azufre elemental pero suponen que ese fue el producto acumulado. En cuanto a los compuestos del nitrógeno no mencionan específicamente los intermediarios que detectaron, sólo refieren que el nitrato fue adicionado en exceso en cuanto al requerido para oxidar completamente el sulfuro a sulfato. Los autores consideran una relación estequiométrica S/N de 1.75 tomando en cuenta el crecimiento celular. Posteriormente disminuyeron la velocidad de carga del sulfuro a $0.5 \text{ g S}^{2-}/\text{L-d}$ y detectaron un incremento en la producción de sulfato, concluyendo que a pesar de tener el nitrato suficiente para oxidar el sulfuro a sulfato, se acumula azufre elemental cuando se tienen velocidades de carga elevadas (mayores a $3 \text{ g S}^{2-}/\text{L-d}$). La tendencia de los estudios con sulfuro y nitrato en condiciones desnitrificantes indica que, además de la relación estequiométrica S/N, existen otros factores que determinan el producto o productos finales de la vía de oxidación del sulfuro como el tipo de microorganismos y su capacidad máxima de oxidación del sulfuro.

Reactor 2.- Con el propósito de analizar la competencia entre ambos donadores de electrones, el reactor operó con sulfuro y *p*-cresol durante 152 días, y las velocidades de carga fueron: $Q_{\text{S}^{2-}} = 0.256 \text{ g/L-d}$, $Q_{\text{p-cresol}} = 0.202 \text{ g/L-d}$, $Q_{\text{N-NO}_3^-} = 0.179 \text{ g/L-d}$. La concentración de nitrato presente fue la necesaria para que, a través de la desnitrificación, se oxidara uno de los dos donadores de electrones. El sulfuro hasta sulfato a una relación S/N 1.43 (relación molar estequiométrica de acuerdo con la

ecuación 5, página 12) o el *p*-cresol hasta CO₂ (relación C/N de 1 estequiometría de la ecuación 2, página 11), por lo que el sistema se encontraba limitado por el aceptor de electrones (nitrato). Este caso es interesante ya que tanto el sulfuro como el *p*-cresol son considerados como compuestos potencialmente tóxicos para los microorganismos. Khoury y col. (1992) en una prueba en lote con fenol en condiciones desnitrificantes, reportaron inhibición por sustrato en concentraciones mayores que 1mM (94 mg/l). En el reactor 2, la eficiencia promedio para la eliminación de nitrato fue del 99% ± 2.2, sin detectarse la presencia de nitrito. El rendimiento de nitrógeno molecular fue en promedio de 0.94 ± 0.43 y no se detectó la presencia de óxido nitroso. A pesar de que el promedio del rendimiento en la producción de nitrógeno molecular fue alto, no se puede decir que el cultivo se encontraba en estado estacionario, pues las velocidades volumétricas de producción de nitrógeno presentaron variaciones significativas.

El aumento en la producción de nitrógeno molecular, respecto al reactor UASB 1, puede explicarse considerando que en el reactor 2 se tienen dos donadores de electrones (sulfuro y *p*-cresol) que reducen al nitrato o a los intermediarios de la desnitrificación. En este caso, tanto el sulfuro como el *p*-cresol tuvieron altas eficiencias de eliminación (mayores que 98%), y se detectaron intermediarios en la oxidación de estos compuestos. La eficiencia en la eliminación de sulfuro fue en promedio 99% ± 0.87, el rendimiento en la producción de sulfato fue de 0.67 ± 0.41, no se detectó tiosulfato y se asumió la formación de azufre elemental por la formación de la película blanquecina en el cultivo. En la Figura 13 se puede observar el porcentaje de eliminación de sulfuro y de formación de sulfato.

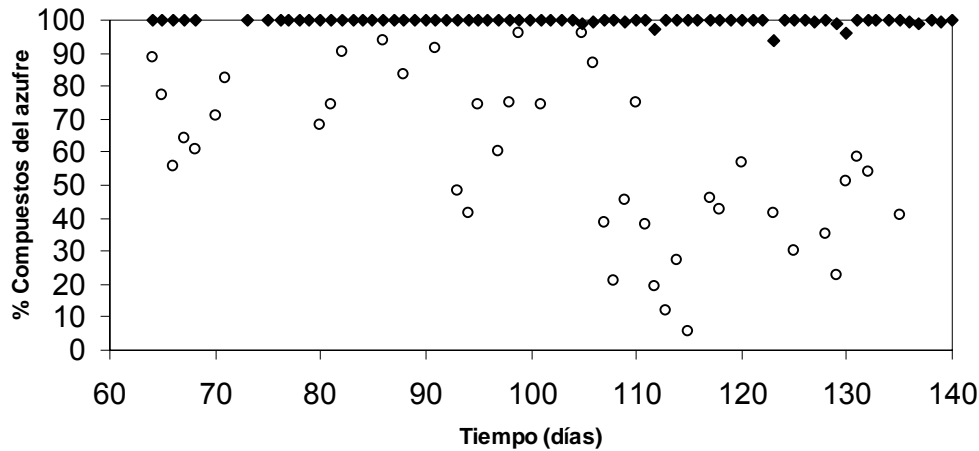


Figura 13. Porcentaje compuestos del azufre en el reactor 2. Porcentaje de eliminación de sulfuro $\%S^{2-}_{elim}$ (◆), porcentaje de producción de sulfato $\%S-SO_4_{prod}/S^{2-}_{elim}$ (○) en el tiempo.

La eficiencia en la eliminación de *p*-cresol fue en promedio $98\% \pm 4.2$; sin embargo, no se llevó completamente hasta CO_2 , detectándose carbono orgánico en el efluente. Al analizar una muestra del efluente para identificar ácidos grasos volátiles se detectó solamente acetato representando 30% del total del carbono orgánico presente, lo cual indicó que se tenían otros intermediarios.

El reactor 3 trabajó en condiciones organotróficas con una $Q_{p-cresol}$ de 0.202 g/L-d y una $Q_{N-NO_3^-}$ de 0.162 g/L-d por un lapso de 154 días, con una relación C/N de 0.9 para oxidar el *p*-cresol hasta CO_2 (ecuación 2). Para este reactor, la eficiencia promedio en la eliminación de nitrato fue $97\% \pm 4$, el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular fue 0.99 ± 0.32 , no se detectó la presencia de óxido nitroso. La eficiencia en la eliminación del *p*-cresol fue en promedio $99\% \pm 0.3$, se detectó materia orgánica en el efluente que fue identificada como acetato. En la Tabla 9 se resumen los valores promedio de eficiencia en la eliminación de nitrato, sulfuro y *p*-cresol, así como el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular y sulfato para los tres reactores UASB.

