



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

BIOELIMINACIÓN DE ÓXIDOS DE AZUFRE DE EFLUENTES

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MARÍA DE LOURDES BERENICE CELIS GARCÍA

Matrícula: 200181191

berenicelis@hotmail.com

DIRECTOR: DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO
CODIRECTOR: DR. SERGIO REVAH MOISEEV

JURADO

PRESIDENTE: DR. SERGIO REVAH MOISEEV
SECRETARIA: DRA. FLORINA RAMÍREZ VIVES
VOCAL: DRA. PATRICIA OLGUÍN LORA
VOCAL: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

IZTAPALAPA, DISTRITO FEDERAL A 16 DE DICIEMBRE DE 2004

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa **aprobó** la tesis

Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes

Que presentó

María de Lourdes Berenice Celis García

Comité tutorial

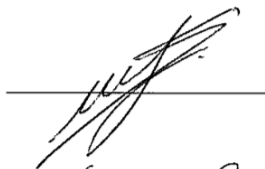
Dr. Oscar Monroy Hermosillo
Director, UAM-Iztapalapa

Dr. Sergio Revah Moiseev
Co-director, UAM-Iztapalapa

Dra. Florina Ramírez Vives
Asesora, UAM-Iztapalapa

Jurado:

Dr. Sergio Revah Moiseev
Presidente



Dra. Florina Ramírez Vives
Secretaria



Dra. Patricia Olguín Lora
Vocal, Instituto Mexicano del Petróleo



Dr. Germán Buitrón Méndez
Vocal, Instituto de Ingeniería - UNAM



Iztapalapa, D.F., a 16 de diciembre de 2004

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales W-106, del Grupo de Ciencia y Tecnología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como al apoyo financiero obtenido a través del proyecto FIES-98-109-VI del Instituto Mexicano del Petróleo.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa está incorporado en el Padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro 0472-0.

Agradecimientos

Después de un poco más de 10 años de haber terminado mi licenciatura en Ingeniería Bioquímica Industrial regresé a la UAM y estoy muy satisfecha de haber tomado esa decisión. A mi regreso me encontré con viejos amigos y con varios de los que fueron mis profesores en la carrera.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Ramírez, al Dr. Revah y al Dr. Monroy por todos sus comentarios y críticas durante el desarrollo del trabajo experimental y la escritura de esta tesis.

A los miembros del jurado les agradezco el haber revisado oportunamente este documento y las sugerencias que me hicieron para mejorarlo.

Las condiciones ambientales dentro del laboratorio de Aguas Residuales propiciaron que este trabajo se llevara a cabo satisfactoriamente, gracias a la interacción de los miembros del grupo anaerobio W-106 conformado por Javo, Angélica Jiménez, Patricia Castilla, Sergio Viguera y la Dra. Mónica Meraz. Los miembros de otros grupos de investigación también tuvieron que ver con el ambiente de trabajo cordial, tal es el caso de Armando González y de Francisco Villaseñor. A Carmen Fajardo le agradezco su destreza para lograr que los análisis de mis muestras no me enloquecieran.

Asimismo, quiero agradecer a las alumnas de servicio social que me ayudaron a mantener los reactores bien alimentados Angélica, Landy, Bibiana, Blanca y en especial a Belem.

A Zaida y Hugo les agradezco todo el apoyo y la hospitalidad que me brindaron durante la etapa más crítica de este proyecto, que fue la revisión-corrección del documento final y a José María el haberme brindado una linda sonrisa todos los días que me hospedaron.

A mis padres, Ruth y Juan José, por su apoyo muchas gracias y en la memoria a Chelina.

Finalmente, quiero agradecerle a Elías todas esas largas sesiones de preguntas y respuestas que me ayudaron a completar favorablemente esta etapa de mi vida.

CONTENIDO

Resumen	i
Abstract	ii
Nomenclatura	iii
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Justificación	1
1.2 El ciclo biológico del azufre	2
1.3 Biotecnologías para la eliminación de compuestos azufrados	7
1.3.1 Reducción no asimilativa de compuestos oxidados de azufre (sulfato, sulfito y tiosulfato)	8
1.3.2 Oxidación de sulfuro	11
1.4 Toxicidad de los compuestos de azufre	13
1.5 Objetivos	17
1.6 Estructura de la tesis	17
Capítulo 2. Materiales y métodos	
2.1 Materiales	19
2.1.1 Reactor anaerobio UASB	19
2.1.2 Reactor anaerobio de lecho fluidificado inverso	19
2.1.3 Reactor aerobio	20
2.1.4 Fuentes de biomasa	21
2.1.5 Medios de cultivo	22
2.2 Métodos	23
2.2.1 Determinación de la actividad anaerobia específica	23
2.2.2 Análisis	25
2.3 Cálculos	27
2.3.1 Balance de DQO	27
2.3.2 Balance de sulfato	29

2.3.3	Parámetros de operación	30
2.3.4	Fracción de la DQO removida por las BM y las BSR	30
2.3.5	Cálculo de las actividades metanogénica y sulfatorreductora	31
2.3.6	Cálculo del equivalente teórico de DQO	31

Capítulo 3. Reducción de sulfato en reactores UASB y LFI

3.1	Resumen	33
3.2	Introducción	33
3.3	Materiales y métodos	38
3.3.1	Reactores	38
3.3.2	Medios de cultivo	40
3.3.3	Ensayos de la actividad específica anaerobia	40
3.3.4	Análisis	41
3.4	Resultados	41
3.4.1	Reactor UASB	41
3.4.2	Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)	47
3.4.3	Actividades específicas de la biomasa de los reactores UASB y LFI	49
3.4.4	Comparación del desempeño de los reactores UASB y LFI	52
3.5	Discusión	58

Capítulo 4. Tratamiento aerobio de efluentes que contienen sulfuro

4.1	Resumen	65
4.2	Introducción	65
4.3	Materiales y métodos	69
4.3.1	Condiciones experimentales	69
4.3.2	Reactor alimentado	69
4.3.3	Reactor en continuo	69
4.3.4	Reactor secuencial	70
4.3.5	Experimentos en lote	70
4.3.6	Determinación del $k_{l\alpha}$	71
4.3.7	Análisis	72

4.4 Resultados y discusión	72
4.4.1 Velocidad específica de consumo de sulfuro en el consorcio sulfoxidante	72
4.4.2 Determinación del $k_{i\alpha}$	74
4.4.3 Reactor alimentado	75
4.4.4 Reactor continuo alimentado con sulfuro sintético	77
4.4.5 Reactor continuo alimentado con el efluente de un reactor UASB	82

Capítulo 5. Inhibición de la digestión anaerobia de materia orgánica por sulfuro y oxígeno: Efecto del tipo de inmovilización microbiana

5.1 Resumen	89
5.2 Introducción	90
5.3 Materiales y métodos	91
5.3.1 Biomasa y medios de cultivo	91
5.3.2 Ensayos de la actividad específica	91
5.3.3 Ensayos de la toxicidad del sulfuro y oxígeno	92
5.3.4 Análisis	92
5.4 Resultados	93
5.4.1 Inhibición de la actividad por sulfuro	93
5.4.2 Inhibición de la actividad anaerobia por oxígeno	99
5.5 Discusión	102

Capítulo 6. Conclusiones

109

Referencias bibliográficas

113

Celis García Ma. de Lourdes Berenice (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México

Resumen

Las corrientes de desecho de un gran número de industrias contienen compuestos azufrados disueltos que representan un problema ambiental cuando son descargados sin un tratamiento previo. Su emisión al ambiente esta asociada con la lluvia ácida, fenómenos de corrosión, olor desagradable y daños a la salud debido a la toxicidad de estos contaminantes.

En el tratamiento anaerobio de las corrientes que contienen compuestos azufrados oxidados se produce sulfuro que es un compuesto extremadamente corrosivo y tóxico. Sin embargo existen tecnologías basadas en el ciclo del azufre que permiten la transformación del sulfuro en azufre elemental que al sedimentar puede separarse fácilmente de la corriente. El azufre recuperado puede servir como materia prima para la producción de fertilizantes o ácido sulfúrico. En el tratamiento anaerobio de efluentes ricos en sulfato la materia orgánica es removida simultáneamente con la sulfato reducción. Las bacterias reductoras de sulfato son las que llevan a cabo este proceso y gracias a su diversidad metabólica pueden competir con las bacterias fermentativas, acidogénicas y metanogénicas por la materia orgánica. La oxidación de sulfuro a azufre elemental se lleva a cabo por bacterias del género *Thiobacillus* que tienen la característica de depositar el azufre elemental fuera de la célula. En este trabajo se estudiaron los procesos de reducción de sulfato a sulfuro y su oxidación a azufre elemental, con el objetivo de establecer los parámetros más importantes para la posible integración de los dos procesos en un solo reactor. La reducción de sulfato se estudió en dos reactores anaerobios de alta tasa, uno de lecho de lodos de flujo ascendente y otro de lecho fluidificado. Ambos reactores presentaron eficiencias de remoción de DQO de alrededor de 90%. El proceso de sulfatorreducción utilizó entre 70 y 75% de la DQO removida y la metanogénesis se llevó a cabo aún cuando los reactores se operaron a la relación estequiométrica DQO/SO_4^{2-} de 0.66. Se observó que el uso de lactato en la alimentación propició de forma sustancial la reducción de sulfato en ambos reactores. Cuando la relación DQO/SO_4^{2-} fue menor a 1.0, se obtuvo un efecto positivo sobre la eficiencia de producción de sulfuro, mientras que afectó negativamente la eficiencia de producción de metano. El reactor LFI mostró ser adecuado para el proceso de sulfatorreducción, al igual que el reactor UASB. La formación de azufre elemental en cultivos autotróficos aerobios con cargas de sulfuro de 0.7, 1.0 y 1.4 g S^2/L -día fue de 32, 72 y 74% respectivamente. El sulfato siempre estuvo presente en el efluente del reactor. Al utilizar el efluente de un reactor anaerobio que contenía sulfuro como alimentación se logró tener 16 y 44% de recuperación de azufre elemental. Esta baja recuperación es atribuible a la variación de la concentración de sulfuro en el influente. Se logró la oxidación de sulfuro a azufre elemental tratando el efluente de un reactor anaerobio en un reactor aerobio. Los experimentos llevados a cabo para evaluar la sensibilidad al sulfuro y oxígeno disuelto en dos tipos de agregados microbianos (lodo granular y biopelícula) mostraron que la metanogénesis en el lodo granular es menos resistente al sulfuro que cuando se encuentra adherida al soporte, mientras que la sulfatorreducción en la biopelícula adherida mostró una mejor tolerancia a las altas concentraciones de sulfuro. Al llevar a cabo simultáneamente la sulfatorreducción y la metanogénesis en presencia de oxígeno, el proceso total no fue afectado por el oxígeno suministrado, puesto que este pudo ser usado por los organismos que oxidan sulfuro o por los organismos facultativos. Los resultados mostraron que la integración de condiciones anaerobias y aerobias podría ser posible en un solo reactor y utilizarse como una estrategia adecuada para la completa transformación de sulfato en azufre elemental.

Celis García, Ma. de Lourdes Berenice (2004). Bio-elimination of sulfur oxidized compounds from effluents. Ph. D. Thesis. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México

Abstract

Waste waters and gases containing sulfur compounds are generated by many industries and represent an environmental problem when the effluents are discharged without any previous treatment. Their emission to the environment is related to the acid rain, corrosion, bad odor and health problems due to the toxicity of such contaminants.

In the anaerobic treatment of effluents containing oxidized sulfur compounds, sulfide is the end-product which is a corrosive and toxic compound. However, there are technologies based on the biological sulfur cycle that allows the transformation of sulfide into elemental sulfur which can be separated from the effluent by sedimentation. The produced elemental sulfur can be re-used as fertilizer or raw material for sulfuric acid production. In the anaerobic treatment of sulfate containing effluents, it is preferable that organic matter degradation and sulfate reduction occur simultaneously. The sulfate reducing bacteria are responsible of carry out this anaerobic process; due to the metabolic diversity of this bacterial group sulfate reducers can compete successfully with methanogenic archaea for the organic matter. The partial oxidation of sulfide to elemental sulfur is due to the action of several species from the genus *Thiobacillus*, which have the ability to excrete elemental sulfur outside the cell.

In this work the sulfate reduction and the sulfide oxidation processes were studied, with the aim of establish the most important parameters that could be used as guides for the possible integration of both processes in a single reactor. Sulfate reduction was studied with two anaerobic reactors, a UASB reactor and an inverse fluidized bed reactor (IFB). Both reactors showed COD removal efficiencies around 90%. The sulfate reducing process used around 70-75% of the COD removed and the methanogenic process was still present even when the COD/SO₄²⁻ ratio was the stoichiometric (0.66). It was observed that the use of lactate in the influent promoted substantially the sulfate reducing process in both reactors. When the COD/SO₄²⁻ ratio was lower than 1.0, a positive effect was observed on the sulfide production efficiency, meanwhile the same ratio negatively affected methane production. The IFB reactor showed that it is appropriate for the sulfate reduction process, in the same way as the UASB reactor. The formation of elemental sulfur in autotrophic cultures at sulfide loads of 0.7, 1.0 and 1.4 g S²⁻/L-day was 32, 72 and 74% respectively and sulfate was always present in the effluent of the reactor. When the effluent of an anaerobic reactor containing sulfide, was fed to the aerobic reactor an elemental sulfur recovery of 16 and 44% was attained. This low elemental sulfur recovery could be the result of the sulfide concentration variability in the influent. Sulfide oxidation to elemental sulfur in the aerobic reactor was possible using the effluent of an anaerobic reactor.

The experiments performed to evaluate the sensitivity towards sulfide and oxygen in two microbial aggregates (granular sludge and attached biofilm) showed that with granular sludge methanogenesis was less tolerant to sulfide than when the process was carried out using the biofilm attached to the plastic matrix of the IFB reactor. In contrast, sulfate reduction in the biofilm had a higher tolerance to sulfide. When methanogenesis and sulfate reduction were carried out at the same time in presence of oxygen, the total process was not affected by the oxygen supplied, due to the action of sulfide oxidizing or facultative bacteria. The results showed that the integration of anaerobic and aerobic conditions could be possible in a single reactor and could be used as strategy for the complete transformation of sulfate to elemental sulfur.

NOMENCLATURA

AGV Ácidos grasos volátiles

BESA Ácido 2-bromoetanensulfónico

BM Bacterias metanogénicas

BSO Bacterias sulfuro-oxidantes

BSR Bacterias sulfatorreductoras

CI₅₀ Concentración de inhibidor que reduce la actividad microbiana en 50%

CI₁₀₀ Concentración de inhibidor que detiene totalmente al actividad microbiana

DQO Demanda química de oxígeno

LFI Lecho fluidificado inverso

O₂/HS- Relación molar entre el oxígeno y el sulfuro consumidos

SSV Sólidos suspendidos volátiles

ST Sulfuro total

TRH Tiempo de residencia hidráulica

UASB Upflow anaerobic sludge blanket (lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente)

1. Introducción

1.1 Justificación

Una gran cantidad de efluentes industriales contienen altas concentraciones de compuestos azufrados y materia orgánica (Tabla 1.1). Si estos efluentes no son tratados los compuestos de azufre eventualmente se transformarán en sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico (H_2S). La emisión de H_2S es un problema asociado con el tratamiento anaerobio de aguas residuales y con los procesos cuyas corrientes de desecho (líquidas o gaseosas) lo contienen. Debido a sus propiedades tóxicas y corrosivas se vuelve indispensable la eliminación o minimización de este compuesto a niveles aceptables, antes de descargar al ambiente dichas corrientes. El sulfuro de hidrógeno se emite al ambiente como sulfuro disuelto en las aguas residuales y como ácido sulfhídrico en gases de desecho.

El sulfuro es tóxico para los humanos, a altas concentraciones (500-1000 ppm) es venenoso y puede provocar paro respiratorio y muerte. A bajas concentraciones (50-500 ppm) el H_2S actúa como irritante de las vías respiratorias (Buisman *et al.*, 1991).

Las propiedades corrosivas del H_2S cuando se encuentra en forma gaseosa pueden causar corrosión en los calentadores y motores de combustión interna. Cuando está disuelto en un efluente puede corroer paredes de concreto, sistemas de drenaje y tuberías de acero. Además genera un olor desagradable, su característico olor a huevo podrido es perceptible en el aire fresco a concentraciones tan bajas como 1 ppm. Aunado a lo anterior el sulfuro tiene una alta demanda de oxígeno, por cada mol de H_2S se necesitan dos moles de O_2 para formar sulfato.

A partir del ciclo del azufre se han desarrollado biotecnologías para eliminar los compuestos azufrados de todo tipo de efluentes, las cuales tienen por objeto producir azufre elemental (S^0) que sedimenta y puede ser separado fácilmente para su confinación o posterior re-uso. Estas tecnologías se basan en procesos de oxidación y reducción de los distintos intermediarios del ciclo del azufre, en este trabajo se estudiaron las relaciones cinéticas y de equilibrio de los principales reactivos y productos (O_2 , H_2S , SO_4^{2-}) de las

reacciones de óxido-reducción. Este estudio contribuye a tener un mejor entendimiento de los parámetros de diseño y operación del proceso biotecnológico que integre en un solo reactor la reducción de sulfato y la oxidación de sulfuro.

Tabla 1.1 Algunos procesos que generan corrientes que contienen compuestos azufrados

Tipo de industria	Compuesto de azufre (g/L)	pH	DQO (g/L)	Referencia
Pulpa y papel, proceso químico-termomecánico	SO ₄ ²⁻ (1.2-1.5) H ₂ S (0.05-0.20)	7-9	7.5-10.4	Habets y de Vegt (1991)
Viscosa y rayón (agua residual)	SO ₄ ²⁻ (3)	2-3	1-2	Kroiss <i>et al.</i> (1985)
Planta de celofán y rayón (emisión gaseosa)	H ₂ S (0-1000 ppm) CS ₂ (0-400 ppm)	-	-	Revah <i>et al.</i> (1995)
Fermentación (ácido cítrico)	SO ₄ ²⁻ (2.5-4.5)	-	30	Svardal <i>et al.</i> (1993)
Aceite comestible	SO ₄ ²⁻ (10-50)	2-3	2-6	Hoeks <i>et al.</i> (1984)
Aceite comestible	SO ₄ ²⁻ (9.6-11.5)	-	2.0-2.9	Rinzema y Lettinga (1994)
Procesadora de mariscos	SO ₄ ²⁻ (2.1-2.7)	-	12.4-16.9	Mendez <i>et al.</i> (1995)
Tenería	H ₂ S (0.15-0.3) SO ₄ ²⁻ (1.2-2.0)	8.6	4.8-8.0	Shin <i>et al.</i> (1996)
Proceso fotográfico	S ₂ O ₃ ²⁻ (45.5) SO ₄ ²⁻ (8.0) SO ₃ ²⁻ (3.5)	-	67.8	Lens <i>et al.</i> (1998)
Producción de TNT (Trinitrotolueno)	SO ₄ ²⁻ (51.4) SO ₃ ²⁻ (5.5)	7.6	68.5	Hao <i>et al.</i> (1994)
Refinería (sosas gastadas)	SO ₄ ²⁻ (20.3) H ₂ S (48.5)	13	320	Olmos <i>et al.</i> (2004)

1.2 El ciclo biológico del azufre

El azufre está presente en todos los organismos (1%) y forma parte de muchos compuestos orgánicos como aminoácidos, (poli)péptidos, cofactores enzimáticos, antibióticos, lípidos y carbohidratos. En estos compuestos el azufre puede tener funciones catalíticas, estructurales o reguladoras. En contraste, el papel biológico de los compuestos inorgánicos

está más bien restringido: ya sea que sirven como fuente de asimilación e incorporación del azufre a los compuestos orgánicos, o se emplean como donadores o aceptores de electrones en el transporte no asimilativo de los mismos. Estas últimas rutas establecen un potencial electroquímico de membrana que puede ser utilizado para la síntesis de ATP, reducción de NAD u otros procesos que impliquen consumo de energía (Steudel, 1998).

El sulfuro, los polisulfuros, el tiosulfato, los politionatos, el azufre elemental, el bisulfito y el sulfato son los compuestos inorgánicos más comunes que se encuentran en ambientes naturales. Pueden ser usados por muchos organismos con fines asimilativos o no asimilativos. El sulfato y el sulfuro son los productos finales de la mayoría de las rutas de oxidación o reducción de los compuestos azufrados, mientras que los compuestos de azufre con estados de oxidación intermedio pueden servir como aceptores o donadores de electrones (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Compuestos de azufre inorgánicos de relevancia biológica (Brüser *et al.*, 2000).

Compuesto	Fórmula química	Estado de oxidación del azufre
Sulfuro	HS^-	-2
Polisulfuros	$^-\text{S}(\text{S}_n)\text{S}^-$	-1 (S terminal) / 0 (S interno)
Tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	-1 (S sulfano) / +5 (S sulfona)
Politionatos	$^-\text{O}_3\text{S}(\text{S})_n\text{SO}_3^-$	0 (S interno) / +5 (S sulfona)
Azufre elemental	Anillos S_n	0
Bisulfito	HSO_3^-	+4
Sulfato	SO_4^{2-}	+6

En las rutas no asimilativas, el tiempo de retorno de los compuestos azufrados es alto y el producto final es liberado al ambiente. Sin embargo, las rutas se pueden truncar en algún punto dando como resultado la formación y secreción de compuestos de azufre de estados de oxidación intermedios.

El sulfuro se forma como el principal producto de la respiración de sulfato por bacterias que dominan bajo condiciones anaerobias cuando la materia orgánica y el sulfato no son limitantes. El tiosulfato y azufre elemental también pueden servir como aceptores finales de electrones y producir sulfuro; este último también se libera al ambiente por la desulfuración de compuestos orgánicos que contienen azufre reducido como las proteínas.

El tiosulfato puede formarse por la reacción no biológica de sulfito con sulfuro o politionatos (Suzuki, 1999). La formación de tiosulfato como producto de la fermentación de la taurina se ha observado en casos raros (Denger et al., 1997). El tiosulfato parece jugar un papel importante en el ciclo biológico del azufre, porque muchas de las bacterias que oxidan azufre y también las productoras de sulfuro aceptan el tiosulfato como sustrato para el metabolismo no asimilativo (Barret y Clark, 1987).

El azufre elemental se puede formar por bacterias sulfoxidantes (BSO) que oxidan sulfuro u otros compuestos reducidos de azufre. En muchas especies el azufre elemental es el producto final de la oxidación y por lo tanto puede ser metabolizado aún más por bacterias sintróficas.

El sulfato se forma bajo condiciones aerobias a partir de la mayoría de los compuestos que son sensibles a los procesos de oxidación. Las bacterias que oxidan compuestos reducidos de azufre aceleran el proceso.

El tetracionato puede ser un sustrato natural para las BSO, se origina de procesos de oxidación incompletos y puede ser producido a partir de tiosulfato por algunas bacterias en un solo paso. Los polisulfuros pueden producirse ya sea por el rompimiento reductivo del anillo de azufre con sulfuro o por la oxidación parcial de sulfuro (Steudel 1998).

El sulfito es un intermediario en la mayoría de las rutas redox de los compuestos azufrados, se encuentra permanentemente en las fuentes hidrotermales submarinas (hydrothermal vents) o manantiales calientes (hot springs), en donde puede ser reducido a sulfuro por archeobacterias termofílicas (*Pyrobaculum islandicum*). Las bacterias del género *Sulfitobacter* pueden crecer oxidando sulfito. En algunas bacterias la presencia de una sulfito siroheme reductasa reflejaría que el sulfito es un intermediario en la oxidación de sulfuro a sulfato (Barton, 1992).

Las oxidaciones y reducciones bioquímicas de los compuestos de azufre constituyen el ciclo biológico del azufre que se representa esquemáticamente en la Figura 1.1. Mientras que la reducción asimilativa de sulfato es muy común en procariotes, plantas y hongos, las rutas no asimilativas están restringidas a eubacterias y arqueas. En los ambientes naturales las rutas del ciclo están interconectadas y los ecosistemas en los que las transformaciones de azufre (reducción de sulfato y oxidación de sulfuro) se llevan a cabo de forma cíclica se llaman

Sulfuretum. En la naturaleza los *Sulfureta* se encuentran en diferentes ambientes, como en las fuentes hidrotermales, sedimentos marinos y mantos microbianos (van den Ende *et al.*, 1997). Estos ecosistemas son importantes desde los puntos de vista científico y ambiental, por la presencia de microorganismos muy especiales y por el ciclaje del azufre elemental.

Como se puede observar en la Figura 1.1, el ciclo consiste de una etapa oxidativa y otra reductora, en donde el azufre completa ciclos pasando del estado de oxidación +6 para el sulfato (SO_4^{2-}) al -2 para el sulfuro (S^{2-}) y este a su vez es oxidado de nuevo a SO_4^{2-} .

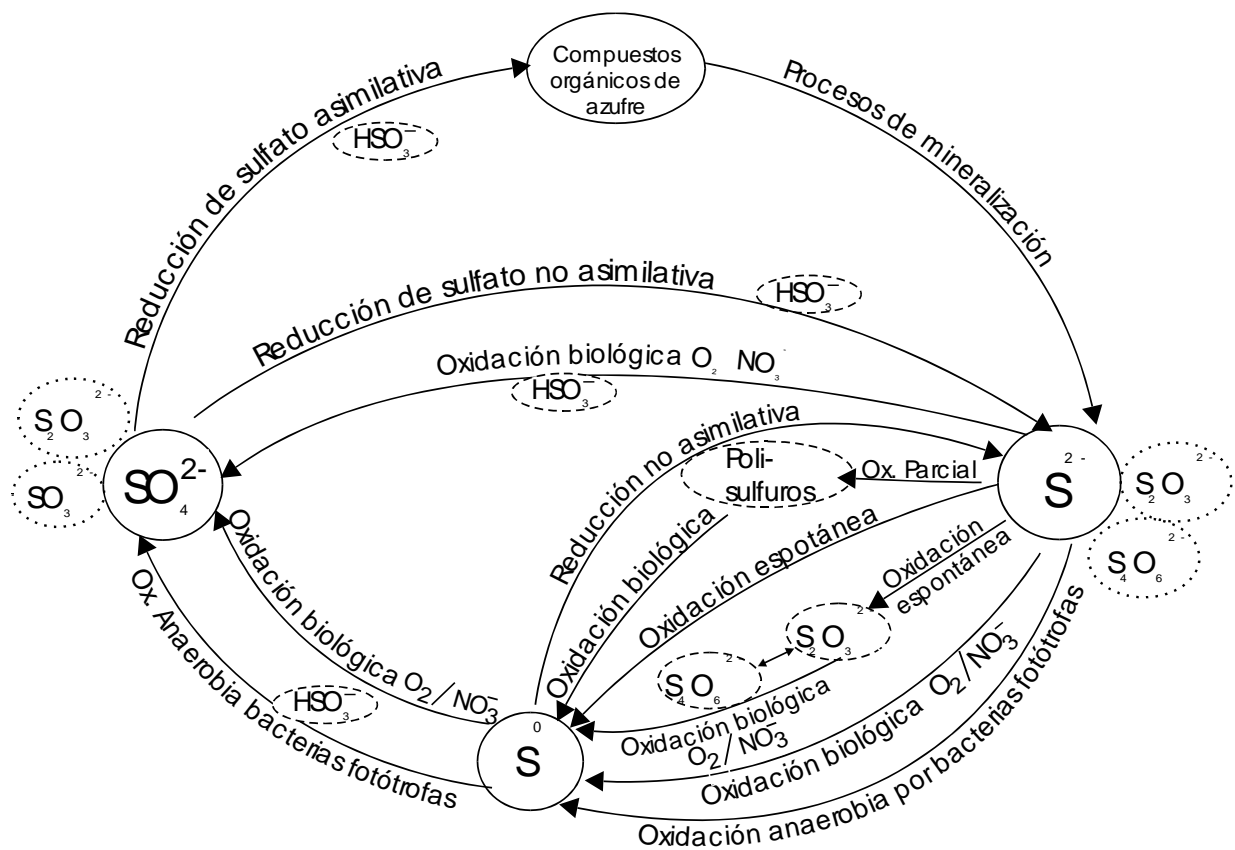


Figura 1.1 El ciclo biológico del azufre, intermediarios (---), substratos alternos (····); modificado de Robertson y Kuenen (1992) y Brüser *et al.* (2000).

Bajo condiciones anaerobias, en ausencia de nitrato, el sulfuro es la forma de azufre energéticamente más estable; similarmente bajo condiciones aerobias el sulfato es el compuesto de azufre más estable. Algunos compuestos de azufre destacando el HS^- y los

sulfuros metálicos reaccionan espontáneamente con el oxígeno. Sin embargo en muchos casos las reacciones biológicas pueden competir satisfactoriamente con las reacciones espontáneas a velocidades que pueden llegar a ser 100 ó 1000 veces mayores (Lens y Kuenen, 2001). Las etapas del ciclo biológico del azufre en las que se basa esta tesis son la reducción no asimilativa de sulfato y la oxidación biológica de sulfuro a azufre elemental.

En la reducción no asimilativa de sulfato las bacterias sulfatorreductoras (BSR) utilizan al SO_4^{2-} como aceptor final de electrones bajo condiciones estrictamente anaerobias. Las BSR comprenden géneros como: *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus* y *Desulfonema* entre otros (Widdel y Hansen 1992). Dichos géneros están ampliamente distribuidos sobretudo en el ambiente, en sedimentos anaerobios o ambientes acuosos, suelos saturados de agua e intestinos de animales, son organismos anaerobios quimioheterótrofos y en presencia de sulfato son capaces de usar varios intermediarios del proceso de digestión anaerobia como fuentes de electrones, de energía y de carbono. Además de hidrógeno, formiato, propionato y lactato, pueden utilizar etanol, metanol, ácidos grasos ramificados y otros alcoholes, alcanos y compuestos aromáticos entre muchos otros substratos (Barton, 1992). El producto final de la reducción de sulfato es el sulfuro que puede ser tomado por organismos quimioautótrofos y fotótrofos y re-oxidarse a sulfato o a azufre elemental, puede volatilizarse a la atmósfera o reaccionar con metales para formar sulfuros metálicos (Maier, 2000).

La oxidación biológica del sulfuro puede ocurrir bajo condiciones anóxicas, anaerobias y aerobias. En presencia de nitrato las bacterias incoloras del azufre oxidan el sulfuro hasta azufre o sulfato, los electrones del sulfuro se utilizan para convertir el oxígeno o nitrato en H_2O ó N_2 ; los electrones también pueden usarse para la reducción de CO_2 . La oxidación anaerobia del sulfuro se lleva a cabo por las bacterias fotótrofas de las familias *Chlorobiaceae* y *Cromaticeae*. En presencia de oxígeno, las bacterias incoloras del azufre pertenecientes ya sea a las proteobacterias (*Beggiatoa*, *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thioploca*, *Thiosphaera*, *Thiospira*, *Thiotrix* y *Thiovulum*) o a las archeobacterias (*Sulfolobus* y *Acidanus*) también son capaces de crecer litotróficamente en compuestos reducidos de azufre de donde obtienen energía, mientras que el carbono lo obtienen al fijar CO_2 mediante el ciclo

de Calvin (Friedrich, 1998). La diversidad metabólica y filogenética de estas bacterias sugiere que se pueden encontrar muchas diferencias entre ellas como son su diferente capacidad para utilizar varios compuestos azufrados. En consecuencia, las rutas de oxidación de los compuestos son muy variables.

1.3 Biotecnologías para la eliminación de compuestos azufrados

Los procesos tecnológicos ambientales basados en el ciclo del azufre se fundamentan en la formación de intermediarios insolubles que pueden ser físicamente separados de la fase líquida. Los intermediarios sólidos que se acumulan en la naturaleza (CaSO_4 , sulfuros metálicos y azufre elemental) son usados en las tecnologías ambientales. La conversión a productos finales gaseosos (H_2S y mercaptanos) no puede usarse como un método de eliminación de sulfato puesto que son tóxicos, corrosivos y de olor ofensivo (Lens y Kuenen, 2001).

La mayoría de los procesos biotecnológicos basados en el ciclo del azufre se llevan a cabo en dos etapas, en la primera se debe alcanzar la reducción completa no asimilativa de sulfato a sulfuro; en la segunda etapa el sulfuro producido es oxidado biológicamente a azufre elemental. El azufre producido al ser insoluble puede separarse de la corriente líquida y ser re-utilizado para la producción de fertilizantes y de ácido sulfúrico (van Lier, *et al.*, 2001), esta tecnología se conoce en general como remoción biológica de azufre. Los aspectos importantes de la primera etapa son la habilidad de las bacterias sulfatorreductoras de competir con las bacterias metanogénicas por el sustrato orgánico disponible y la sensibilidad del consorcio bacteriano a los niveles tóxicos de sulfuro. En la segunda etapa, el sulfuro producido puede oxidarse parcialmente a azufre elemental por la acción de las bacterias incoloras del azufre (Buisman *et al.*, 1990); esta alternativa resulta ser la más económica cuando se compara con la precipitación del sulfuro (con Fe ó Mg) y con los altos requerimientos de energía para el *stripping* del sulfuro de la corriente gaseosa.

La remoción biológica de azufre se ha aplicado para la desulfuración de desechos de ácido sulfúrico (Stucki, *et al.*, 1993); aguas residuales de la minería (Maree, *et al.*, 1991) y otras aguas residuales industriales ricas en sulfato (Särner, 1990). Para las aguas residuales que no contienen suficientes donadores de electrones para la reducción completa de sulfato

será necesario adicionarlos. Los donadores de electrones que se adicionen tendrán que ser compuestos orgánicos simples como etanol, metanol o gas de síntesis que es una mezcla de H_2 , CO y CO_2 . La selección del donador obedece tanto al costo del donador adicionado como al residuo que se genera en la corriente de desecho (van Houten *et al.*, 1994, 1996).

Otra forma de aprovechar las capacidades de degradación de las BSR, es utilizar reactores bajo condiciones combinadas anaerobias y aerobias. Estos sistemas permiten la mineralización completa de ciertos compuestos xenobióticos. Las condiciones microaerofílicas se pueden crear en reactores de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés) mediante la dosificación de cantidades controladas de oxígeno al influente rico en sulfato. Los reactores híbridos permiten separar el lodo granular anaerobio de la matriz aireada (biopelícula). También pueden utilizarse reactores de flujo reverso en una sola etapa (Arora *et al.*, 1995) o multietapa (Takashashi y Kyosai, 1991). Dentro de estos reactores se desarrolla un tipo especial de lodo granular, compuesto por BSR en la capa interior anaerobia y de bacterias sulfoxidantes como *Beggiatoa* sp. en la capa periférica de los gránulos; de esta forma la degradación de la materia orgánica tiene lugar por reducción de sulfato y oxidación de sulfuro.