Tabla 9. Eficiencias de eliminación de nitrato y sulfuro, rendimiento de N₂ y sulfato para los reactores UASB 1, 2 y 3.

Reactor	Eficiencia eliminación NO ₃ ⁻ (%)	Eficiencia eliminación S ²⁻ (%)	Eficiencia eliminación <i>p</i> -cresol (%)	Y _{N₂/N-NO₃} (gN ₂ /gN-NO ₃)	Y _{S-SO₄/S₂} (gS-SO ₄ /gS ²⁻)	Y _{C-CO₂/C <i>p</i>-cresol} (gC-CO ₂ /g C <i>p</i> -cresol)
1 Litotrófico	90 ± 8.74	99 ± 0.79	N.C.	0.39 ± 0.33	0.56 ± 0.27	N.C.
2 Lito-Organotrófico	99 ± 2.2	99 ± 0.87	98 ± 4.2	0.94 ± 0.43	0.67 ± 0.41	0.55 ± 0.15
3 Organotrófico	97 ± 4	N.C.	99 ± 0.3	0.99 ± 0.32	N.C.	0.50 ± 0.15

N.C.= No contiene

Eficiencia = {consumo del compuesto (g/L)/concentración inicial del compuesto (g/L)*100}

Comparación de los tres reactores UASB

Para los tres reactores las eficiencias de eliminación fueron altas (mayores que 90%) para los compuestos de interés: nitrato, *p*-cresol y sulfuro. Ninguno de los tres reactores alcanzó el estado estacionario. Desde el punto de vista del proceso desnitrificante los rendimientos más altos se tienen con los reactores lito-organotrófico y organotrófico en comparación con el reactor litotrófico. En relación con los reactores 1 y 3 se puede decir que con el sulfuro se obtiene menor rendimiento en la producción de nitrógeno molecular en comparación con el *p*-cresol. Un factor que puede influir en el metabolismo son las condiciones previas en las que el cultivo se encontraba trabajando como por ejemplo el tipo de sustrato.

En los reactores UASB 1 y 2 la oxidación del sulfuro fue parcial presentando períodos oscilatorios en la producción de sulfato como en el caso del reactor de tanque agitado. En el caso del reactor UASB 1 la relación S/N que se aplicó fue la estequiométrica para oxidar el sulfuro hasta sulfato. El reactor UASB 2 se encontraba limitado en cuanto al nitrato, por lo que se puede explicar la presencia de intermediarios en la oxidación de ambos donadores de electrones. Es importante mencionar que para los reactores UASB 2 y 3 no se llevó a cabo un período de

aclimatación previo al contacto con *p*-cresol con algún co-sustrato fácilmente degradable (glucosa, metanol, ácidos grasos volátiles), como se ha reportado en varios estudios (Veeresh 2005).

4.3. Etapa 3. Pruebas en lote para el estudio de la toxicidad del sulfuro.

Se llevaron a cabo tres pruebas en lote con sulfuro en condiciones desnitrificantes. Estas pruebas tuvieron como objetivo determinar el efecto de la concentración del sulfuro (40, 70, 225 mg/L) en el metabolismo del cultivo. Los controles tuvieron las mismas condiciones que las pruebas excepto que no fueron inoculados con los microorganismos. Los resultados de las pruebas de control a la concentración inicial de 225 mg S²⁻/L, mostraron que un 18% del sulfuro presente es oxidado químicamente por el nitrato, siendo los productos finales tiosulfato y nitrito.

Prueba en lote 1 (40 mg/L de sulfuro, relación S/N de 0.130). El sulfuro fue consumido por el cultivo en su totalidad en un lapso de 4 horas. La velocidad específica (q_s) de consumo de sulfuro fue 0.36 g S²⁻/g SSV-d, y fue oxidado hasta sulfato sin detectarse la presencia de algún intermediario. El nitrato no se consumió completamente ya que se encontraba en exceso. Durante la reducción del nitrato se detectó la presencia de nitrito como un intermediario temporal. La Figura 14 muestra el consumo de sulfuro y la producción de sulfato y en la Figura 15 se muestra el consumo del nitrato, producción de nitrito y de nitrógeno molecular para esta prueba.

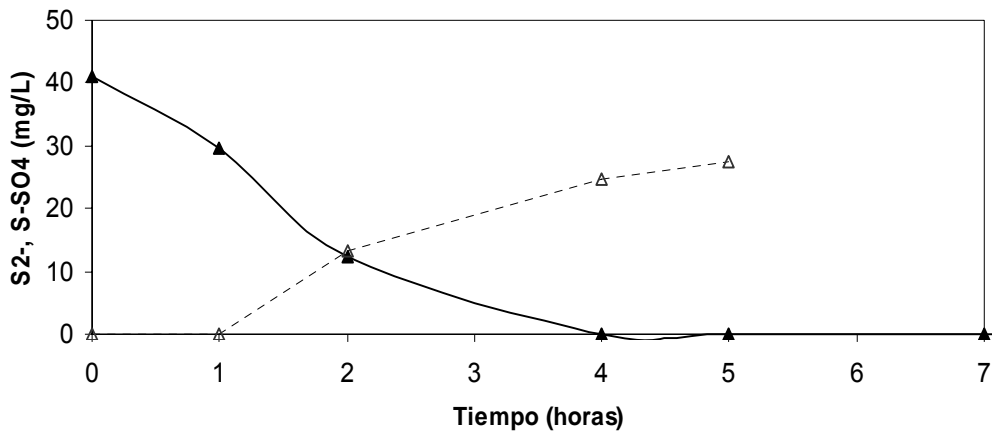


Figura 14. Prueba en lote 1 {40 mg S²⁻/L}. Perfil de los compuestos del azufre. Consumo de sulfuro S²⁻ (▲), producción de sulfato S-SO₄²⁻ (Δ) en el tiempo.