El uso del sulfuro para formar precipitados de sulfuros metálicos es otra aplicación de la remoción biológica del azufre y ha sido un éxito en el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados y sulfato generadas en los procesos mineros y de extracción de metales, recientemente se hizo una revisión detallada sobre la aplicación del ciclo del azufre en la biolixiviación de sulfuros minerales y la remoción de metales (Boon, 2000; Hao, 2000).

1.3.1 Reducción no asimilativa de compuestos oxidados de azufre (sulfato, sulfito y tiosulfato)

Las BSR son muy versátiles metabólicamente y para poder reducir el sulfato este tiene que ser activado primero a APS (adenosina-5'-fosfosulfato) que a su vez se reduce directamente a sulfito y después de varios pasos a sulfuro. El producto final siempre es H_2S y no se ha reportado la reducción incompleta a S^0 . Esto puede atribuirse a la máxima recuperación energética (se supone que se forman 3 ATP) en el caso de la reducción de sulfato a sulfuro

y bioquímicamente el HS⁻ disuelto puede ser excretado fácilmente mientras que la excreción de S⁰ sólido podría representar un problema bioquímico para las células (Brüser *et al.*, 2000).

Dentro de las BSR se pueden distinguir dos grandes grupos metabólicos. El grupo (a) que comprende las especies que oxidan incompletamente sus sustratos a acetato y no puede oxidarse más. Grupo (b) que incluye a las especies que en principio son capaces de oxidar los compuestos orgánicos incluyendo acetato completamente a CO₂ (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Reacciones metabólicas de las bacterias sulfatorreductoras y sus cambios de energía libre de Gibbs. Compilado de Widdel, 1998.

Reacción	$\Delta G^{0'}$ (kJ/reacción)	Género representativo
$2\text{LA}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HA}^- + 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}^+$	-160.1	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfotomaculum</i>
$3\text{LA}^- \rightarrow 2\text{PA}^- + \text{HA}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	nd	<i>Desulfobulbus</i>
$2\text{LA}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 6\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	-255.3	<i>Desulfobacter</i>
$4\text{PA}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{HA}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	-150.6	<i>Desulfobulbus</i>
$4\text{PA}^- + 7\text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow 12\text{HCO}_3^- + 7\text{HS}^- + 2\text{H}^+$	-340.99	<i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfobacterium</i>
$\text{HA}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6	<i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacterium</i>

LA⁻, CH₃CHOHCOO⁻ (lactato); PA⁻, CH₃CH₂COO⁻ (propionato); HA⁻, CH₃COO⁻ (acetato); nd, no determinado

Las BSR que oxidan incompletamente sus sustratos pueden crecer significativamente más rápido que las BSR que oxidan completamente los sustratos. Bajo condiciones óptimas, las especies de *Desulfovibrio* que utilizan hidrógeno, lactato o piruvato pueden alcanzar tiempos de duplicación de 3 a 4 horas. Por lo tanto, en cultivos en lote enriquecidos con donadores de electrones que puedan ser usados por las BSR que oxidan incompleta y completamente los sustratos se obtiene un cultivo rico en BSR que oxidan incompletamente la fuente de carbono (Widdel, 1988). Por otro lado también es importante diferenciar entre BSR heterótrofas y autótrofas. Las BSR heterótrofas pueden utilizar compuestos orgánicos como sustrato. Las BSR autótrofas utilizan CO₂ como fuente de carbono mientras que los electrones los obtienen de la oxidación del hidrógeno (H₂). En un

sistema de tratamiento de aguas residuales, el H_2 puede agregarse directamente al reactor o puede generarse a partir de varios donadores de electrones presentes en el agua residual como propionato y glucosa. Un factor que puede complicar el sistema es que además de la reducción de sulfato las BSR pueden obtener energía de la fermentación de materia orgánica en ausencia de sulfato. Esta característica les permite sobrevivir en reactores anaerobios bajo condiciones de limitación de sulfato (Lens y Kuenen, 2001).

Por muchos años la reducción de sulfato fue considerada como un proceso indeseable en el tratamiento anaerobio de efluentes o desechos ricos en sulfato (u otros compuestos oxidados de azufre), ya que la reducción de dichos compuestos a H_2S provoca una serie de problemas: un bajo rendimiento de metano, producción de biogás de baja calidad que requiere de tratamiento, baja eficiencia en la remoción de DQO, toxicidad, mal olor y corrosión.

En presencia de sulfato el proceso metanogénico es difícil de alcanzar y es por esto que inicialmente la investigación de la sulfatorreducción se enfocaba en el papel negativo que tenía dentro del tratamiento anaerobio de aguas residuales (Rinzema y Lettinga, 1988). Los esfuerzos en la investigación fueron dirigidos entonces hacia la prevención o minimización de la sulfatorreducción. Las estrategias incluían el uso de análogos del sulfato (p. ej. molibdato) que interfiere con la generación de ATP de las BSR y causa el agotamiento de la reserva de ATP (Yadav y Archer, 1989; Clancy *et al.*, 1992); la inhibición por metales de transición como cobre, zinc, manganeso y cobalto que afectan a las BSR a bajas concentraciones en mayor medida que a las BM (Capone *et al.* 1983); y el uso potencial de antibióticos en cultivos puros de BSR y de BM, aunque de los 88 tóxicos potenciales se encontró que solo 9 inhibían a las BSR sin inhibir a las BM (Tanimoto *et al.* 1989). Sin embargo, en reactores continuos ninguna de las medidas antes mencionadas tuvo éxito. Hasta la fecha, no se ha encontrado un inhibidor selectivo para las BSR que pueda ser usado en reactores continuos por lo que en términos prácticos la sulfatorreducción no puede prevenirse (Hulshoff Pol, *et al.*, 2001).

Gracias a todos los estudios hechos sobre la reducción de sulfato en la degradación anaerobia, en los últimos 12 años este proceso se ha aceptado como una conversión microbiana muy útil para abatir la contaminación por compuestos azufrados y metales

pesados. Recientemente el interés en la aplicación de la reducción de sulfato (o sulfito) como el paso principal para el tratamiento biológico de corrientes de desecho de las industrias química, minera y de desulfuración de gas esta creciendo. Las nuevas y prometedoras aplicaciones del uso de la reducción de sulfato en reactores anaerobios son aumentar la remoción de la materia orgánica, degradación de xenobióticos y la eliminación de metales pesados. La remoción biológica de azufre es una alternativa efectiva a los métodos fisicoquímicos de remoción que resultan ser caros y más complejos (Maree y Hill, 1989).

1.3.2 Oxidación de sulfuro

En la oxidación parcial de sulfuro a azufre elemental las bacterias fotosintéticas pueden metabolizar el H_2S efectivamente. Cork *et al.*, (1986) estudiaron los géneros de la familia *Chlorobioaceae* y *Chromaticeae* que utilizan electrones del sulfuro para la reducción y asimilación del CO_2 , al utilizar como fuente de energía la luz solar. Por otro lado, también se llevaron a cabo estudios con células inmovilizadas de *Chlorobium limicola* en perlas de alginato, permitiendo atrapar el S^0 pero encontrando dificultades en su recuperación (Kim *et al.*, 1993). La mayor desventaja de usar bacterias fotosintéticas a gran escala reside en su naturaleza anaerobia, así como en el requerimiento de energía luminosa que implica tener un área superficial extensa y transparente. También se necesita un buen mezclado pues la formación de S^0 produce suspensiones turbias, incrementando los costos de iluminación (Jensen y Webb, 1995).

El uso de bacterias quimioutótrofas como las pertenecientes al género *Thiobacillus* tiene la ventaja de que éstos tienen pocos requerimientos nutricionales, producen azufre elemental extracelular, además de que son las que tienen una mayor afinidad por el sulfuro, permitiéndoles competir exitosamente con la oxidación química del sulfuro (Gadre, *et al.* 1989).

Los estudios con cultivos mixtos de bacterias productoras de azufre han mostrado que la formación de éste es dependiente de la carga de sulfuro y la disponibilidad de oxígeno. Normalmente las bacterias sulfoxidantes oxidan completamente el sulfuro a sulfato generando más energía metabólicamente útil comparada con la oxidación parcial a azufre elemental. Para obtener S^0 como producto la oxidación de sulfuro debe ser forzada en la

dirección de producción de azufre, utilizando altas cargas de sulfuro o bajas concentraciones de oxígeno (Stefess *et al.* 1996). La formación de azufre también puede ser regulada por la adición estequiométrica de oxígeno, se puede lograr un control más rígido del sistema mediante el monitoreo del potencial redox (Janssen *et al.* 1998, 1997).

Cuando el nitrato es el aceptor final de electrones el S^0 es un intermediario en la oxidación autotrófica del sulfuro, los estudios realizados por Sublette y Silvester (1897 a,b) con *T. denitrificans* dieron como resultado la oxidación de sulfuro a sulfato sin la recuperación del azufre. Por otro lado el uso con bacterias desnitrificantes promovió más que nada la remoción de nitrato (Gommers *et al.* 1998 a, b).

La estabilidad y decantabilidad del azufre elemental producido son muy importantes en los procesos de remoción biológica de azufre. Bajo las condiciones que son óptimas para el crecimiento y actividad de las bacterias sulfoxidantes (30-47°C, pH 7-10), el S^0 producido biológicamente es estable; a temperatura y pH más altos el S^0 dismuta para producir sulfito y sulfuro, bajo condiciones aerobias la mezcla reaccionará para formar tiosulfato (Lomans *et al.* 2002). El S^0 producido microbiológicamente se agrega muy bien formando partículas que sedimentan rápido, en contraste con el azufre producido químicamente pues es más hidrofóbico (Janssen *et al.*, 1998). Las partículas de S^0 producidas biológicamente sedimentan más rápido pudiéndose separar fácilmente de la corriente acuosa que lo contiene, este azufre puede purificarse y ser reutilizado dando un valor agregado al proceso.

En el caso de que se este llevando a cabo la remoción biológica de azufre (reducción-oxidación) descrita anteriormente, cuando el S^0 es reintroducido al reactor anaerobio con la corriente de recirculación puede ser convertido otra vez a sulfuro por bacterias reductoras de azufre, además del amplio espectro de bacterias reductoras de S^0 y SO_4^{2-} otras que no son reductoras de sulfato han demostrado su capacidad para reducir S^0 a sulfuro como las de los géneros *Wollinella*, *Sulfolobales* y metanógenas (Hedderich *et al.*, 1998; Stterter y Gaag, 1983). Por lo tanto las BM pueden ser parte del sulfuretum, en donde pueden actuar como reductores de S^0 . Otra conversión microbiológica del S^0 es su dismutación a HS^- y SO_4^{2-} por la reacción y subsiguiente precipitación con Fe(III), Fe(II), y Mn(IV) llevada a cabo por bacterias del género *Desulfobulbus* (Lovley y Phillips, 1994). La formación de SO_4^{2-} bajo

condiciones estrictamente anaerobias podría afectar negativamente el desempeño de un reactor sulfurogénico y por lo tanto el proceso integral de remoción biológica de azufre.

1.4 Toxicidad de los compuestos de azufre

Se sabe que la toxicidad del sulfuro está relacionada con el pH pues solo la molécula neutra no disociada de sulfuro de hidrógeno (H_2S) puede atravesar la membrana celular (Speece, 1983). En solución el sulfuro es un ácido débil y se disocia como sigue:



El valor de pka del H_2S es de 7.04 a 18°C. En el intervalo de pH 8.0-9.0 prácticamente todo el sulfuro disuelto está presente en su forma no ionizada. A pH cercano al neutro, entre 20 y 50% del sulfuro disuelto está presente como H_2S dependiendo de la temperatura. El mecanismo exacto de la toxicidad del H_2S no está claro aún. Un posible mecanismo es que mediante gradientes osmóticos el H_2S penetra la membrana y una vez en el citoplasma el H_2S puede desnaturalizar las proteínas formando puentes sulfuro o bisulfuro entre las cadenas polipeptídicas. El H_2S también puede interferir con las coenzimas A y M formando uniones sulfuro. Esto puede interferir en la ruta de la acetil-coenzima A para la fijación de CO_2 que es común para las BSR y BM. El H_2S también puede afectar el pH interno de la célula (Widdel, 1988). El sulfuro puede inhibir a las BSR, probablemente también cuando cualquiera de las especies de sulfuro (H_2S , HS^- y S^{2-}) se combina con el hierro de la ferredoxina, del citocromo y de otros compuesto esenciales que contienen hierro en la célula, causando que los sistemas de transporte de electrones cesen su actividad (Hao *et al.*, 1996).

Se asume que la forma inhibitoria del sulfuro es la forma no disociada: H_2S . Por lo tanto se esperaría una correlación directa entre la concentración de H_2S no disociado y el grado de inhibición. Sin embargo esta relación no siempre es directa y otros parámetros como la concentración de sulfuro total ($ST = H_2S + HS^- + S^{2-}$) se correlacionan mejor con la inhibición observada. La literatura sobre la inhibición de sulfuro es muy compleja y a veces

contradictoria, a veces no se incluye el valor de pH al cual se llevaron a cabo los experimentos, lo que dificulta saber que papel tuvo el H₂S en la inhibición. De hecho varios autores han reportado que la inhibición de las BSR y las BM esta relacionada con la concentración de sulfuro total en el intervalo de pH entre 7.0 y 9.0 (Koster *et al.*, 1986; Visser *et al.*, 1996; O'Flaherty *et al.*, 1998a).

Tabla 1.4 Valores de IC₅₀ para las bacterias sulfatorreductoras en lodos anaerobios (modificada de Hao, 1996)

Tipo de biomasa (reactor)	Substrato	Temperatura °C	pH	H ₂ S (mg /L)	Sulfuro Total (mg/L)	Referencia
Lodo suspendido (Quimiostato)	Lactato	35	7.2-7.6	80	-	Reis <i>et al.</i> , 1992
Cultivo mixto (Filtro anaerobio)	Propionato				350	Parkin <i>et al.</i> , 1991
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (Quimiostato)	Lactato	37	6.2-6.6	-	450	Okabe <i>et al.</i> , 1992
Cultivo mixto (Experimento en lote)	Acetato y lactato	35	7.0	-	1000	Hilton y Oleszkiewicz 1988
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (Quimiostato y lote)	Lactato	37	7.0	-	250	Okabe <i>et al.</i> , 1995
Cultivo mixto (Quimiostato)	Propionato	37	7.5	180	-	Uberoi y Battacharya (1995)
Lodo granular	acetato	30	7.2-7.4 8.1-8.3	171 57	615 1125	Visser, 1995
Biopelícula anaerobia Adaptada a sulfato	acetato	30	7.2 7.6 8.0	550 867 990		O'Flaherty 1998a

En las Tablas 1.4 y 1.5 se resumen algunos de los datos disponibles de la inhibición del sulfuro sobre las bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras.

Tabla 1.5 Valores de IC₅₀ para la inhibición de H₂S de las bacterias metanogénicas en lodos anaerobios (Modificada de Visser, 1995).

Biomasa	Substrato	Temperatura (°C)	pH	H ₂ S (mg/L)	Sulfuro total (mg/L)	Referencia
Lodo suspendido	Agua residual destilería	37	7.0-7.2	130	-	Karhadkar <i>et al.</i> , 1987
Lodo suspendido	Lactato	35	7.0 8.0	100 100	-	McCartney y Oleszkiewicz, 1993
Lodo suspendido	Acetato	35	6.5-7.4 7.7-7.9	125 100	-	Oleszkiewicz, <i>et al.</i> , 1989
Lodo granular	Acetato	30	6.2-6.4 7.0-7.2 7.8-8.0	246 252 90	-	Koster <i>et al.</i> , 1986
Lodo granular	Acetato	30	7.2-7.4 8.1-8.3	184 38	564 590	Visser, 1995
Lodo anaerobio	Acetato	37	7.6 8.0 8.5	142 68 19	889 970 963	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998a

Se ha observado también que la inhibición de las BM depende de las características del lodo, siendo el lodo granular menos sensible (Visser *et al.*, 1996) que los lodos suspendidos (Hilton y Oleskiewickz, 1988; McCartney y Oleskiewickz, 1993). La mayor concentración de sulfuro reportada por Omil *et al.* (1997b) fue de 756 mg/L para un reactor EGSB operando a eficiencias de remoción de DQO de 75% alimentado con acetato, propionato y butirato a un pH de 8.0. En otros experimentos llevados a cabo con lodo granular y acetato se encontró que el efecto del sulfuro en las BSR a pH mayor de 7 la inhibición esta determinada por el sulfuro total, mientras que para las BM el tipo de lodo también tuvo que ver, en lodo suspendido la concentración de sulfuro no ionizado fue la más importante y en lodo granular la concentración de sulfuro total dictó la inhibición. Entre pH 6.8 y 7.2 O'Flaherty *et al.* (1998a) encontró que la inhibición por sulfuro sobre varias especies de bacterias sintróficas, metanógenicas y sulfatorreductoras estaba relacionada con el sulfuro no ionizado, mientras que a pH mayor a 7.2 la inhibición estuvo más relacionada con la concentración de sulfuro disuelto.

Los estudios realizados tanto con un cultivo puro (*Desulfovibrio desulfuricans*) y con un cultivo mixto anaerobio han demostrado que la inhibición por sulfuro sobre las BSR es del tipo no competitivo y puede ser reversible (Okabe, *et al.*, 1995; Kaksonen *et al.*, 2004). Por otro lado Maillacheruvu *et al.* (1993), encontraron que un sistema sulfatorreductor alimentado con diferentes substratos orgánicos (donadores de electrones) mostró diferentes sensibilidades al H₂S o sulfuro total. Además también señalaron que los filtros anaerobios fueron capaces de tolerar más altas concentraciones de H₂S y sulfuro total que los reactores con biomasa suspendida. De esta forma, los factores como el transporte de substrato dentro de las biopelículas, flóculos o gránulos, el sitio en donde se lleva a cabo la sulfatorreducción y su proximidad al sitio en donde se lleva a cabo la metanogénesis, la difusión del H₂S y sulfuro total y los gradientes de pH, etc., tienen un papel muy importante en el grado de inhibición de las bacterias.

Las concentraciones inhibitorias del sulfuro sobre las BSO están entre 4.8 y 32 mg/L (Steffes, *et al.*, 1996). Aunque parece ser que el origen del inóculo tiene influencia sobre la tolerancia al sulfuro pues se ha reportado que para una suspensión de células obtenidas de un reactor que operaba a una concentración de sulfuro de 7 mg/L mostró inhibición severa a concentraciones mayores de 10 mg/L de sulfuro. Mientras que para una suspensión de células obtenidas de un reactor que operaba con una concentración de 95 mg/L, no se observó inhibición por sulfuro hasta una concentración de 600 mg/L (Buisman *et al.*, 1990).

El sulfato puede inhibir la oxidación de sulfuro por la bacteria sulfoxidante *Thiobacillus denitrificans* a concentraciones entre 20 y 25 g/L, se argumenta que este efecto se presentó como consecuencia de un fuerte estrés iónico (Ongcharit *et al.*, 1991). Por otro lado se reportó el efecto negativo del sulfato sobre los cultivos sulfoxidantes, en un biofiltro para la eliminación de sulfuro de hidrógeno, a concentraciones mayores de 25 g/L (Yang y Allen, 1994)

1.5 Objetivos

1. Desarrollar un proceso integral que permita la reducción de sulfato a sulfuro y la oxidación de sulfuro a azufre elemental para la eliminación simultánea de materia

orgánica y azufre de los efluentes que tengan alto contenido de compuestos oxidados de azufre; evitando de esta forma la emisión de sulfuro al ambiente

2. Estudiar el proceso de reducción de sulfato para la óptima eliminación de materia orgánica y conversión de sulfato a sulfuro definiendo las condiciones de operación que favorezcan este proceso en un reactor anaerobio inoculado con lodo metanogénico.
3. Estudiar el proceso de oxidación de sulfuro en un reactor aerobio utilizando un consorcio sulfoxidante bajo condiciones quimiolitotróficas que permitan la oxidación parcial de sulfuro a azufre elemental.
4. Identificar los parámetros de control para el reactor anaerobio y el reactor aerobio para la integración secuencial de los procesos de reducción de sulfato y de oxidación de sulfuro.
5. Estudiar el efecto tóxico que tienen el sulfuro y el oxígeno sobre las bacterias sulfatorreductoras con la finalidad de establecer las concentraciones inhibitorias de dichos compuestos, para la posible integración de los procesos de reducción de sulfato y oxidación parcial de sulfuro en un solo reactor.

1.6 Estructura de la tesis

Esta tesis contiene 5 capítulos más. En el capítulo 2 se describe la metodología general de análisis y los reactores utilizados en los experimentos. En cada uno de los siguientes tres capítulos se presentan un resumen, una breve introducción, la metodología empleada así como los resultados y discusión de los mismos. En el capítulo 3 se discute la operación en continuo de dos reactores anaerobios sulfatorreductores con el fin de obtener un efluente conteniendo sulfuro. En el capítulo 4 se discute la operación de un reactor aerobio que operaba primero con un influente sintético que contenía sulfuro de sodio y posteriormente con el efluente de uno de los reactores sulfato reductores. Puesto que una de las ideas iniciales del proyecto era llevar a cabo la sulfatorreducción y sulfuro-oxidación en un solo reactor en el capítulo 5 se presentan y discuten los resultados concernientes a la inhibición de las bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras al ser expuestas a altas concentraciones

de oxígeno y sulfuro. Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones generales del trabajo y se exponen algunas recomendaciones.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Reactor anaerobio UASB

Los experimentos en continuo se llevaron a cabo en un reactor de vidrio UASB, de 6.5 cm de diámetro interno y 30 cm de largo con fondo y de 1.4 L de volumen (Figura 2.1 A). Para alimentar el reactor se usaron bombas peristálticas y mangueras de silicón. El biogás se colectaba en el separador gas-sólido-líquido y mediante una manguera de neopreno pasaba del colector a una columna invertida llena de solución salina saturada (NaCl 300g/L) acidificada (pH=2) y con rojo de metilo como indicador de la eventual disolución de CO₂. La tasa volumétrica de producción de metano, expresada como gDQO/L-día se calculó a partir del flujo de biogás y la concentración de metano en el biogás. La concentración de sulfuro de hidrógeno en el biogás se calculó a partir de la concentración de sulfuro en el líquido (H₂S y HS⁻), suponiendo un equilibrio entre las concentraciones de sulfuro en el gas y el líquido.

2.1.2 Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)

El reactor LFI consistía en un tubo de vidrio con fondo cónico en el que la alimentación se realizaba por la parte superior del tubo, el diámetro interno del reactor era de 5.0 cm y 108 cm de largo, el volumen útil del reactor era de 2.4 L de volumen (Figura 2.2B). Se utilizaron bombas peristálticas para la alimentación y recirculación del efluente. Este reactor contenía 150 g de partículas finas de polietileno de baja densidad, con un diámetro medio de 0.4 mm y densidad aparente de 267 kg/m³ (Castilla *et al.*, 2000). Las partículas se acondicionaron poniéndolas en un matraz erlenmeyer de 2 litros que contenía 1 litro de agua destilada, 0.5 g de peptona de caseína y 0.5 g de extracto de levadura. Las partículas se mantuvieron en agitación por 48 horas mediante un agitador magnético a velocidad media. Una vez acondicionadas se llenó el reactor con medio mineral y 2 gDQO/L de una mezcla de acetato, propionato y butirato (1:2:2 en base a DQO). El soporte de plástico se agregó por la

parte superior del reactor para ser inoculado posteriormente. Después de la inoculación el reactor se operó en lote por un período de 1 mes, aproximadamente hasta que se notó la colonización de las partículas. El biogás se colectaba de la misma forma que en el reactor UASB. El separador sólido-líquido-gas permitía la recuperación de las partículas que eventualmente llegaban a salir del reactor, estas partículas si eran muy pequeñas se descartaban para reducir el riesgo de taponamiento en las mangueras del reactor.

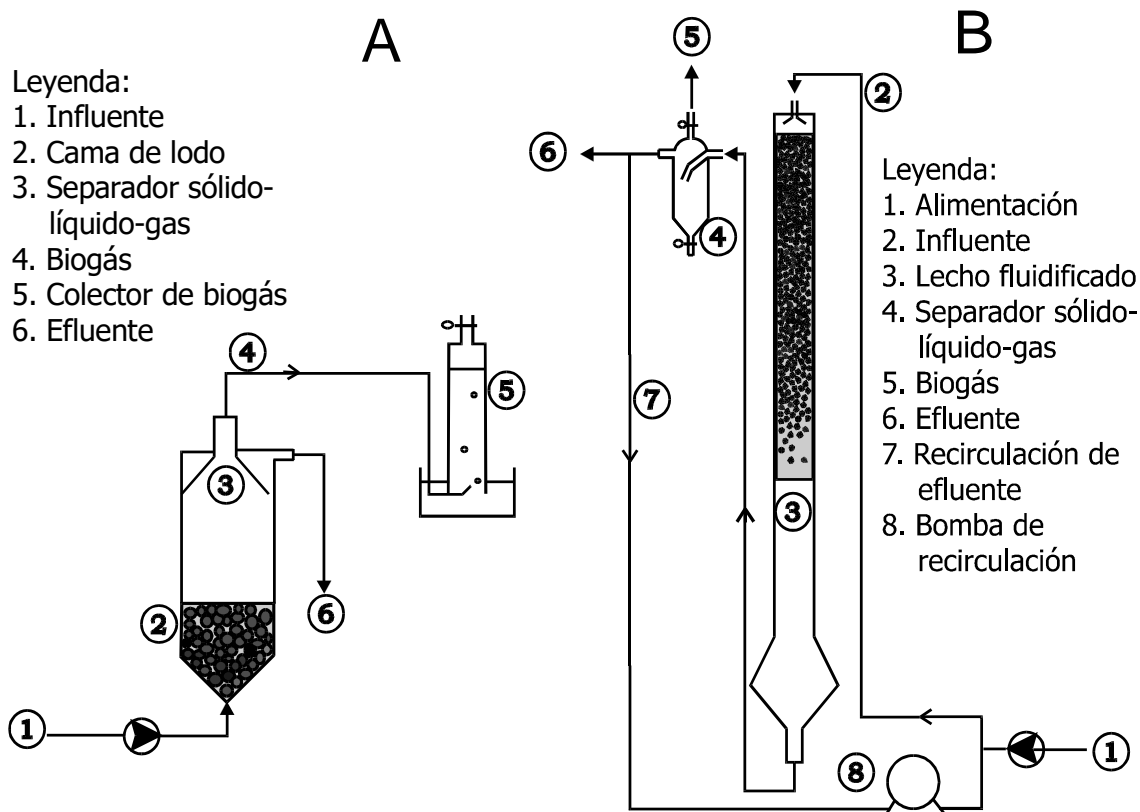


Figura 2.1 Diagrama del reactor de lecho de lodo de flujo ascendente, UASB (A) y del reactor de lecho fluidificado inverso, LFI (B).

2.1.3 Reactor aerobio

Los experimentos aerobios se llevaron a cabo en un reactor de 1.4 L de volumen de fondo cónico con una unidad de aireación separada de 0.4 L de volumen. La aireación se llevaba a cabo mediante una bomba de pecera de flujo variable con capacidad máxima de 5 L/min. Para dispersar el aire se usaba un difusor de vidrio sinterizado de poro pequeño (Pyrex). La alimentación y recirculación del efluente se realizaba con bombas peristálticas. El pH

del reactor se regulaba con un controlador de pH que adicionaba HCl para mantenerlo entre 7.5 y 8.0. Después de pasar por la unidad de aireación el líquido entraba en el reactor por la parte superior (Figura 2.2). El ajuste del flujo de aire se realizaba por medio de un rotámetro que permitía un ajuste de flujo máximo de 1 L/min.

Todos los reactores se mantuvieron dentro de un cuarto con temperatura controlada a 30°C (± 3).

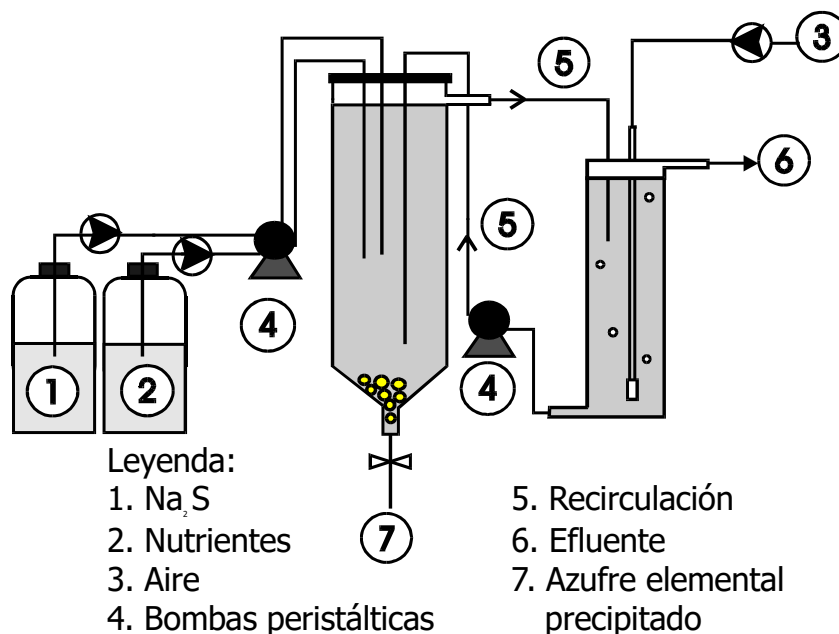


Figura 2.2 Diagrama del reactor aerobio.

2.1.4 Fuentes de biomasa

La biomasa utilizada para inocular el reactor UASB provino originalmente de un reactor UASB de 50 m³ que trata los efluentes de una planta cervecera. El lodo estuvo almacenado a 4°C por un período de 6 meses aproximadamente. El reactor LFI se inoculó con 10 mL de lodo del reactor UASB, cuando éste último ya había sido operado por un período de 100 días. El lodo se disgregó haciéndolo pasar varias veces por una jeringa bajo una corriente de nitrógeno, una vez que el lodo estaba disgregado se procedió a inocular el reactor por la parte superior.

El inóculo del reactor aerobio provino del efluente de un reactor sulfoxidante de 10 L que operaba en continuo oxidando tiosulfato. La biomasa de este reactor consistía

principalmente de microorganismos del género *Thiobacillus*. El efluente del reactor de 10 L se centrifugaba a 7000 rpm por 15 minutos en una ultra centrífuga refrigerada a 4°C. Cuando el efluente presentaba mucho azufre en suspensión, se dejaba en reposo por una noche en refrigeración. Al día siguiente el efluente se decantaba para separar el azufre elemental precipitado del sobrenadante que contenía las células. El sobrenadante se centrifugaba como se describió arriba, el pellet obtenido se recuperaba y se resuspendía en medio mineral fresco, posteriormente se cuantificaba la concentración de proteína en esta suspensión.

2.1.5 Medios de cultivo

Los reactores anaerobios se alimentaron con un medio líquido basal que contenía (mg/L): NH_4Cl (280), KH_2PO_4 (169), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (150), KCl (500), CaCl_2 (10), extracto de levadura (18), y una solución de oligoelementos (1 mL/L) conteniendo (mg/L): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2000), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (785), ZnCl_2 (150), H_3BO_3 (50), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50), AlCl_3 (50), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50), Na_2SeO_3 , (50), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (72), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50), EDTA (500) y HCl 37% (1 mL/L). En la etapa de arranque de los reactores la fuente de carbono consistió en una mezcla de acetato, propionato y butirato (1:2:2) en base a DQO. Se utilizó sulfato de sodio como fuente de sulfato, la relación DQO/ SO_4^{2-} se incrementó gradualmente hasta alcanzar una relación estequiométrica de 0.66 (ver sección 2.3); para que, en teoría, 100% del sulfato pudiera reducirse con la DQO proporcionada. El pH del medio de cultivo se ajustó a 6.5 con bicarbonato de sodio.

El medio mineral utilizado para las pruebas de actividad anaerobia tenía la siguiente composición (mg/L): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (700), K_2HPO_4 (600), NH_4Cl (280), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (110), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6), extracto de levadura (20), NaHCO_3 (2000) y una solución de oligoelementos (1 mL/L) idéntica a la mencionada anteriormente pero conteniendo resazurina (500 mg/L) como indicador redox. El pH del medio se ajustó a 7.0 con bicarbonato de sodio.

El medio de cultivo para el reactor aerobio consistió en lo siguiente (g/L): Na_2HPO_4 (1.2), KH_2PO_4 (1.8), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1), NH_4Cl (0.5), CaCl_2 (0.03), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.03),

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02), NaHCO_3 1.0, la fuente de azufre reducido fue $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. El medio se alimentaba en dos partes, en un recipiente se mezclaban todas las sales excepto el sulfuro de sodio y el bicarbonato de sodio pues estos dos se mezclaban en otro recipiente; de esta forma se evitaba la precipitación del hierro. El medio se mezclaba dentro del reactor (Figura 2.3).

2.2 Métodos

2.2.1 Actividad anaerobia específica

La actividad específica máxima se define como la velocidad de producción de metano por el lodo, expresado como DQO, bajo condiciones óptimas y con respecto al contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el lodo ($\text{gDQO-CH}_4/\text{gSSV-día}$). De igual forma, la capacidad de reducción de sulfato máxima se define utilizando la velocidad producción de H_2S o la degradación de SO_4^{2-} expresada como DQO ($\text{gDQO-H}_2\text{S}/\text{gSSV-día}$).

La actividad metanogénica específica se realizó en botellas serológicas de 60 mL conteniendo 25 mL de medio y 2 gSSV/L de lodo granular. Se agregó acetato a partir de una solución concentrada (65 gDQO/L) y neutralizada ($\text{pH}=7$) para obtener 2.5 g DQO/L en cada botella. El pH del medio se ajustó a 7.0. Las botellas fueron selladas con tapones de hule y anillos de aluminio. La atmósfera de las botellas se intercambió utilizando N_2/CO_2 (70/30 v/v) por 3 minutos; para equilibrar la fase gaseosa de las botellas a la presión atmosférica el exceso de gas se purgó en un recipiente que contenía agua (Figura 2.3 A). Las botellas se incubaron a 35°C por 72 horas. Para la prueba de actividad, después de las 72 horas se agregó de nuevo acetato para tener 1 gDQO/L en cada botella, se realizó el intercambio de atmósferas y las botellas se incubaron de nuevo en un agitador a 35°C . La producción de metano se determinó cada hora, por un período de 7 a 8 horas, utilizando la técnica de desplazamiento de una solución de NaOH al 3% (Figura 2.3 B). Al final de la prueba se determinó la concentración de acetato en el medio por cromatografía de gases.