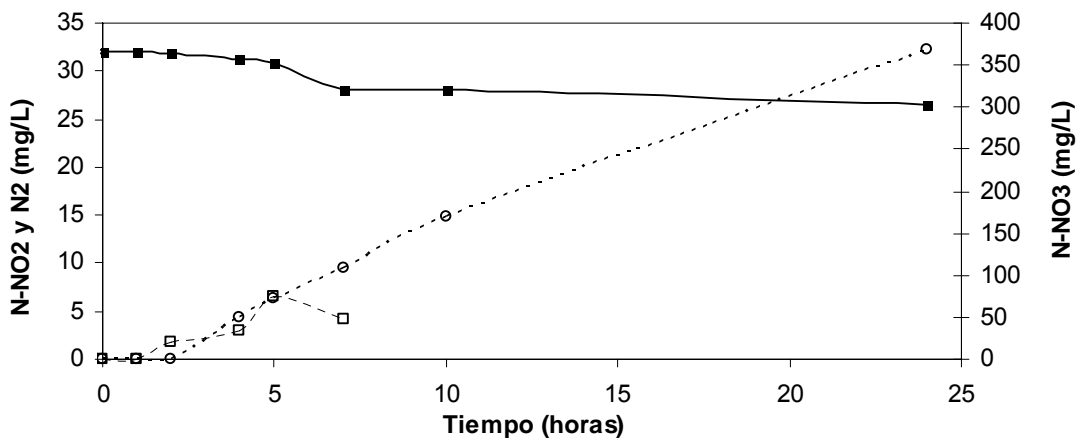


Figura 15. Prueba en lote 1 {40 mg S²⁻/L}. Perfil de compuestos del nitrógeno. Consumo de nitrato NO₃⁻ (■), producción de nitrito NO₂⁻ (□), producción de nitrógeno molecular N₂ (○) en el tiempo.

Prueba en lote 2 (70 mg/L de sulfuro, relación S/N de 0.228). El sulfuro fue consumido en su totalidad en 72 horas. Durante las primeras 5 horas la velocidad específica de consumo de sulfuro fue similar a la prueba 1 (0.34 g S²⁻/g SSV-d). Posteriormente, a partir de las 5 horas y hasta su consumo total, la velocidad de

consumo del sulfuro disminuyó ($0.039 \text{ g S}^{2-}/\text{g SSV-d}$). Durante la oxidación del sulfuro se detectó al tiosulfato como intermediario transitorio. En cuanto al proceso desnitrificante se detectó nitrito en forma temporal, observándose que al disminuir su concentración, comenzó la producción de nitrógeno molecular. En la Figura 16 se muestra el perfil de los compuestos del azufre en el tiempo (sulfuro, sulfato y tiosulfato) y en la Figura 17 el de los compuestos del nitrógeno (nitrito, nitro y nitrógeno molecular).

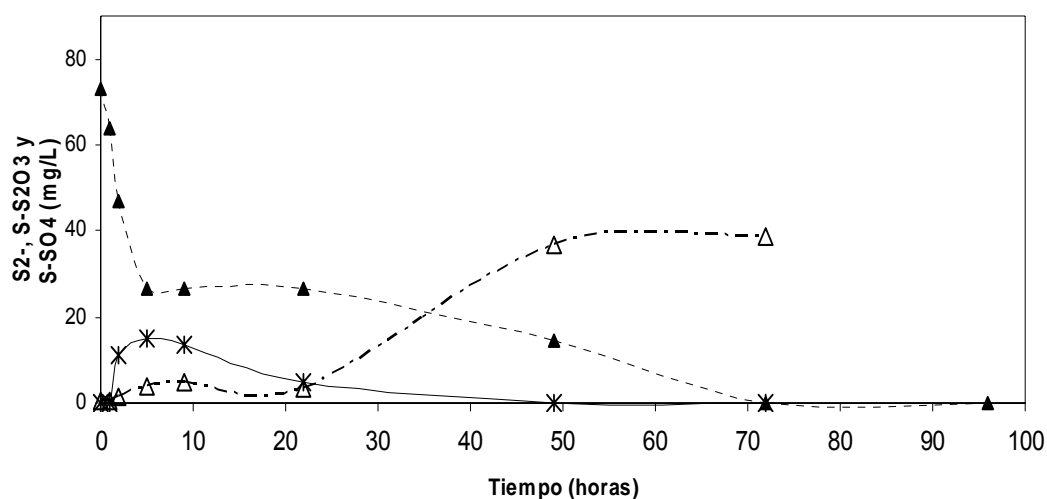


Figura 16. Prueba en lote 2 {70 mg S²⁻/L}. Perfil compuestos del azufre. Consumo de sulfuro S²⁻ (▲), producción de sulfato S-SO₄²⁻ (Δ), producción de tiosulfato S-S₂O₃ (*) en el tiempo.

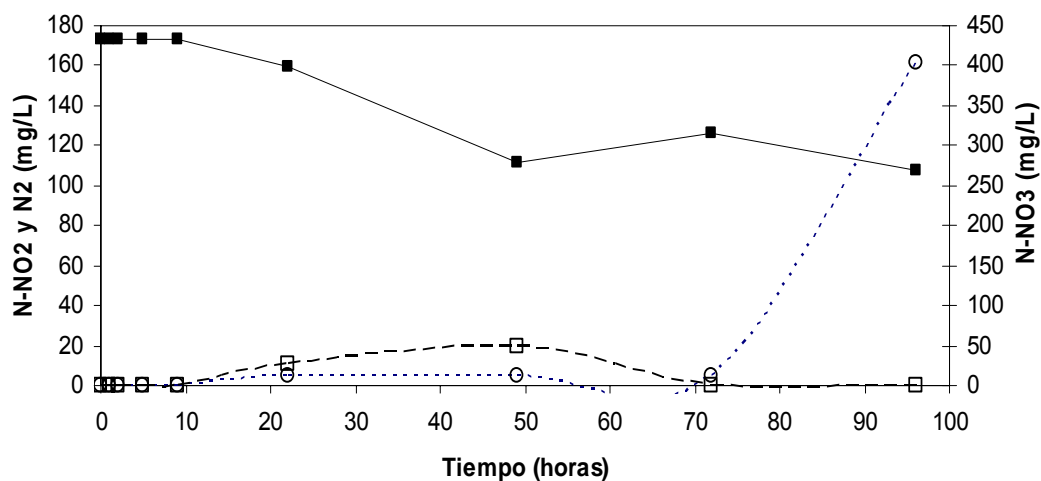


Figura 17. Prueba en lote 2 {70 mg S²⁻/L}. Perfil compuestos del nitrógeno. Consumo de nitrato NO₃⁻ (■), producción de nitrito NO₂⁻ (□), producción de nitrógeno molecular N₂ (○) en el tiempo.