La actividad sulfatorreductora se llevó a cabo en botellas serológicas de 120 mL de volumen que contenían 50 mL de medio mineral e inóculo a una concentración de 2 g

SSV/L, el sustrato fue ácido propiónico a 2.5 gDQO/L y se adicionó sulfato de sodio para tener una relación DQO/SO₄²⁻ de 0.66. La actividad metanogénica se inhibió utilizando ácido 2-bromoetanosulfónico (BESA) 50 mM (Razo-Flores *et al.*, 1997) .Las botellas fueron tratadas de la misma forma que en la actividad metanogénica. Después de incubarlas 72 horas se repuso el ácido propiónico a 1 gDQO/L y 1.5 gSO₄²⁻, la atmósfera se cambió como se mencionó anteriormente y las botellas se incubaron a 35°C. El seguimiento de la actividad se hizo mediante el consumo de AGV, la concentración de sulfato se determinó al inicio y al final de la prueba. El sulfuro disuelto en el líquido se determinó también al finalizar el ensayo por el método yodométrico.

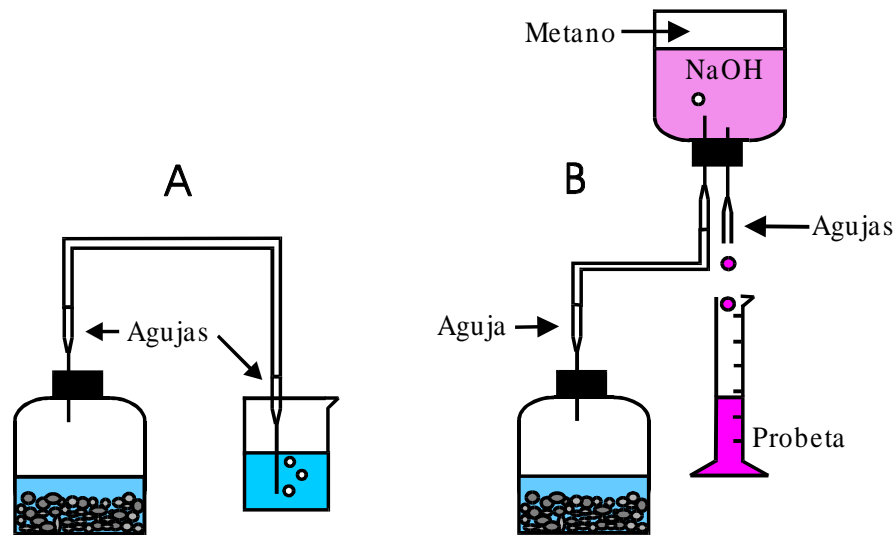


Figura 2.3 Representación esquemática del equilibrio de la fase gaseosa de las botellas con la presión atmosférica (A), cuantificación de metano para la determinación de la actividad metanogénica específica (B).

2.2.2 Análisis

La DQO se determinó mediante el micro método de reflujo cerrado utilizando 2 mL de muestra previamente centrifugada en una microcentrífuga a 14000 rpm. La muestra se oxidó en ácido sulfúrico con dicromato y sulfato de plata como catalizador a 160°C por 2 horas en tubos de vidrio cerrados. La concentración se determinó colorimétricamente a partir de la absorbancia obtenida a 620 nm con la correspondiente curva estándar. El sulfuro presente en las muestras se removió antes de la determinación de DQO burbujeando aire en el recipiente que contenía la muestra (15 mL) por 5 minutos.

El sulfato se determinó en un analizador capilar de iones (CIA-Waters) a partir de una muestra diluida con agua desionizada y filtrada a través de una membrana de nylon con poro de 0.2 µm de diámetro. Se utilizó un buffer de 4 mM de cromato de sodio y 0.5 mM del reactivo CIA Pack Anion (Waters), utilizando un capilar de sílice en modo hidrostático y a 240 nm. El tiempo de corrida era de 4 minutos y mediante este método también se cuantificaba tiosulfato. Un método alternativo para la cuantificación de sulfato, tiosulfato y sulfito fue mediante un cromatógrafo de líquidos de alta presión (Waters); equipado con un detector de arreglo de diodos (Waters PDA 996) y una columna de 250 mm x 4.5 mm IonoSpher-A de intercambio iónico empacada con sílica. La fase móvil fue ftalato de potasio 0.04 M pH =4 a un flujo de 0.8 mL/min. La detección se llevó a cabo a 308 nm de longitud de onda. La temperatura de la columna y del detector fue de 30°C y la presión de 1500 psi.

Las muestras para la determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV) acetato, propionato y butirato se centrifugaron 5 minutos a 14000 rpm. Se tomó una alícuota de 950 µL y se acidificó con 50 µL de HCl diluido 1:1 con agua desionizada. Para su análisis posterior las muestras se almacenaban a -4°C. Los AGV se determinaron por cromatografía de gases usando un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 equipado con una columna AT100 y detector de ionización de flama (FID). El flujo de nitrógeno como gas acarreador fue de 40 mL/min. Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron 80, 200 y 280 °C respectivamente.

Los sólidos suspendidos volátiles, sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos fijos en el lodo se determinaron por el método gravimétrico descrito en los métodos estandarizados para el análisis de agua y agua residual (APHA, 1995). Los sólidos

suspendidos totales se midieron después de filtrar a través de un filtro de fibra de vidrio (a peso constante) un volumen conocido de lodo y dejándolo secar en la estufa a 105°C por dos horas, el contenido de sólidos suspendidos fijos se midió después de 30 minutos a 550°C. El contenido de SSV de la muestra se calculó de la diferencia de los sólidos totales y los sólidos fijos.

Los sólidos suspendidos volátiles en el soporte del reactor LFI se determinaron de la siguiente forma: Se tomaron 5 g de soporte (drenado) y se transfirieron a una botella serológica de 60 mL conteniendo 25 mL de agua destilada, la botella se colocó dentro de un ultrasonificador por 5 minutos. Con una jeringa se extrajo el líquido de la botella y éste se filtró utilizando un filtro de fibra de vidrio de 0.1 mm de tamaño de poro. El líquido de la botella se repuso y se colocó de nuevo en el ultrasonificador por 5 minutos. La operación se repitió tantas veces fue necesario (entre 5 ó 6) hasta que en el filtro no se observaran residuos de lodo. Los SSV en los filtros se determinaron de acuerdo a lo descrito en los métodos estándar (APHA, 1995).

El azufre elemental se determinó por el método colorimétrico descrito por Bartlett y Scoog (1954) que consiste en la reacción de cianuro de sodio con azufre elemental para formar tiocianato de sodio. En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona rápida y cuantitativamente con cianuro dando tiocianato. El tiocianato se determinó por la adición de acetona con cloruro férrico a 590 nm. El método es sensible para concentraciones de 2 ppm de azufre elemental. Los peróxidos, sulfuros, bisulfuros y mercaptanos no interfieren cuando están presentes en grandes cantidades.

El sulfuro disuelto se determinó por el método yodométrico reportado por Day y Underwood (1989); que se basa en la capacidad de oxidante débil del yodo frente a un reductor fuerte como el sulfuro en medio ácido. La cuantificación se llevó a cabo por una retrotitulación del yodo remanente empleando una solución estándar 0.025 N de tiosulfato de sodio. El método llega a ser confiable para concentraciones mayores a 1 mg/L.

La biomasa aerobia se cuantificó indirectamente por el contenido de proteína, que fue determinada por el método de Lowry (1951). Para la curva patrón se utilizó albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones entre 0 y 300 mg/L.

2.3 Cálculos

2.3.1 Balance de DQO

Nomenclatura:	DQO_{in} , DQO_{ef}	= DQO en el influente y efluente	(g/L)
	SO_{4in} , SO_{4ef}	= sulfato en el influente y efluente	(g/L)
	ST_{ef}	= sulfuro total en el efluente	(g/L)
	$[H_2S]_g$, $[H_2S]_l$	= H_2S en el gas y en el líquido	(g/L)
	F_g	= producción de gas	(L/d)
	Q_l	= flujo del líquido	(L/d)
	y_{CH_4}	= fracción de metano en el gas	

La DQO se convierte en metano y sulfuro, el balance de DQO es como sigue:

$$DQO_{in} = DQO_{ef} + DQO_{convertido}$$

$$Q_l DQO_{in} = Q_l DQO_{ef} + DQO_{CH_4} + DQO_{ST}$$

$$DQO_{CH_4} = \text{DQO convertido a metano/d}$$

$$DQO_{ST} = \text{DQO convertido a sulfuro/d}$$

La DQO convertida a metano está dada por:

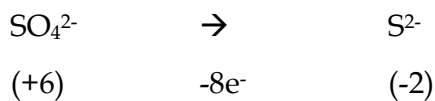
$$DQO_{CH_4} = f_{CH_4} F_g y_{CH_4} + g_{CH_4} Q_l$$

$$f_{CH_4} = \text{conversión de L } CH_4 \text{ a g DQO (2.85 g DQO/L metano) a STP}$$

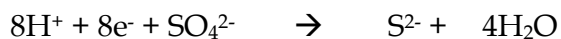
$$g_{CH_4} = \text{solubilidad del metano (g DQO/L)}$$

$$30^\circ C: g_{CH_4} = 0.074$$

La DQO que se convierte en sulfuro puede calcularse basándose en las concentraciones de sulfato consumido o del sulfuro producido. En estos cálculos la cantidad de sulfato reducido o sulfuro producido debe de convertirse en términos de DQO usados de acuerdo a la siguiente reacción:



En la reducción de sulfato a sulfuro se transportan 8 electrones:



Por lo que se pueden hacer las siguientes equivalencias:

$$\begin{aligned}
 * \quad 1 \text{ mol de sulfato} &\equiv 4 \text{ moles de oxígeno} \\
 96 \text{ g de sulfato} &\equiv 64 \text{ g de oxígeno} = 64 \text{ g de DQO} \\
 1 \text{ g sulfato} &\equiv 2/3 \text{ g DQO} = 0.66 \text{ g DQO}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 * \quad 1 \text{ mol de sulfuro} &\equiv 4 \text{ moles de oxígeno} \\
 32 \text{ g sulfuro} &\equiv 64 \text{ g de oxígeno} = 64 \text{ g de DQO} \\
 1 \text{ g sulfuro} &\equiv 2 \text{ g DQO}
 \end{aligned}$$

De este modo por cada gramo de sulfato reducido se necesitaron 0.66 g de DQO, y por cada gramo de sulfuro producido se necesitaron 2 g de DQO. La cantidad de DQO convertido a sulfuro usando la concentración de sulfato utilizado se obtiene de:

$$DQO_{ST} = 0.66Q_l(SO4_{in} - SO4_{ef})$$

La producción de sulfuro consiste en el sulfuro presente en los efluentes líquido y gaseoso. La cantidad de DQO convertida a sulfuro utilizando las concentraciones de sulfuro se obtiene de la siguiente ecuación:

Como no se conoce la composición del biogás la concentración de sulfuro en el gas debe de calcularse utilizando la ley de Henry de la siguiente forma:

$$H_2S_{gas} \Leftrightarrow H_2S_{liq} \quad \alpha = \frac{[H_2S]l}{[H_2S]g} \Rightarrow [H_2S]g = \frac{[H_2S]l}{\alpha} \quad (1)$$

$$H_2S_{liq} \Leftrightarrow HS^- + H^+ \quad K_{H_2S} = \frac{[HS^-][H^+]}{[H_2S]l} \quad (2)$$

$$ST = [H_2S]l + [HS^-] \Rightarrow [HS^-] = ST - [H_2S]l \quad (3)$$

$$\text{Combinando (2) y (3)} \Rightarrow [\text{H}_2\text{S}]_l = \left(1 + \frac{K_{\text{H}_2\text{S}}}{[\text{H}^+]}\right)^{-1} ST = (1 + K_{\text{H}_2\text{S}} 10^{\text{pH}})^{-1} ST \quad (4)$$

$$\text{Combinando (1) y (4)} \Rightarrow [\text{H}_2\text{S}]_g = \frac{f}{\alpha} ST \quad \text{siendo } f = (1 + K_{\text{H}_2\text{S}} 10^{\text{pH}})^{-1} \quad (5)$$

$$DQO_{ST} = 2 \left(Q_l ST + F_g \frac{f}{\alpha} ST \right) \quad (6)$$

en donde:

f = fracción de sulfuro disuelto no ionizado en el sulfuro total

$$K_{\text{H}_2\text{S}} = (0.382 T + 1.892) 10^{-8}$$

$$\alpha = 3.442 - 0.044 T$$

$$T = ^\circ\text{C}$$

(Hulshoff Pol, *et al.* 1995)

El balance total de DQO puede escribirse como:

Usando las concentraciones de sulfato

$$Q_l DQO_{in} = Q_l DQO_{ef} + f_{\text{CH}_4} y_{\text{CH}_4} F_g + Q_l g_{\text{CH}_4} + \frac{2}{3} (SO4_{in} + SO4_{ef}) \quad (7)$$

Utilizando las concentraciones de sulfuro : composición del gas desconocida

$$Q_l DQO_{in} = Q_l DQO_{ef} + f_{\text{CH}_4} y_{\text{CH}_4} F_g + 2(Q_l ST + F_g \frac{f}{\alpha} ST) \quad (8)$$

2.3.2 Balance de sulfato

En la reducción de 1 mol de sulfato, se produce 1 mol de sulfuro, por lo que para la reducción de 1 g de sulfato, se produce 1/3 g de sulfuro, el balance de sulfato se calcula como sigue:

$$\text{Sulfato in} = \text{Sulfato ef} + \text{Sulfato reducido}$$

$$Q_l SO4_{in} = Q_l SO4_{ef} + 3(Q_l ST) + F_g \frac{f}{\alpha} ST$$

2.3.3 Parámetros de operación

$$TRH = \frac{V_r}{Q_l} = \text{Tiempo de residencia hidraulico (días)}$$

$$Bv = \frac{Q_l DQO_{in}}{V_r} = \text{velocidad de carga orgánica (g DQO/L - día)}$$

$$BvSO4 = \frac{Q_l SO4_{in}}{V_r} = \text{velocidad de carga de sulfato (g SO}_4^{2-}/L - \text{ día)}$$

en donde:

$$V_r = \text{volumen del reactor (L)}$$

2.3.4 Fracción de DQO removida por las BM y por las BSR

En la degradación anaerobia de materia orgánica con sulfato los electrones liberados (en términos de DQO) son utilizados por las BM y las BSR. El flujo de electrones se puede calcular usando las siguientes ecuaciones:

- Fracción de DQO removida vía formación de metano

$$DQO_{CH4} = \frac{F_g f_{CH4} + g_{CH4} Q_l}{Q_l DQO_{in}}$$

- Fracción removida vía reducción de sulfato utilizando la concentración de sulfato reducido

$$DQO_{SO4} = \frac{0.66(SO4_{in} - SO4_{ef})}{DQO_{in}}$$

utilizando la concentración de sulfuro con composición de gas desconocida

$$DQO_{ST} = \frac{2 \left(Q_l S' + Q_g \frac{f}{\alpha} ST \right)}{Q_l DQO_{in}}$$

en donde:

$$DQO_{CH4} + DQO_{SO4} = 1 \text{ y } DQO_{ST} = DQO_{SO4}$$

2.3.5 Cálculo de las actividades metanogénica y sulfatorreductora

La actividad metanogénica se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar la cantidad de metano producido (acumulado) a través del tiempo y dividida entre la concentración de SSV en la botella. Utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad metanogénica específica} = \frac{mCH_4}{V_B \times SSV \times f_c}$$

La actividad sulfatorreductora se calculó con la pendiente obtenida al graficar la DQO consumida acumulativa vs. Tiempo.

$$\text{Actividad sulfatorreductora} = \frac{mSO_4}{V_B \times SSV}$$

Donde:

mCH_4 = pendiente de la producción de metano acumulativa (L/d)

f_c = conversión de CH_4 a DQO = 0.35 L CH_4 /g DQO a STP

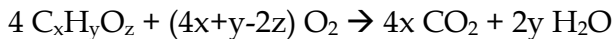
mSO_4 = pendiente de la DQO consumida acumulativa con el tiempo (g DQO/d)

V_B = volumen de líquido en la botella (L)

SSV = concentración de sólidos suspendidos volátiles (g SSV/L)

2.3.6 Cálculo del equivalente teórico de DQO

El equivalente teórico de DQO de los AGV utilizados en los experimentos y del lactato se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Tarvin y Buswell, 1934):



Las equivalencias teóricas utilizadas en los cálculos fueron las siguientes:

Ácidos acético ($C_2H_4O_2$) o láctico ($C_3H_6O_3$): 1.066 g DQO /g acético o láctico

Ácido Propiónico ($C_3H_6O_2$): 1.51 g DQO /g ac. propiónico

Ácido Butírico ($C_4H_8O_2$): 1.81 g DQO /g ac. butírico

3. Reducción de sulfato en reactores UASB y LFI

3.1 Resumen

Dos reactores anaerobios de alta tasa (UASB y lecho fluidificado inverso) se operaron bajo condiciones de reducción de sulfato. Ambos reactores presentaron eficiencias de remoción de DQO alrededor de 90%. El proceso de sulfatorreducción utilizó entre 70 y 75% de la DQO removida y la metanogénesis se llevó a cabo aún cuando los reactores se operaron a la relación estequiométrica DQO/SO₄²⁻ de 0.66 y la concentración de sulfuro fue mayor a 900 mg/L. Se observó que el uso de lactato en la alimentación propició de forma sustancial la reducción de sulfato en ambos reactores. La relación DQO/SO₄²⁻ tuvo un efecto positivo sobre la eficiencia de producción de sulfuro cuando fue menor a 1, mientras que afectó negativamente la eficiencia de producción de metano. De la misma forma que ocurrió a concentraciones de sulfuro mayores a 600 mg/L. El reactor LFI mostró ser adecuado para el proceso de sulfatorreducción, al igual que el reactor UASB.

3.2 Introducción

Las aguas residuales que contienen materia orgánica y sulfato son generadas por muchos procesos industriales que usan ácido sulfúrico (industria alimenticia y de fermentación). También el uso de compuestos menos oxidados de azufre como el sulfuro (tenerías, procesos Kraft), sulfito, ditionito (industria del papel) y tiosulfato (proceso fotográfico) generan aguas residuales ricas en compuestos azufrados. Las emisiones acuosas ricas en sulfato representan una amenaza indirecta al ambiente ya que el sulfato eventualmente se reduce a sulfuro en la naturaleza. Las restricciones legislativas actuales sobre la emisión de sulfato tienen que ver con reducir el contenido de sal en las aguas superficiales y minimizar la condensación ácida en las alcantarillas (Hao et al., 1996; Smet et al., 1998).

Sin embargo, existe una preocupación sobre la aplicación directa de un tratamiento biológico a estas aguas residuales, porque bajo condiciones anaerobias las BSR son capaces de utilizar el sulfato como aceptor final de electrones para la degradación de compuestos

orgánicos e hidrógeno (Oude Elferink et al., 1994), dando como resultado la producción de sulfuro (Figura 3.1). Por lo que el mayor problema asociado al tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato es la producción de H₂S, que puede ser un compuesto tóxico para las bacterias involucradas en la degradación. Por otro lado, el hecho de que la reducción de sulfato se lleve a cabo en los reactores anaerobios puede servir como un método biológico, junto con el paso de remoción de sulfuro para eliminar sulfato (u otros compuestos azufrados oxidados).

En principio el diseño de reactores para el tratamiento anaerobio de aguas residuales puede aplicarse en el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato, en donde la materia orgánica se remueve por reducción de sulfato y metanogénesis (Lens *et al.*, 1998a). Ejemplos de estos reactores anaerobios son el de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB), de lecho expandido de lodos (EGSB) y el filtro anaerobio (AF) entre otros (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Condiciones de operación, eficiencias de remoción de sulfato y grado de reducción de sulfato en la digestión anaerobia de aguas residuales ricas en sulfato en varios tipos de reactores (adaptada de Lens *et al.*, 2000).

Reactor	Influyente		Remoción de SO ₄ ²⁻		Referencia	
	Tipo	DQO (g/L)	SO ₄ ²⁻ (g/L)	%SO ₄ ²⁻ reducido		% DQO _{BSR}
UASB	C ₂	1.5-2.1	0.7-3.4	70	50-90	Visser <i>et al.</i> (1993b)
EGSB	C ₂ /C ₃ /C ₄	0.5-2.5	1.2-4.6	27-68	59-97	Omil <i>et al.</i> (1996)
USSB	C ₂ /C ₃ /C ₄	0.5-6.0	1.0-12.0	35	67-81	Lens <i>et al.</i> (1998b)
MUSB	C ₂	0.2-0.4	0.1-0.2	40-80	100	Arora <i>et al.</i> (1995)
AF	Ac. cítrico	25.8	3.4	93	18	Colleran <i>et al.</i> (1994)

UASB reactor de lecho de lodo de flujo ascendente; EGSB reactor de lecho de lodo expandido; USSB reactor de lecho de lodo de flujo ascendente en etapas; MUSB reactor de lecho de lodo microaerofílico; AF filtro anaerobio. %DQO_{BSR} porcentaje de DQO usado por las BSR; C₂ acetato; C₃ propionato; C₄ butirato.

En los reactores de lecho fluidificado, se alcanza una mayor retención de biomasa gracias a la mayor área específica de las partículas. Además, la fluidificación del reactor proporciona un buen mezclado de la fase líquida haciendo que estos sistemas sean más eficientes y estables para el tratamiento de aguas residuales que reactores como el UASB o el filtro anaerobio (Buffière, *et al.*, 1995). Sin embargo, en el campo comercial los reactores

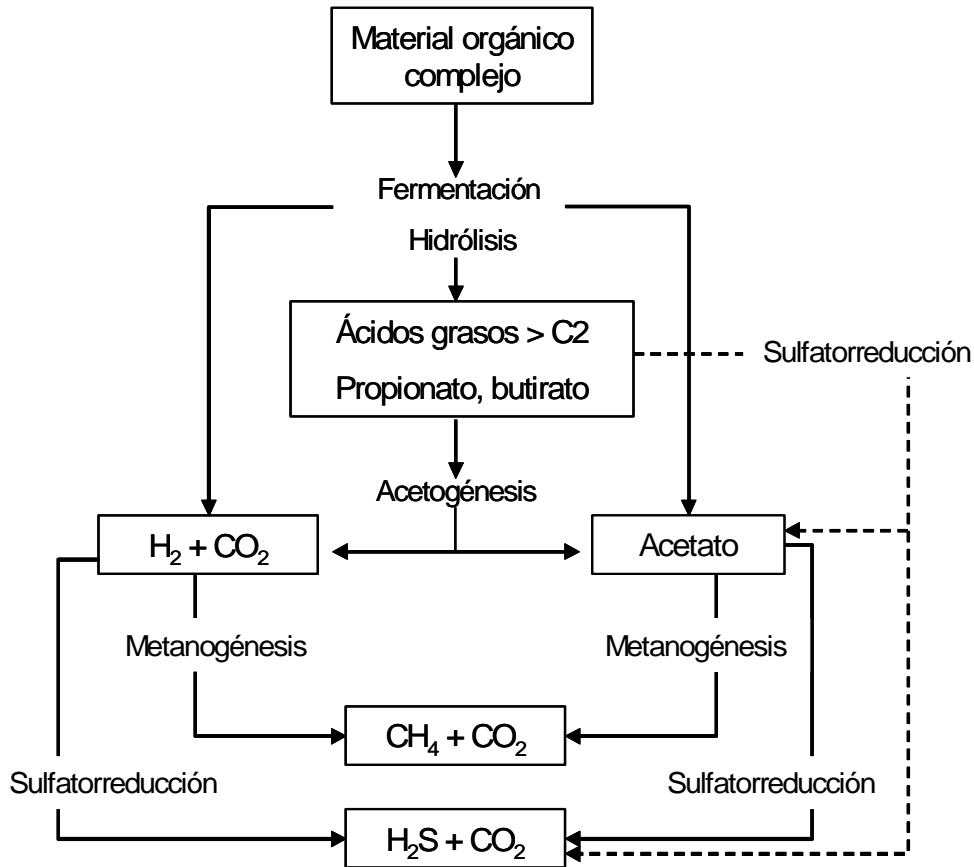
fluidificados no han sido utilizados a gran escala principalmente por los altos niveles de mantenimiento debido a su complejidad, a la necesidad de una corriente de recirculación del efluente o a los problemas hidrodinámicos (Buffière, *et al.*, 2000). En el reactor LFI las partículas que flotan se fluidifican mediante una corriente descendente, este flujo inverso permite recuperar a las partículas con un exceso de biomasa en el fondo del reactor. Como el líquido y el biogás fluyen en direcciones opuestas se favorece la retención de las partículas dentro de la columna (García-Calderón *et al.*, 1998). Hasta ahora no se ha reportado el tratamiento de efluentes ricos en sulfato utilizando un reactor LFI.

La presencia del ión sulfato en el agua residual aumenta considerablemente la complejidad de las rutas de biodegradación (Widdel, 1988). En presencia de sulfato las bacterias acetogénicas, metanogénicas y sulfatorreductoras compiten por los principales intermediarios de la mineralización de la materia orgánica compleja como son el hidrógeno, el acetato, el propionato y el butirato (Figura 3.1). La importancia de esta competencia aumenta con el decremento de la relación DQO/SO₄²⁻ en el agua residual. El resultado de esta competencia es importante porque determinará hasta donde el sulfuro y el metano, los productos finales de ambos procesos de mineralización, serán producidos. Desde los puntos de vista termodinámico y cinético, las BSR deberían predominar sobre las BM durante el crecimiento en estos substratos. Sin embargo se ha observado que la competencia entre las BSR y las BM depende de diversos factores como la relación DQO/SO₄²⁻, concentración de sulfato, composición del influente, concentración de fierro, propiedades de inmovilización de las bacterias, tipo de inóculo y el tiempo de corrida del experimento, así como de factores ambientales como pH y temperatura (Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

La competencia entre las BSR y BM ha sido revisada en detalle por: Oude-Elferink *et al.*, 1994; Colleran *et al.*, 1995; Lens *et al.*, 1998a y Hulshoff Pol *et al.*, 2001. Comparadas con las BM las BSR son más versátiles metabólicamente y los compuestos como propionato y butirato, que requieren de un consorcio sintrófico en ambientes metanogénicos pueden ser degradados directamente y más rápido por especies individuales de BSR si no hay limitación de sulfato (Hulshoff Pol *et al.*, 1998; Colleran *et al.*, 1995). En estudios de laboratorio y a gran escala en digestores anaerobios se ha confirmado que las BSR

hidrogenotróficas pueden predominar sobre las BM hidrogenotróficas (Omil *et al.* 1996, O'Flaherty *et al.* 1998b).

Figura 3.1 Competencia por sustrato entre las bacterias sulfatorreductoras, metanogénicas y acetogénicas durante la digestión anaerobia de materia orgánica (Lens *et al.*,



2000).

En el caso de las BSR acetotróficas y las BM acetotróficas se ha comprobado que efectivamente las BSR acetotróficas pueden predominar sobre las BM acetotróficas en reactores continuos de tanque agitado (Gupta *et al.* 1994). Pues las BSR acetotróficas ganan más energía del consumo de acetato que las BM y las BSR tienen tasas de crecimiento mayores que las BM acetotróficas especialmente a bajas concentraciones de acetato (Oude Elferink *et al.*, 1994). Sin embargo en los reactores de alta tasa basados en la inmovilización de biomasa (como el UASB y el LFI) esta competencia es menos predecible. Varios estudios reportan que el acetato se convierte completamente a metano, aún con exceso de sulfato (Hoeks *et al.*, 1984; Rinzema y Lettinga, 1988; Polprasert y Haas, 1995), mientras que otros

reportan un predominio de las BSR acetotróficas (Choi y Rim, 1991; Stucki *et al.*, 1993; Visser *et al.*, 1993a; Omil *et al.*, 1996, 1997a). Se ha visto que tanto la concentración de sulfato (Overmeire *et al.* 1994, Omil *et al.* 1998), concentración de acetato (Yoda *et al.*, 1987; Omil *et al.*, 1998), origen del inóculo (Omil *et al.*, 1998), propiedades de inmovilización de las bacterias (Isa, *et al.*, 1986a) y factores ambientales como el pH y la temperatura (Visser *et al.* 1996; 1993b) tienen influencia sobre la competencia entre las BSR y BM por acetato.

Aunque en las últimas dos décadas se ha llevado a cabo una investigación intensiva, no existe información suficiente para formular una guía práctica para dirigir la competencia entre las BSR y las BM, por lo que la falla durante el tratamiento metanogénico de agua residual rica en sulfato es difícil de predecir si lo que se desea es que prevalezca la metanogénesis (Lens *et al.*, 1998a).

En cambio, si el objetivo del tratamiento es la reducción de sulfato y la remoción de materia orgánica pueden aprovecharse las ventajas que las BSR tienen sobre las BM. Las BSR están omnipresentes en lodos de tratamiento anaerobio y aerobio, pueden metabolizar un amplio espectro de sustratos, no requieren un crecimiento balanceado con las bacterias acetogénicas, lo que implica menor sensibilidad a sobrecargas orgánicas. Además, las BSR son menos sensibles a compuestos tóxicos y los metales pesados son precipitados por el sulfuro reduciendo sus potenciales efectos inhibitorios (Hao, *et al.*, 1996). Las BSR pueden degradar compuestos orgánicos tóxicos como aromáticos (tolueno, etil benceno), alcanos, compuestos clorados (cloroformo) y ácidos grasos de cadena larga. Por diversos trabajos se ha visto que el agua residual que contiene materia orgánica y altas concentraciones de sulfato puede ser tratada con éxito bajo condiciones anaerobias, incluso a gran escala (Tabla 3.1).

Hasta hace poco se consideraba que un pre-requisito para un tratamiento anaerobio exitoso era tener una relación DQO/SO₄²⁻ mayor a 10. Se pensaba que las relaciones menores eran perjudiciales para la metanogénesis porque se producían concentraciones excesivas de sulfuro. Sin embargo, existen reportes de tratamientos anaerobios exitosos a relaciones DQO/SO₄²⁻ de 8 y 5 (Hilton y Archer, 1988; Méndez *et al.*, 1989). Actualmente se considera que el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato es posible aplicando medidas adecuadas que permitan la integración de la reducción de sulfato para remover al

mismo tiempo materia orgánica y sulfato. Sin embargo los reactores basados en la remoción de materia orgánica vía sulfato reducción carecen de una de las mayores ventajas del tratamiento metanogénico: la recuperación de energía a partir de los contaminantes (Hulshoff Pol *et al.*, 2001).

El objetivo de los experimentos descritos en este capítulo fue tener un reactor sulfatorreductor a partir de lodo metanogénico, usando un influente con altas concentraciones de sulfato y diferentes combinaciones de sustratos (acetato o lactato, propionato, butirato), para tener presentes a la mayor parte posible de las poblaciones sulfatorreductoras, acetogénicas y metanogénicas con el propósito de maximizar la conversión de sulfato a sulfuro. Además de comparar el desempeño de un reactor UASB y LFI en condiciones de sulfatorreducción; así como estudiar el efecto del sulfuro producido sobre el proceso.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Reactores

Para los experimentos en continuo se utilizaron los reactores UASB y LFI descritos en el capítulo 2. El reactor UASB fue inoculado con 300 mL de lodo granular obtenido de una planta piloto que trata efluentes de una cervecería con un contenido de sólidos de 27 gSSV/L y que se mantuvo en refrigeración por un período de 6 meses aproximadamente. El arranque del reactor se llevó a cabo con una mezcla de AGV que consistió en una mezcla de acetato, propionato y butirato en proporción 1:2:2 (en base a DQO). Como fuente de sulfato se utilizó sulfato de sodio y su concentración en el influente se modificó para tener la relación DQO/SO₄²⁻ deseada (Tablas 3.2 y 3.3). Dicha relación se trataba de mantener en 0.67 (gDQO/gSO₄²⁻) para que, en teoría, se pudiera alcanzar un 100% de eliminación de sulfato si toda la DQO adicionada era utilizada por las BSR. Las condiciones de operación del reactor UASB se resumen en las Tablas 3.2 y 3.3.

Tabla 3.2 Condiciones de operación para las etapas I y II del reactor UASB.

	Etapa I				Etapa II					
Período	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Fin del período (día)	78	106	162	374	448	468	536	555	597	640
Condiciones de operación										
Flujo (L/día)	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	2.1	2.0	2.0	2.1	2.1
DQO (g/L)	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0	5.0	10.0	5.0	2.5	3.0
SO₄²⁻ (g/L)	0.5	2.5	2.0	5.0	10.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
DQO/SO₄²⁻	5	1	1.25	0.5	0.5	1	2	1	0.5	0.6
Velocidades de carga										
Bv DQO (gDQO/L-día)	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0	7.4	14.5	7.4	3.76	4.3
Bv SO₄²⁻ (gSO ₄ ²⁻ /L-día)	0.5	2.5	2.0	5.0	10	7.42	7.32	7.32	7.5	7.42

Tabla 3.3 Condiciones de operación para la etapa III del reactor UASB.

	Etapa III								
Período	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
Fin del período (día)	659	687	714	751	761	809	866	941	1008
Condiciones de operación									
Flujo (L/día)	2.1	2.1	2.1	2.2	2.2	2.2	2.2	2.1	2.2
DQO (g/L)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	3.0	3.5	3.5	3.75
SO₄²⁻ (g/L)	1.0	1.0	1.5	2.0	4.0	4.5	4.5	5.3	5.5
DQO/SO₄²⁻	2.5	2.5	1.6	1.25	0.625	0.66	0.77	0.67	0.68
Velocidades de carga									
Bv DQO (gDQO/L-día)	3.75	3.75	3.75	3.9	3.9	3.9	4.7	5.2	5.8
Bv SO₄²⁻ (gSO ₄ ²⁻ /L-día)	1.5	1.5	2.25	3.14	6.3	7.0	7.0	7.9	8.6

Para fluidificar el soporte del reactor LFI se aplicaba una velocidad superficial de 6 m/h y la expansión de la cama fue aproximadamente entre 45 y 50% del volumen del reactor. En la fase de arranque el reactor se operó en lote para favorecer la adhesión de las bacterias al soporte (Meraz *et al.*, 1995). Como inóculo se utilizó lodo granular proveniente del reactor UASB descrito anteriormente, el cuál había operado por 480 días. Una vez que el soporte

de polietileno se colonizó (aproximadamente 45 días) el reactor se operó en continuo. El régimen de alimentación aplicado al reactor LFI se muestra en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Condiciones de operación para el reactor LFI.

Período	A	B	C	D	E
Fin del período (día)	52	173	211	273	369
Condiciones de operación					
Flujo (L/día)	2.48	2.48	2.9	3.47	3.48
DQO (mg/L)	2500	2500	3000	3000	3500
SO₄²⁻ (mg/L)	1500	2000	4000	4500	5200
DQO/SO₄²⁻	1.67	1.25	0.75	0.67	0.67
Velocidades de carga					
Bv DQO (gDQO/L-día)	2.5	2.5	3.5	4.19	4.9
Bv SO₄²⁻ (gSO ₄ ²⁻ /L-día)	1.5	2.0	4.67	6.3	7.3

3.3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados tanto para los reactores continuos como para los ensayos en lote para determinar la actividad específica anaerobia se describen en la sección 2.1 del capítulo 2.