Prueba en lote 3 (225 mg/l de sulfuro, relación S/N de 0.735). El sulfuro fue consumido con una velocidad específica de 0.17 g S²⁻/g SSV-d, por lo que se puede observar el efecto inhibitorio que produce el aumento en la concentración de sulfuro, comparado con las pruebas en lote 1 y 2 para la velocidad específica de consumo en las primeras cinco horas. En esta prueba a las cuarenta horas el 52% del sulfuro consumido se encontraba en forma de tiosulfato, el 38% como sulfato y el 3% como azufre elemental. Se detectaron nitrito y óxido nitroso, éste último constituyó hasta un 18% de la composición del biogás. En este caso el efecto inhibitorio del sulfuro fue más notorio, disminuyendo la producción de sulfato y teniendo otros intermediarios tanto de la desnitrificación (nitrito y óxido nitroso), como de la oxidación del sulfuro (tiosulfato y azufre elemental) durante un tiempo prolongado.

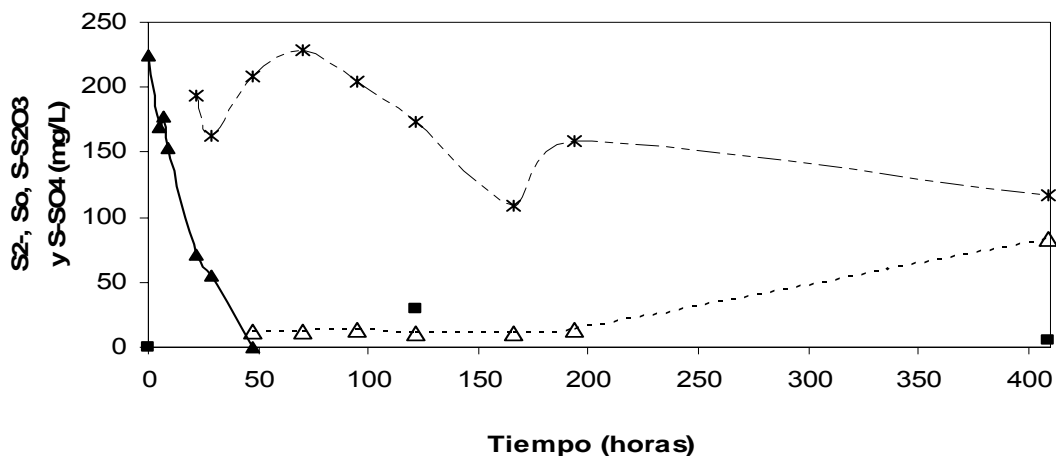


Figura 18. Prueba en lote 3 {225 mg S_2 -/L}. Concentración de compuestos del azufre en el tiempo. Consumo de sulfuro S^{2-} (▲), producción de sulfato $S-SO_4^{2-}$ (Δ), producción de tiosulfato $S-S_2O_3$ (*) y azufre elemental S^0 (■).

En la Figura 18 se puede observar el consumo de sulfuro, producción de azufre elemental, tiosulfato y sulfato en el tiempo y en la Figura 19 se presenta el perfil del consumo de nitrato, producción de nitrito y óxido nítrico para la prueba en lote 3.

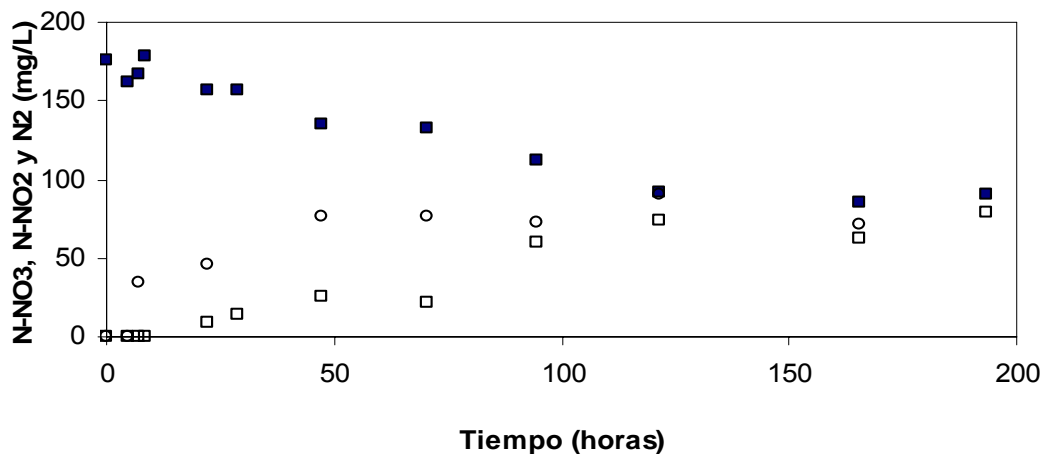


Figura 19. Prueba en lote 3 {225 mg S_2 -/L}. Concentración de compuestos del nitrógeno en el tiempo. Consumo de nitrato $N-NO_3^-$ (■), producción de nitrito $N-NO_2^-$ (□), producción de nitrógeno molecular N_2 (○).

En la tabla 10 se presentan los valores de velocidad específica de consumo de sulfuro, nitrato y nitrito en las 3 pruebas en lote. El aumento de la concentración inicial de sulfuro de 70 a 225 mg/L afectó el metabolismo de oxidación del sulfuro disminuyendo la velocidad específica de consumo del mismo. Por otro lado, la concentración inicial de sulfuro tiene un efecto importante en el metabolismo desnitrificante en donde se observó que al aumentar la concentración inicial del mismo, disminuye la velocidad de reducción del nitrato y nitrito. Para la prueba en lote con 225 mg S²⁻/L se detectó óxido nitroso como un intermediario temporal lo cual indica que se ven afectadas las diferentes etapas de la reducción del nitrato hasta nitrógeno molecular. El nitrito se detecta como un intermediario más persistente en el tiempo conforme la concentración inicial de sulfuro se incrementa. La acumulación de intermediarios puede deberse a un efecto de inhibición del sulfuro sobre las enzimas desnitrificantes (Schönharting y col. 1998, Sorensen y col. 1980). Por otro lado, se ha reportado (Manconi y col. 2006) que la presencia de sulfuro puede ocasionar la acumulación de óxido nitroso debido a reacciones químicas del sulfuro con el cobre y el hierro, cofactores necesarios para la desnitrificación, las cuales disminuyen su biodisponibilidad.