3.3.3 Ensayos de la actividad específica anaerobia

La actividad metanogénica específica del lodo y del soporte se determinó utilizando por separado ácido acético, ácido propiónico y ácido láctico (Capítulo 2). En la prueba la relación DQO/SSV fue de 0.5 (1 gDQO/2 gSSV). Para la actividad sulfatorreductora se utilizó ácido propiónico (1 gDQO/L) y sulfato para tener una relación DQO/SO₄²⁻ =0.67, las BM fueron inhibidas con BESA a una concentración 50 mM. El sustrato se adicionó a las botellas a partir de soluciones stock concentradas de AGV (65 gDQO/L) previamente neutralizadas a pH 7. La producción de metano y consumo de sustrato se determinaron cada hora por un período de 7-8 horas. Las actividades se calcularon a partir del consumo de sustrato o de la producción de metano (Sección 2.3).

3.3.4 Análisis

En los efluentes de los reactores se realizaron los análisis para la determinación de DQO, sulfuro, sulfato, metano, SSV y AGV como se describió en el capítulo 2.

3.4 Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en el desempeño de los reactores UASB y LFI, posteriormente se presentan los resultados de las actividades metanogénica y sulfatorreductora obtenidas con ensayos en lote. Finalmente se lleva a cabo una comparación del desempeño de ambos reactores.

3.4.1 Reactor UASB

Los resultados del reactor UASB se dividieron en tres etapas para una mejor visualización y análisis. En la etapa I se mantuvo constante la carga de DQO y la carga de sulfato se varió, con el objetivo de disminuir la relación DQO/SO_4^{2-} de 5 a 0.5, la alimentación contenía una mezcla de acetato:propionato:butirato (1:2:2 en base DQO). En la etapa II tanto la velocidad de carga orgánica (DQO) como la velocidad de carga de sulfato fueron variables, la relación DQO/SO_4^{2-} varió entre 0.5 y 2, en esta etapa se observó una falla en el proceso y fue necesario re-inocular el reactor. La alimentación consistía en las mismas proporciones de AGV que en la etapa I. La recuperación del reactor se llevó a cabo en la etapa III en donde el acetato se sustituyó por lactato cuya proporción en la alimentación fue aumentada gradualmente hasta que 100% de ésta era ácido láctico. La velocidad de carga orgánica y la de sulfato se aumentaron gradualmente hasta tener una relación de DQO/SO_4^{2-} de 0.66. Se consideraba que el reactor había alcanzado el estado pseudo-estacionario cuando después de cada modificación en la alimentación había pasado un periodo de tiempo equivalente a 5 veces el TRH con el que se operaba el reactor. Los promedios que se presentan en las tablas están tomados en los periodos de tiempo indicados en las tablas sin tomar en cuenta los resultados correspondientes a los 5 ó 3 primeros días de haber realizado un cambio en las condiciones de operación.

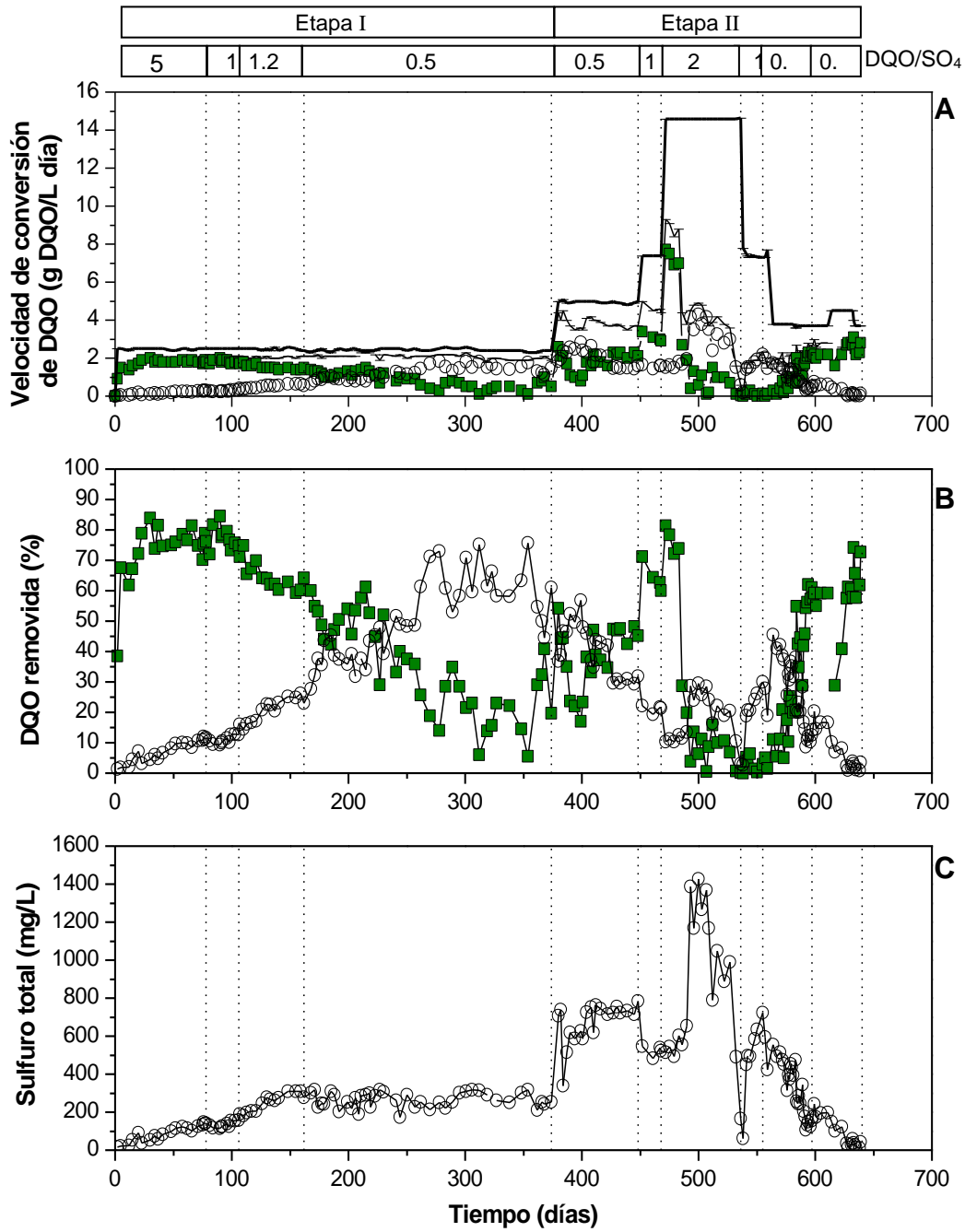
Las eficiencias de remoción de DQO y SO_4^{2-} y la concentración de sulfuro producido se resumen en las Tablas 3.5 (etapas I y II) y 3.6 (etapa III). El arranque del reactor se llevó a cabo con una carga de 2.5 gDQO/L-día y una relación DQO/ SO_4^{2-} de 5 con un TRH de 1 día. La producción de metano en la etapa I alcanzó el máximo alrededor del día 100 de operación (1.8 g DQO/L-día), por su parte la tasa de conversión a sulfuro solo era de 0.32 gDQO/L-día. La DQO removida vía metanogénesis fue de 75% y las BSR utilizaban 12% de la DQO removida cuando la relación DQO/ SO_4^{2-} fue de 5 (Figura 3.2 B). Alrededor del día 180 las BM y las BSR utilizaron 43.9 y 43.7% de la DQO removida respectivamente. Al disminuir la relación DQO/ SO_4^{2-} a 0.5 la participación de las BSR en la remoción de DQO siguió aumentando hasta llegar a utilizar entre 50 y 75% de la DQO removida entre los días 270 y 372, en este período la concentración de sulfuro total estuvo entre 185 y 350 mg/L (Figuras 3.2B y C).

Tabla 3.5 Eficiencias de remoción de DQO, sulfato y concentraciones de sulfuro total y sulfuro no ionizado para las etapas I y II del reactor UASB.

Período	Etapa I					Etapa II				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Fin del período (día)	78	106	162	374	448	468	536	555	597	640
pH final	8.15	8.13	8.26	8.25	8.41	8.6	7.95	7.69	8.21	8.08
Sulfuro total (mg/L)	87.3	133.8	250.7	533.7	942.0	523.1	862.3	510	338	95.3
Sulfuro no ionizado (mg/L)	4.6	7.4	10.5	22.8	28.2	10.2	70.5	71.0	15.7	6.0
Eficiencias de remoción										
DQO (%)	80.4	88.4	85.5	86.29	78.8	85.7	42.4	25.8	56.6	66.2
SO_4^{2-} (%)	53.6	16.5	38.5	31.9	27.7	31.8	53.7	32.5	20.8	5.9

En la Etapa II de operación del reactor se aumentaron las cargas de DQO y de sulfato (Tabla 3.1), con el fin de incrementar la participación de las BSR en la remoción de materia orgánica. Sin embargo, se observó lo contrario, una disminución en el porcentaje de utilización de DQO por parte de las BSR alrededor del día 475 (Figura 3.2A). De igual forma la remoción de DQO disminuyó al duplicar la carga orgánica volumétrica de 7.42 a 14.49 gDQO/L-día, como era de esperarse las BM reaccionaron desfavorablemente a este

Figura 3.2 Desempeño del reactor UASB operado a un TRH de 1 día. **A.** Tasa volumétrica de



conversión de sulfuro (○), metano (■), velocidad de carga orgánica impuesta (—) y la suma de las velocidades de formación de sulfuro y metano en base a la DQO (-). **B.** Porcentaje de DQO usado por las BSR (○) y por las BM (■). **C.** Concentración de sulfuro en el efluente.

aumento brusco en la carga pues pasaron de utilizar alrededor de 80% a usar menos de 20% de la DQO (días 472-510); las BSR en cambio aumentaron el uso de DQO de 11% a 30% (días 472-510) y la producción de sulfuro alcanzó los 1400 mg/L (Figura 3.2C).

Para recuperar el porcentaje de remoción de DQO se disminuyó de nuevo la carga a la mitad (7.44 gDQO/L-día). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la remoción de DQO fue disminuyendo hasta llegar a tan solo 2% en el día 538. La recuperación del reactor se llevó a cabo bajando aún más la carga orgánica hasta 3.75 gDQO/L-día y aumentando la relación DQO/SO₄²⁻ a 1.25, sin embargo el reactor tuvo que ser re-inoculado en el día 557 ya que la eficiencia de remoción de DQO fue menor a 35% en un período de 18 días. Para tal efecto se removieron 250 mL de lodo del reactor y se sustituyeron por lodo granular que contenía 47 gSSV/L proveniente de la compañía Central de Malta. La alimentación del reactor se llevó a cabo con acetato solamente. Después de la re-inoculación la actividad sulfatorreductora no pudo recuperarse en un período de 45 días, en cambio la actividad metanogénica incrementó la utilización de DQO de 1.5% a 72% del día 567 al 633 En consecuencia la producción de sulfuro se redujo de 803 a 42 mg/L en el mismo período (Figuras 3.2B y C).

En vista de que la participación de las BSR disminuyó considerablemente se decidió aplicar otra estrategia para incrementar la producción de sulfuro en el reactor (Etapa III), esta vez el reactor se alimentó con una mezcla de ácido láctico, propionato y butirato, en la que el ácido láctico se fue aumentando y el propionato y butirato se disminuyeron gradualmente hasta tener en la alimentación 100% de la DQO como ácido láctico. Los resultados de las eficiencias de eliminación de DQO y SO₄²⁻ se muestran en la Tabla 3.6 y el desempeño del reactor en la Figura 3.3. Durante esta etapa la carga orgánica volumétrica varió entre 3.75 y 5.8 gDQO/L-día y la carga de sulfato entre 1.5 y 8.6 gSO₄²⁻/L-día. Por su parte la eficiencia de remoción de DQO estuvo entre 70 y 90% y la concentración máxima de sulfuro que se alcanzó fue de 1262 mg/L (Tabla 3.6). Una semana después de iniciar la etapa III se observó que la producción de metano alcanzó 3.3 gDQO/L-día, mientras que la tasa de producción de sulfuro fue de 0.43 gDQO/L-día. La conversión de DQO vía metanogénesis era de 66% y la sulfatorreducción solo usó 11% de la DQO total removida (Figura 3.3). Evidentemente el lodo con el que fue re-inoculado el reactor era un lodo

metanogénico, puesto que la metanogénesis predominó sobre la reducción de sulfato por un período de 73 días. Durante este período el porcentaje de remoción de DQO osciló entre 48 y 91%.

Tabla 3.6 Eficiencias de eliminación de DQO, sulfato y producción de sulfuro en la etapa III del reactor UASB.

	Etapas III								
Período	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
Fin del período (día)	659	687	714	751	761	809	866	941	1008
pH final	7.9	7.5	7.7	7.9	7.8	8.1	8.0	8.0	8.1
Sulfuro total (mg/L)	78.8	205.6	302.0	475.0	548.4	627.8	952.5	1143.1	1262.2
Sulfuro no ionizado (mg/L)	7.16	41.2	41.3	43.2	61.3	37.3	70.0	84.1	75.0
Eficiencias de eliminación									
DQO (%)	71.6	73.2	90.7	91.3	92.2	91.2	86.2	90.4	90.9
SO₄²⁻ (%)	24.6	67.4	64.0	74.0	42.0	43.1	65.4	67.2	71.2

En la Tabla 3.6 se aprecia que se necesitaron 282 días para que la producción de sulfuro aumentara de 78 mg/L a 1140 mg/L. Después del día 687 la remoción de DQO se mantuvo alrededor de 90%. Entre los períodos M y P (Figura 3.3B) se observó que la tasa promedio de utilización de DQO para la reducción de sulfato fue de 1.9 gDQO/L día, mientras que la tasa promedio de conversión de DQO a metano fue de 2.0 g DQO/L día, y no se observó un claro predominio de la metanogénesis o de la reducción de sulfato. Durante estos periodos las BM y las BSR compitieron por el 50% de la DQO removida. Posteriormente la participación de las BSR en la remoción de DQO fue aumentando gradualmente hasta alcanzar un máximo de 78% en el día 946, por lo que fueron necesarios 389 días (desde la re.-inoculación día 557) para que la DQO removida por las BSR pasara de 3% a 78%. A partir del periodo Q la velocidad de conversión de DQO a sulfuro fue de 3.8 gDQO/L-día

y la de metano de 1.1 g DQO/L-día. En los periodos Q-S las BSR utilizaron 65% de la DQO removida y las BM fueron capaces de utilizar 23.8% de la misma (Figura 3.3B).

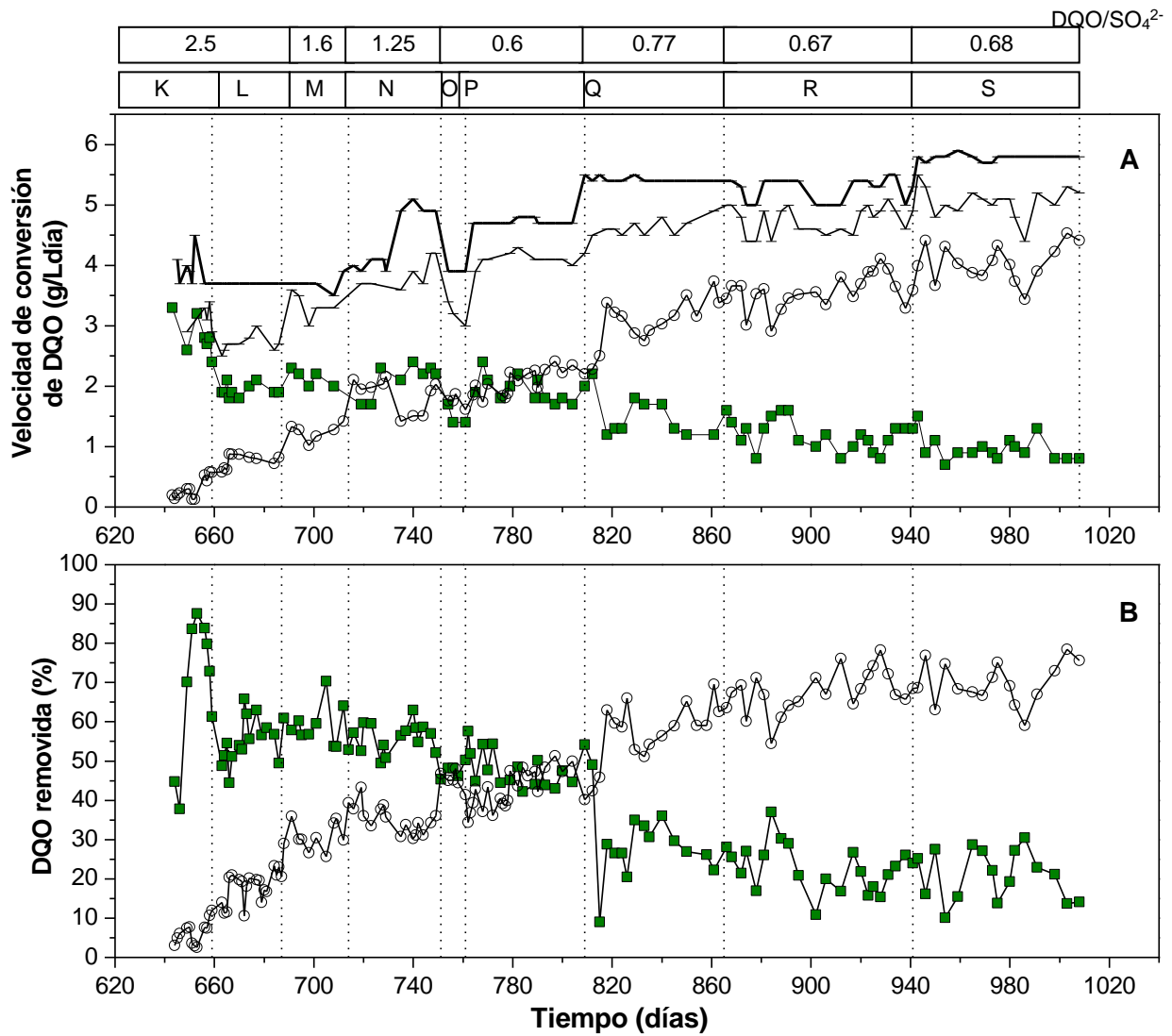


Figura 3.3 Desempeño del reactor UASB operado a un TRH de 14 horas. A. Tasa volumétrica de conversión de sulfuro (○), metano (■), carga volumétrica impuesta (—) y la suma de las tasas volumétricas de formación de sulfuro y metano en base a la DQO (-). B. Porcentajes de DQO usado por las BSR (○) y las BM (■).