Tabla 10. Velocidades específicas de consumo de sulfuro, nitrato y nitrito pruebas en lote con 40, 70 y 225 mg S²⁻/L

(mg S²⁻/L) Inicial	Vel. específica consumo de sulfuro (g S²⁻/ g SSV-d)	Vel. específica consumo de nitrato (g NO₃⁻/ g SSV-d)	Vel. específica consumo de nitrito (g NO₂⁻/ g SSV-d)
40	0.36	0.22	0.14
70	0.34	0.11	0.03
225	0.17	0.02	0

Los resultados encontrados difieren de lo reportado por Krishnakumar y Manilal (1999), quienes realizaron pruebas en lote con un cultivo enriquecido de bacterias desnitrificantes utilizando sulfuro como donador de electrones, probaron diferentes concentraciones de sulfuro, nitrato, el efecto del nitrito y diferentes valores de pH.

Las concentraciones de sulfuro fueron de 25 a 400 mg/L pero no especifican la concentración de nitrato que utilizaron para estas pruebas, así como tampoco la concentración de biomasa. Reportaron que hasta 400 mg/L de sulfuro no afectó su velocidad de oxidación (0.9 g HS⁻/g biomasa-h) y a concentraciones mayores de 800 mg/L la velocidad de oxidación de sulfuro disminuyó. Los autores detectaron la presencia de nitrito como intermediario y reportan que del 40 al 60% del sulfuro consumido fue oxidado hasta sulfato, asumiendo que el resto se encontraba como azufre elemental por el aspecto lechoso del medio líquido, aunque no lo cuantificaron.

Reyes (2000) reportó para una prueba en lote a una concentración inicial de 104 mg S²⁻/L, 73 mg N-NO₃/L y un inóculo de 1.3-1.7 g SSV/L una velocidad específica de consumo de sulfuro de 5.3 g S²⁻/g SSV-d y de nitrato de 0.38 g N-NO₃/g SSV-d.

4.4. Etapa3. Pruebas en lote con *p*-cresol y sulfuro

Esta prueba se llevó a cabo para analizar la competencia entre el sulfuro y el *p*-cresol cuando ambos se encuentran presentes en un proceso desnitrificante en el que el nitrato está limitado con respecto a la estequiometría de la reacción. Como referencia se probaron ambos sustratos también en forma separada. Las relaciones C/N y S/N fueron las estequiométricas para oxidar el carbono presente hasta CO₂ y el sulfuro hasta sulfato. Los diferentes tratamientos se dividieron en:

Tratamiento 1, proceso desnitrificante litotrófico con sulfuro (348 mg S²⁻/L y 224 mg N-NO₃/L).

Tratamiento 2, proceso desnitrificante lito-organotrófico con sulfuro y *p*-cresol (348 mg S²⁻/L, 254 mg *p*-cresol/L y 224 mg N-NO₃/L).

Tratamiento 3, proceso desnitrificante organotrófico con *p*-cresol. (254 mg *p*-cresol/L y 224 mg N-NO₃/L).

En todos los casos los controles fueron preparados bajo las mismas condiciones excepto que no fueron inoculados con el consorcio (controles abióticos).

La Figura 20 representa el consumo de sulfuro para los tratamientos 1 y 2 en el tiempo. Como se había observado en la prueba de toxicidad del sulfuro (70 mg/l de S^{2-}), se tienen dos perfiles de velocidad de consumo para sulfuro. Durante las primeras 20 horas, la velocidad específica de consumo es mayor, pero a partir de este punto la velocidad disminuye. La presencia del *p*-cresol en el tratamiento 2 no afectó el consumo de sulfuro, ya que la velocidad específica de consumo de sulfuro (q_s) en las primeras 20 horas, tanto para el tratamiento 1 (sulfuro y nitrato) como para el tratamiento 2 (sulfuro, *p*-cresol y nitrato) fue 0.52 g S^{2-} /g SSV-d.

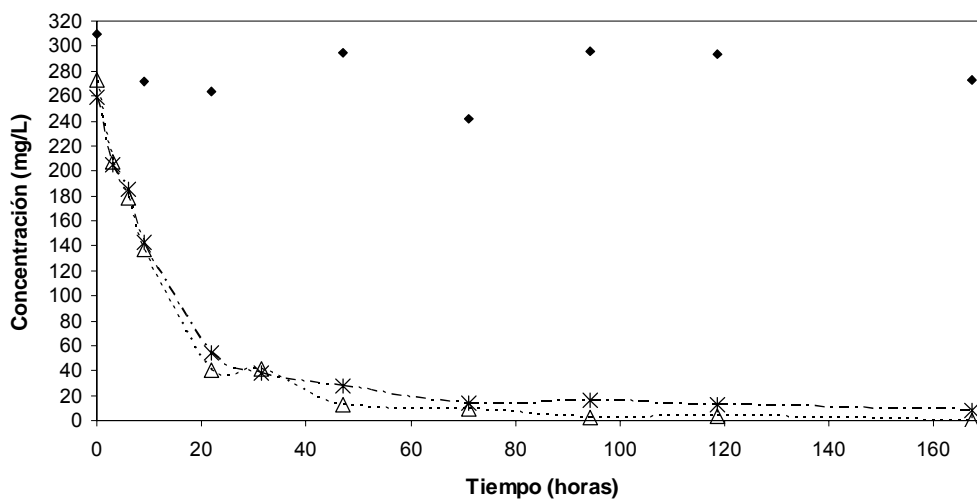


Figura 20. Perfil del consumo de sulfuro en el tiempo. Tratamiento 1: sulfuro y nitrato (Δ), tratamiento 2: sulfuro, *p*-cresol y nitrato (*), control (\bullet).

En la Figura 21 se puede notar que la presencia de sulfuro sí afecta el consumo del *p*-cresol, para el tratamiento 3 (*p*-cresol y nitrato) la velocidad específica de consumo de *p*-cresol ($q_{p\text{-cresol}}$) fue 0.057 g *p*-cresol/gSSV-d y para el tratamiento 2 (sulfuro, *p*-cresol y nitrato) la $q_{p\text{-cresol}}$ fue 0.015 g *p*-cresol/gSSV-d. Bajo las condiciones de estudio, se puede decir que el sustrato que se consume más rápidamente es el sulfuro.

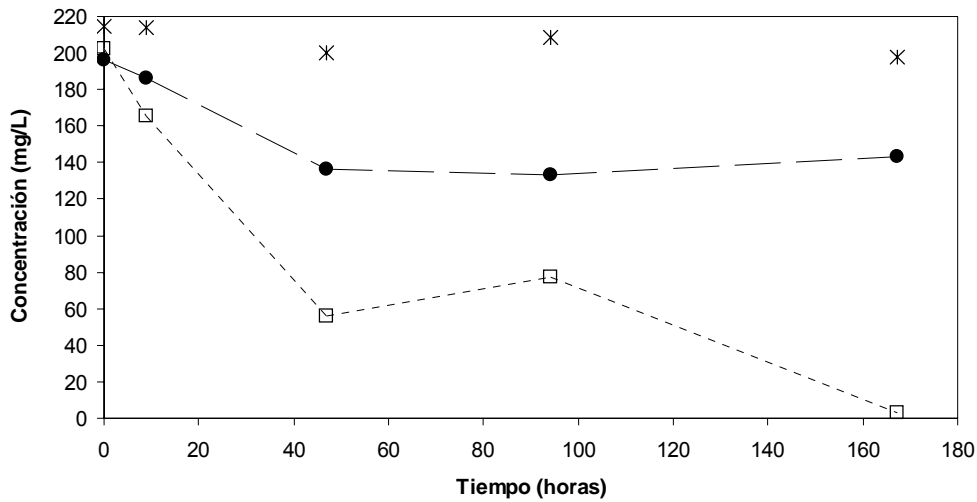


Figura 21. Perfil del consumo de *p*-cresol en el tiempo. Tratamiento 2: sulfuro, *p*-cresol y nitrato (●), tratamiento 3: *p*-cresol y nitrato (□), control (*).

Durante las pruebas en lote con sulfuro y *p*-cresol, se observó un desplazamiento en el consumo del *p*-cresol, siendo el sulfuro el que se consume en forma más rápida en contraste con el reactor en continuo en donde se observó que ambos sustratos se consumen en forma simultánea. Esto puede deberse a la diferencia en la concentración de inóculo ya que en el reactor es mucho mayor (10 g SSV/L) en comparación con la prueba en lote (0.5 g SSV/L) o a que en el reactor en continuo, las concentraciones de *p*-cresol en el régimen estacionario son muy bajas en comparación con las pruebas en lote en el punto inicial donde la concentración es alta.

No hay muchos trabajos publicados en donde se encuentren presentes tanto el sulfuro como el *p*-cresol ya que ambos son considerados compuestos tóxicos para los microorganismos; sin embargo, en este trabajo se ha determinado que es posible, mediante un proceso desnitrificante, eliminar estos compuestos en forma simultánea.

Se tienen referencias de estudios en donde se ha mencionado que el fenol en concentraciones menores que 376 mg/l, es consumido en un periodo de 2 a 5 días

en condiciones desnitrificantes en una prueba en lote (Khoury y col. 1992). Para el estudio en continuo con velocidades de 90 a 360 mg/L-d de fenol no detectaron la acumulación de nitrito ni la presencia de intermediarios de la oxidación del fenol (Khoury y col. 1992). También se han probado mezclas de fenol, *p*- y *o*-cresol en condiciones metanogénicas en reactores UASB y en pruebas en lote, en donde se ha señalado que existen diferencias importantes cuando se utiliza un lodo adaptado en comparación con un lodo no adaptado (Razo y col. 2003).

CAPÍTULO 5

5. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados muestran que bajo las condiciones del estudio es posible eliminar en forma eficiente; mediante un proceso desnitrificante nitrato, *p*-cresol y sulfuro en forma simultánea.

En el reactor de tanque agitado, con la menor velocidad de carga de sulfuro probada ($Q_{S^{2-}} = 0.179$ g/Ld) en presencia de acetato, la desnitrificación fue completa. A pesar de que la relación S/N fue la estequiométrica para oxidar el sulfuro hasta sulfato, se presentaron períodos oscilatorios en los que se acumuló azufre elemental en la biomasa. A mayores velocidades de carga de sulfuro, la acumulación de azufre elemental se incrementó afectando el proceso desnitrificante al disminuir el rendimiento en la producción de nitrógeno molecular y aumentar la acumulación de intermediarios como el nitrito. El paso limitante es la oxidación del azufre elemental a sulfato, ya sea por un problema de inhibición de la enzima que cataliza este paso o por la saturación de la cadena de transporte de electrones.

En el trabajo en continuo con reactores UASB en condiciones desnitrificantes, fue posible también eliminar con eficiencias altas (mayores del 90%) nitrato, *p*-cresol y sulfuro. El sustrato que se consume más rápidamente por el cultivo es el sulfuro con el cual se obtuvo una velocidad específica de consumo un orden de magnitud mayor en comparación con la del *p*-cresol, sin embargo con este último fue posible obtener mejores rendimientos de nitrógeno molecular en reactor continuo. En condiciones desnitrificantes litotróficas, con una relación S/N estequiométrica, sólo una parte del sulfuro consumido fue oxidado completamente hasta sulfato (56%).

En cuanto a las pruebas en lote, se puede decir que el aumento en la concentración del sulfuro ejerce un efecto inhibitorio en el cultivo. En este caso los resultados

parecen indicar que la oxidación de azufre elemental a sulfato es el paso limitante en la vía.

Es claro que es necesario realizar más estudios para determinar las condiciones que permiten orientar la oxidación de sulfuro a sulfato o azufre elemental además de la relación S/N. Una propuesta podría ser realizar un estudio en condiciones desnitrificantes cuantificando los citocromos c del cultivo al incrementar la velocidad de carga del sulfuro y como se relaciona esto con el producto final del metabolismo de la oxidación del sulfuro. También se podrían determinar las velocidades de reacción con diferentes compuestos del azufre, para tratar de entender los pasos en la vía de oxidación de compuestos reducidos del azufre.

Una vez que se determinen los factores que permiten orientar la oxidación del sulfuro, podrían realizarse estudios en los que se prueben condiciones más representativas de los efluentes de la refinación del petróleo como la presencia de fenol y cresoles además del sulfuro y la diferencia entre utilizar un lodo aclimatado o no aclimatado en presencia de fenol y cresoles.

BIBLIOGRAFÍA

- Aminuddin M., Nicholas D. (1973). Sulphide oxidation linked to the reduction of nitrate and nitrite in *Thiobacillus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **325**: 81-93.
- Aminuddin M., Nicholas D. (1974). An AMP-independent sulphite oxidase from *Thiobacillus denitrificans*: purification and properties. *Journal of General Microbiology*. **82**: 103-113.
- APHA (1985). Standard methods for examination of water and wastewater, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Bartlett J.K., Skoog D. A. (1954). Colorimetric determination of elemental sulphur in hydrocarbons. *Analytical Chemistry*. **26**(6): 1008-1011.
- Beffa T., Berczy M., Aragno M. (1991). Chemolithoautotrophic growth on elemental sulfur (S⁰) and respiratory oxidation of S⁰ by *Thiobacillus versutus* and another sulfur-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. **84**:(3). 285-290.
- Beffa T., Fischer C., Aragno M. (1992). Respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus tepidarius* (type strain). *Archives of Microbiology*. **158**:(6). 456-458.
- Beffa T., Fischer C., Aragno M. (1993). Growth and respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus novellus* (type strain) grown on thiosulfate. *Current Microbiology*. **26**:(6). 323-326.
- Beller H., Chain P., Letain T., Chakicherla A., Larimer F., Richardson P. Coleman M., Wood A., Kelly D. (2006) The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Journal of Bacteriology*. **188**(4): 1473-1488.
- Beristain R. (2004). Eliminación anóxica de carbono, nitrógeno y azufre por medio de un reactor de lecho fluidificado inverso. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Berné, F. and Cordonnier, J. (1995). Industrial water treatment: Refining, petrochemicals and gas processing techniques. Gulf Publishing Company Book Division, Houston. Pp. 43-50.
- Bernet N., Bizeau C., Moletta R., Cornier J., Deguin A. (1995). Study of physicochemical factors controlling nitrite build-up during heterotrophic denitrification. *Environmental Technology*. **16**: 165-172.
- Betlach M., Tiedje J. (1981). Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*. **42**(6). 1074-1084.
- Bisogni J., Driscoll C., Denitrification using thiosulfate and sulfide. (1977). *Journal of the Environmental Engineering Division*. **103**(4): 593-604.
- Boulegue J. (1978). Solubility of elemental sulfur in water at 298 K. En: Phosphorus and Sulfur (5). Ed. Gordon and Breach Science Publishers. Gran Bretaña. Pp. 127-128
- Brüser T., Lens P., Trüper H.G. (2000). The biological sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). International Water Association Publishing Company. Londres. pp. 47-85.
- Brune D. (1989). Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*. **975**: 189-221.
- Cadenhead P., Sublette K. (1990). Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacilli*. *Biotechnology and bioengineering*. **35**: 1150-1154.
- Cervantes F.J., De la Rosa D., Gómez J. (2001). Nitrogen removal from wastewater at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresource Technology*. **79**: 165-170.
- Cervantes C.F., Perez J., Gomez J. (2000) Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **42**: 73-82.
- Chen K., Morris J. (1972). Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. *Environmental Science and Technology*. **6**: 529-537.

- Claus G., Kutzner H.J. (1985). Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **22**:(4). 283-288.
- Cornelus F., Bonting C., Schneider S., Schmidtberg G., Fuchs G. (1995). Anaerobic degradation of *m*-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. *Archives of Microbiology*. **164**: 63-39.
- De Jong G., Hazeu W., Bos P., Kuenen J. (1997). Isolation of the tetrathionate hydrolase from *Thiobacillus acidophilus*. *European Journal of Biochemistry*. **243**: 678-683.
- Fdz-Polanco F., Fdz-Polanco M., Fernández N., Urueña M.A., García P.A., Villaverde S. (2001). New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Research*. **35**:(4). 1111-1114.
- Flere J.M. and Zhang T.C. (1998). Sulfur-based autotrophic denitrification pond systems for in-situ remediation of nitrate-contaminated surface water. *Water Science and Technology* **38**:(1). 15-22.
- Friedrich C.G., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A., Fischer J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**:(7). 2873-2882.
- Gevertz D., Telang A., Voordouw G., Jenneman G. (2000) Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:(6). 2491-2501.
- Gommers P., Bijleveld W., Kuenen G.J. (1988). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. Start-up and reactor performance. *Water Research*. **22**:(9). 1075-1083.
- Gommers P., Bijleveld W., Zijderwijk F., Kuenen G.J. (1988). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-II. Measurements of activities and conversion. *Water Research* **22**:(9). 1085-1092.

- Gunter C., Kutzner H. (1985). Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 283-288.
- Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G. (1999). Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiology Reviews.* **22**: 439-458.
- Heipieper H. J., Keweloh H., Rehm H.J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* **57**:(4). 1213-1217.
- Hochstein L., Tomlinson G. (1988). The enzymes associated with denitrification. *Annual Review of Microbiology.* **42**: 231-261.
- Hooper A. B., Dispirito A. (1985). In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbiological Reviews.* **49**:(2). 140-157.
- Jensen A.B. and Webb C. (1995). Treatment of H₂S-containing gases: A review of microbiological alternatives. Review. *Enzyme and Microbial Technology* **17**:2-10
- Kelly D. (1999). Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Archives of Microbiology.* **171**: 219-229.
- Kelly D., Shergill J., Lu W., Wood A. (1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**: 95-107
- Khoury N., Dott W., Kampfer P., (1992). Anaerobic degradation of phenol in batch and continuous cultures by a denitrifying bacterial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **37**: 524-528.
- Kim E.W., Bae J.H. (2000). Alkalinity requirements and the possibility of simultaneous heterotrophic denitrification during sulfur-utilizing autotrophic denitrification. *Water Science and Technology.* **42** (3-4): 233-238.
- Kleerebezem R. Mendez R. (2002). Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Science and Technology.* **45**:(10). 349-356.
- Knowles R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews.* **46**:(1). 43-69.

- Koenig A., Liu L.H. (2001). Kinetic model of autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactors. *Water Research*. **35**:(8). 1969-1978.
- Krishnakumar B., Manilal V.B. (1999). Bacterial oxidation of sulphide under denitrifying conditions. *Biotechnology Letters*. **21**: 437-440.
- Langley W.G., Wu S., Chao A.C. (2001). Reaction Kinetics of Immobilized-cell denitrification. Background and model development. *Journal of Environmental Engineering*. **127**:(8). 682-687
- Lee D., Lee I., Choi Y., Bae J. (2001). Effects of external carbon source and empty bed contact time on simultaneous heterotrophic and sulfur-utilizing autotrophic denitrification. *Process Biochemistry*. **36**: 1215-1224.
- Lenk Sabine. (2006) Diversity and abundance of sulfur-oxidizing bacteria in wadden sea sediments revealed by DsrAB phylogeny and *dsrAB*-targeted real-time PCR. Master Thesis. International Max Planck Research School for Marine Microbiology at the University of Bremen.
- Lens P., Hulshoff O., Tichy R. (2000) Sulfur Cycle. En: *Encyclopedia of Microbiology*. Vol. 4. J. Lederberg, M. Alexander, B. Bloom, D. Hopwood, R. Hull. Ed. Academic Press New York. pp.
- Lens P., Kuenen J.G. (2001) The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*. **44**:(8). 57-66.
- Lens P.N.L., Sipma J. Pol W.H., Lettinga G. (2000). Effect of nitrate on acetate degradation in a sulfidogenic staged reactor. *Water research*. **34**:(1). 31-
- Lu W.P., Kelly D.P. (1983a). Partial purification and resolution of a thiosulfate-oxidizing system from *Thiobacillus A2*. *Journal of General Microbiology*. **129**:1673-1681.
- Lu W.P., Kelly D.P. (1983b). Purification and some properties of two principal enzymes of the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus A2*. *Journal of General Microbiology*. **129**: 3549-3564.
- Lu W.P., Kelly D.P. (1988a). Kinetic and energetic aspects of inorganic sulphur compound oxidation by *Thiobacillus tepidarius*. *Journal of General Microbiology*. **134**:865-876.

- Manconi I., Van der Maas P., Lens P. (2006). Effect of copper dosing on sulfide inhibited reduction of nitric and nitrous oxide. *Nitric Oxide*. **15**: 400-407.
- Mateju V., Cizinska S., Krejci J., Janoch T. (1992) Biological water denitrification-a review. *Enzyme Microbial. Technology*. **14**: 170-183.
- McComas C., Sublette K. (2001) Characterization of a novel biocatalyst system for sulfide oxidation. *Biotechnology Progress*. **17**: 439-446.
- Megonigal J.P., Hines M.E., Visscher P.T. (2004). Anaerobic metabolism: Linkages to trace gases and aerobic processes. Elsevier-Pergamon. Oxford, UK. Pp. 317-424.
- O'Connor O., Young L.Y. (1996). Effects of six different functional groups and their position on the bacterial metabolism of monosubstituted phenols under anaerobic conditions. *Environmental Science and Technology*. **30**:(5). 1419-1428.
- Oh S.E., Kim K.S., Choi H.C., Cho J., Kim I.S.,(2000). Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria. *Water Science and Technology*. **42**:(3-4). 58-68.
- Oh S.E., Yoo Y.B., Young J.C., Kim I.S. (2001). Effect of organics on sulfur-utilizing autotrophic denitrification under mixotrophic conditions. *Journal of Biotechnology*. **92**: 1-8.
- Perez R., Martin A. (1982). Carbon dioxide assimilation by *Thiobacillus novellus* under nutrient-limited mixotrophic conditions. *Journal of Bacteriology*. **150**:(1). 46-51.
- Pott A., Dahl C. (1998). Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology*. **144**: 1881-1894.
- Programa Nacional Hidráulico. 2001-2006. Comisión Nacional del Agua.
- Puig L., Rodríguez O., Razo E. (2003). Simultaneous biodegradation of a phenol and 3,4-dimethylphenol mixture under denitrifying conditions. *Water Science and Technology*. **48**:(6). 171-178

- Razo E., Iniestra M., Field J., Olguín P., Puig L. (2003). Biodegradation of mixtures of phenolic compounds in an upward-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Environmental Engineering*. 129:(11). 999-1006.
- Reyes A. (2000). Eliminación biológica simultánea de nitrógeno, carbono y azufre por desnitrificación. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa.
- Reyes J., Razo E., Gomez J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*. **38**: 3313-3321
- Rudolphi A., Tschsch A., Fuchs G. (1991). Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*. **155**: 238-248.
- Schedel M., Trüper H.G. (1980). Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. *Archives of Microbiology*. **124**: 205-210.
- Schönharting B., Rehner R., Metzger J., Krauth K., Rizzi M. (1998). Release of nitrous oxide (N₂O) from denitrifying activated sludge caused by H₂S-containing wastewater: quantification and application of a new mathematical model. *Water Science and Technology*. **38**:(1). 237-246.
- Shinoda Y., Sakai Y., Ue M., Hiraishi A., Kato N. (2000). Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:(4).1286-1291.
- Sierra R., Guerrero F., Rowlette P., Freeman S. , Field J. (2005). Comparison of chemo-hetero- and mixotrophic denitrification in laboratory-scale UASBs. *Water Science and Technology*. **52**: (1-2). 337-342.
- Sorensen, J., Tiedje J., Firestone R. (1980). Inhibition by sulfide of nitric and nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. **39**: 105-108.
- Sublette K., Kolhatkar R., Raterman K. (1998). Technological aspects of the microbial treatment of sulfide-rich wastewaters: A case study. *Biodegradation* **9**: 259-271.
- Sublette K., Sylvester N. (1987). Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: desulfurization of natural gas. *Biotechnology and Bioengineering*. **29**: 249-257.

- Steudel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). International Water Association Publishing Company. Londres, pp.1-31.
- Thauer R., Jungermann K., Decker K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*. **41**:(1). 100-180.
- Trüper H.G., Schlegel H.G. (1964). Sulfur metabolism in Thiorhodaceae. 1:Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **30**: 225-238.
- Veeresh G.S., Kumar P., Mehrotra I. (2005). Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research* **39**: 154-170
- Vishniac W. (1952). The metabolism of *Thiobacillus thioparus*. The oxidation of thiosulfate. *J. Bacteriol.* **64**: 363-373.
- Visser J.M. de Jong G., Robertson L., Kuenen J. (1997b). A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5. *Archives of Microbiology*. **167**: 295-301.
- Visser J.M., Robertson L. A., Verseveld H., Kuenen J. (1997). Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**:(6). 2300-2305.
- Williamson M., Rimstidt J. (1992). Correlation between structure and thermodynamic properties of aqueous sulfur species. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **56**: 3867-3880.
- Wodara C., Kostka S., Egert M., Kelly D., Friedrich G. (1994). Identification and sequence analysis of the soxB gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17. *Journal of Bacteriology*. **176**: 6188-6191.
- Yang P.Y. and Zhang Z.Q. (1995) Nitrification and denitrification in the wastewater treatment system. En: *Proceedings of the UNESCO-University of Tsukuba International Seminar on Traditional Technology for Environmental Conservation and Sustainable Development in the Asian-Pacific Region*. Ishizuka K, Hisajima S., Macer D. (Ed.) University of Tsukuba. Japón. Pp. 145-158.

- Ye R.W., Averill B.A., Tiedje J. M. (1994). Denitrification: Production and consumption of nitric oxide. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:(4). 1053-1058.
- Zumft W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61:(4). 533-615.