3.4.2 Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)

Antes de operar el reactor LFI en continuo, se operó en lote por un período de 45 días debido principalmente a que la adhesión de la biopelícula al soporte se lleva a cabo lentamente (Meraz *et al.*, 1995). El medio de alimentación del reactor LFI fue el mismo que el que se utilizó para el reactor UASB, al inicio consistió en una mezcla de acetato, propionato, butirato (1:2:2 como DQO) y posteriormente el acetato se sustituyó por ácido láctico. La concentración de ácido láctico se fue aumentando gradualmente hasta que 85% de la alimentación estaba constituida por ácido láctico.

Los resultados obtenidos en la operación continua del reactor LFI se muestran en la Figura 3.4 y las eficiencias de remoción de DQO, sulfato y concentración de sulfuro total y no ionizado se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Eficiencias de eliminación de DQO, sulfato y producción de sulfuro en el reactor LFI.

Período	A	B	C	D	E
Fin del período (día)	52	173	211	273	369
pH final	7.9	8.27	7.76	7.7	8.0
Sulfuro total (mg/L)	105.8	390.4	992.3	1132.3	1215.2
Sulfuro no ionizado (mg/L)	9.62	16.0	120.3	155.0	89.4
Eficiencias de eliminación					
DQO (%)	66.8	80.4	91.2	92.1	93.0
SO₄²⁻ (%)	21.4	60.0	77.0	78.4	73.5

En los primeros 10 días la producción de metano alcanzó 1.8 gDQO/L-día mientras que la producción de sulfuro era muy baja tan solo de 0.4 gDQO/L-día. Se observa que en los primeros 50 días la remoción de DQO fue inferior a 80% (Tabla 3.7) y que la DQO utilizada por las BSR no superó 20% de la DQO removida (Figura 3.4).

La producción de metano se mantuvo entre 1.1 y 2.0 gDQO/L-día en los primeros 150 días de operación del reactor. Por su parte, el proceso de reducción de sulfato se incrementó poco a poco hasta llegar a 0.68 gDQO/L-día en el día 81, sin embargo no se mantuvo allí y disminuyó considerablemente hasta 0.24 gDQO/L-día en el día 114 de operación.

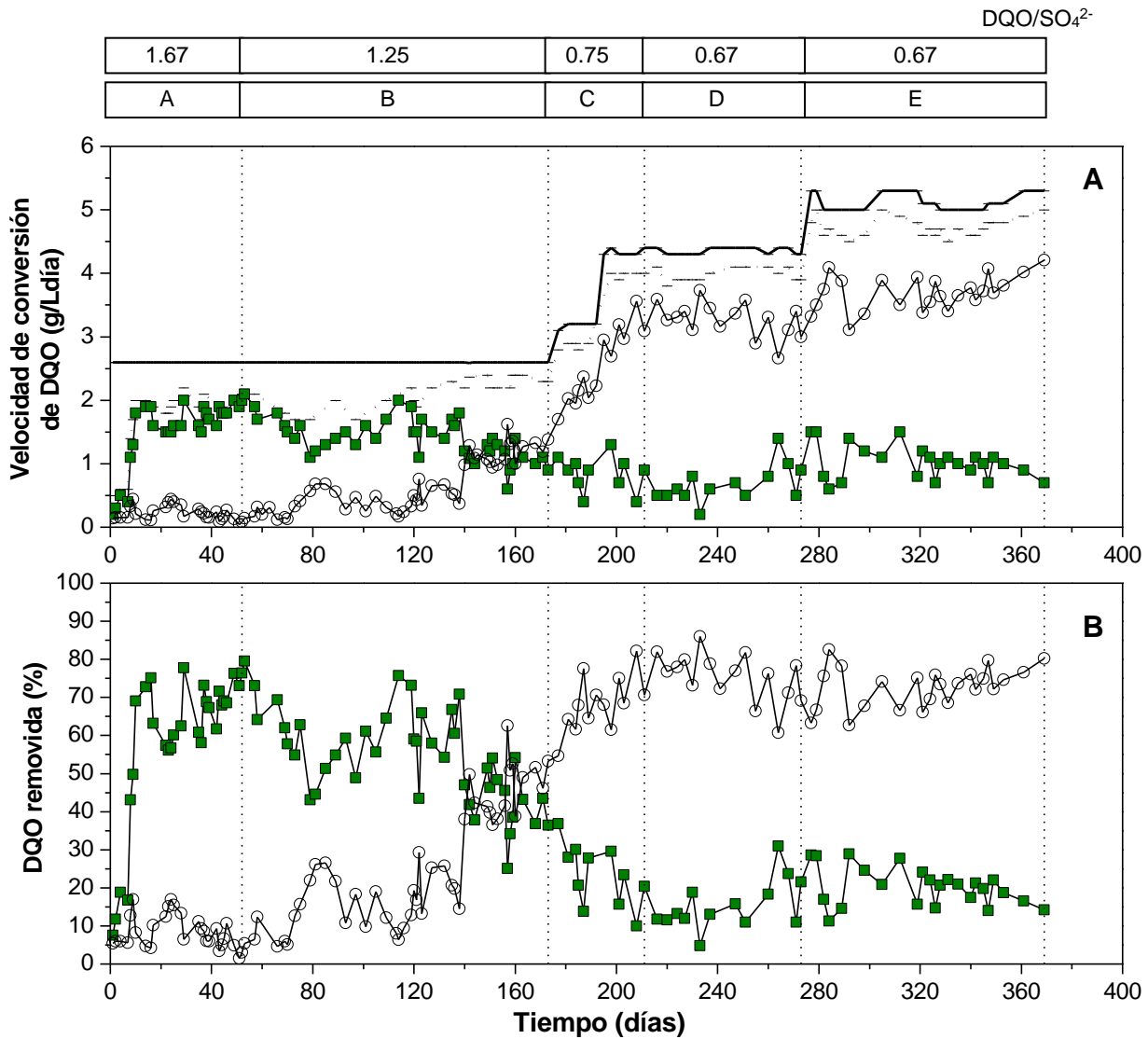


Figura 3.4 Desempeño del reactor LFI operado a un TRH de 24 horas (periodos Ay B) y de 17 horas (C-E). **A.** Velocidad de conversión de sulfuro (○), metano (■), velocidad de carga impuesta (—) y la suma de las velocidades de formación de sulfuro y metano en base a la DQO (---). **B.** Porcentaje de DQO removido por las BSR (○) y por las BM (■).

mezcla de acetato, propionato y butirato (1:2:2, en base DQO) y la relación DQO/SO₄²⁻ fue de 1.67 y 1.25 respectivamente (Figura 3.4A).

Con la finalidad de aumentar un poco más la producción de sulfuro se sustituyó el acetato por ácido láctico en la alimentación a razón de 1 gDQO/L manteniendo una carga orgánica volumétrica de 2.5 gDQO/L-día a partir del día 142. Estas condiciones se mantuvieron por 30 días (días 142-173), fue en este período cuando la producción de sulfuro aumentó manteniéndose entre 1.22 y 1.53 gDQO/L-día, con la consecuente disminución de la producción de metano. En el periodo C ya se había alcanzado la relación DQO/SO₄²⁻ de 0.66 y la carga orgánica estaba constituida en un 80% por ácido láctico.

Como se puede observar en la Figura 3.4B el período de tiempo en el que las BSR y las BM utilizaran alrededor de 50% de la DQO removida fue de 30 días aproximadamente, este intervalo fue más corto que el observado en el reactor UASB en donde las BSR y las BM utilizaron aproximadamente 50% de la DQO removida por 60 días. Para que las BSR pasaran de remover 5% a 86% de la DQO fueron necesarios solamente 233 días, a diferencia de los 380 días que se requirieron en el reactor UASB para alcanzar niveles de remoción semejantes.

El flujo de electrones se repartió más o menos equitativamente entre las BM y las BSR entre los días 142 y 173 (Figura 3.4B). La producción de sulfuro en el periodo E no fue constante pero se mantuvo entre 3.1 y 4.1 gDQO/L-día, y una mayor parte del flujo de electrones fue orientada hacia sulfuro. En los periodos D y E, solo entre 14 y 30% de la DQO consumida fue convertida a metano, mientras que la DQO restante fue usada para la reducción de sulfato, lo que dió como resultado concentraciones de sulfuro finales entre 1100 y 1360 mg/L.

3.4.3 Actividades específicas de la biomasa de los reactores UASB y LFI

Las actividades metanogénicas específicas del lodo del reactor UASB y de la biopelícula adherida al soporte del reactor LFI se evaluaron inicialmente con ácido acético, ácido propiónico y ácido láctico como substratos (Tabla 3.8). Las BM metabolizan muy pocos substratos y es bien conocido que en los reactores anaerobios, cerca de 70% del metano producido proviene del acetato. La determinación de la actividad específica acetoclástica permite tener una idea de la capacidad que tiene dicho lodo para producir metano a partir de acetato.

En general se piensa que un lodo con una alta capacidad de producción de metano debe tener una actividad metanogénica específica cercana a 1 g DQO-CH₄/g SSV-día. La actividad metanogénica observada en digestores industriales y a nivel laboratorio se ha reportado entre 0.1 y 1.1 g DQO-CH₄/g SSV-día (Dolfing y Bloemen, 1985; Guiot, 1991; Soto *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1999).

Cuando se cuantifica la actividad específica anaerobia a partir de sustratos más complejos se evalúa también la participación de las bacterias acetogénicas, acidogénicas y hasta fermentativas, dependiendo de la complejidad del sustrato.

Como se aprecia en la Tabla 3.8, la actividad metanogénica con acetato fue la más alta de los tres sustratos probados, mientras que para el propionato la actividad metanogénica fue casi nula. La actividad obtenida con la biomasa adherida fue un poco más alta que la obtenida con el lodo granular.

Tabla 3.8 Actividad metanogénica específica con diferentes fuentes de carbono para el lodo granular y la biomasa adherida al soporte, la relación DQO/SO₄²⁻ en el reactor al momento de determinar la actividad era de 0.6.

Inóculo (Reactor)	Actividad metanogénica específica (gDQO-CH ₄ /gSSV-día)		
	Acetato	Propionato	Lactato
Lodo (UASB)	0.63	0.07	0.33
Biomasa adherida (LFI)	0.72	0.05	0.4

La actividad metanogénica con acetato fue la que presentó mejor recuperación de metano, de acuerdo a la estequiometría de la reacción. En cambio para el caso del lactato la recuperación de metano fue solo de 70% con el lodo granular y de 60% con la biomasa adherida al soporte (Figura 3.5). La actividad metanogénica prácticamente nula sobre propionato apunta a la ausencia de BM hidrogenotróficas o a la ausencia de bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno, pues se ha comprobado que las bacterias que oxidan propionato solo son capaces de hacerlo si en el medio también están presentes

BM que puedan usar hidrógeno y formiato (Dong, *et al.*, 1994). La otra posibilidad es que las bacterias sintróficas de las BM hidrogenotróficas no estuvieran presentes.

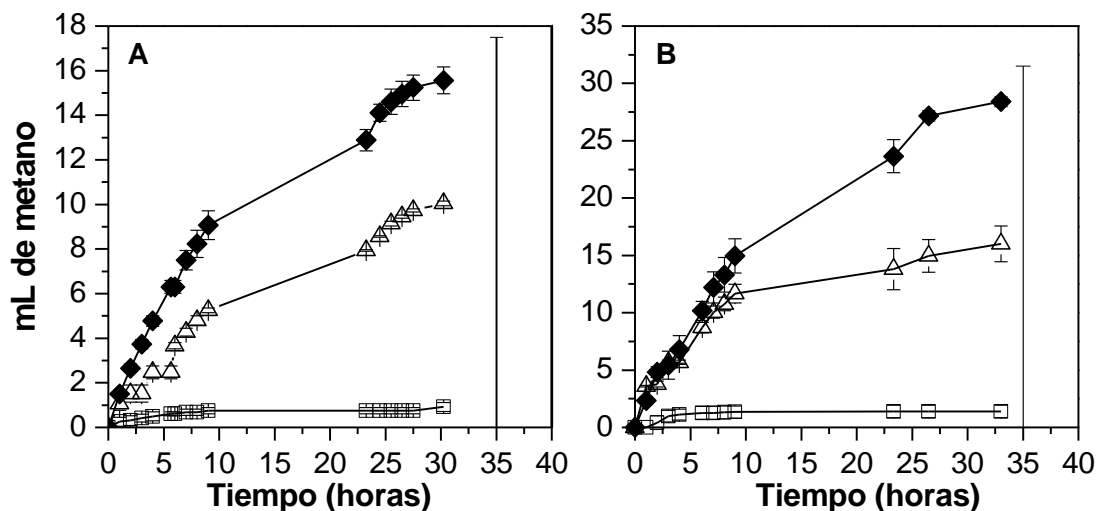


Figura 3.5 Perfiles de producción de metano para el lodo granular (A) y para la biomasa adherida (B) con diferentes substratos: acetato (◆), lactato (△) y propionato (□). Las líneas verticales representan la producción de metano estequiométrica.

La actividad sulfatorreductora del lodo se cuantificó con ácido propiónico y BESA como inhibidor de las bacterias metanogénicas. El lodo del reactor presentó actividades sulfatorreductoras más bajas que las observadas para la biomasa adherida (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Actividades sulfatorreductoras para el lodo granular y la biomasa adherida con ácido propiónico como sustrato cuantificadas a diferentes concentraciones de sulfuro total en el efluente del reactor y relación DQO/SO₄²⁻ cerca de 0.66.

	Actividad sulfatorreductora (g DQO/gSSV-día)	Reactor	DQO/SO ₄ ²⁻	Sulfuro (mg/L)
Lodo granular	0.51	UASB	0.62	556.8
	0.78	UASB	0.66	702.2
Biomasa adherida	1.18	LFI	0.67	926.4
	0.8	LFI	0.67	1182.2
	0.92	LFI	0.67	1186.7

Los valores de actividad sulfatorreductora que se reportan para sistemas reductores de sulfato varían entre 0.45 y 2.1 gDQO/gSSV-día (Visser *et al.*, 1993a,c; Omil *et al.*, 1996). Resulta interesante que la actividad sulfatorreductora del lodo granular sea menor que la de la biomasa adherida. Se esperaría tener actividades similares como en el caso de la actividad metanogénica. Estas observaciones sugieren que las BSR pudieron adherirse efectivamente al soporte de plástico más que en el lodo granular. Isa *et al.* (1986a, b) señalan que una posible explicación para que las BM predominaran sobre las BSR en un biofiltro anaerobio es una menor capacidad de inmovilización de las últimas. En contraste Alpheenar *et al.* (1993) no observaron diferencias significativas en la capacidad de inmovilización de ambos grupos metabólicos en reactores a escala laboratorio tratando una mezcla de acetato, propionato, butirato y sacarosa. Por otro lado, también se ha demostrado la capacidad de las BSR para formar una biopelícula estable hasta de 0.2 mm de espesor en un material acarreador conocido como piedra pómez.

3.4.4 Comparación del desempeño de los reactores UASB y LFI

Haciendo un análisis más detallado de los resultados, se pueden comparar por ejemplo las velocidades de conversión de sulfuro y de metano en función del porcentaje de ácido láctico en el influente de ambos reactores para dicha comparación se tomaron en cuenta los resultados de la etapa III del reactor UASB en donde la velocidad de carga se varió y se alimentó con lactato de manera similar que en el reactor LFI (Figura 3.6). Se observa que para el caso del reactor LFI la velocidad de conversión de DQO a sulfuro aumentó conforme aumentó la velocidad de carga en el reactor, en contraste la velocidad de producción de metano permaneció más o menos constante a pesar del aumento en la velocidad de carga. El mejor desempeño del reactor con ácido láctico se sostiene en la hipótesis de que este compuesto es uno de los preferidos por las BSR. Al comenzar a agregar ácido láctico el acetato se eliminó de la alimentación y se observó una disminución en la velocidad de conversión de DQO a metano en el reactor UASB mientras que la velocidad de conversión a metano en el reactor LFI fue más o menos constante; la producción de metano todavía presente se debió a la utilización del acetato derivado del metabolismo del propionato,

butirato y ácido láctico por las bacterias sulfatorreductoras y acetogénicas presentes en el consorcio.

En general se observa un aumento en las velocidades de conversión a sulfuro con el aumento de la fracción de lactato y la correspondiente disminución de las velocidades de conversión a metano. Para el reactor UASB la velocidad de conversión de DQO a sulfuro alcanzó hasta 3.2 gDQO/L-día cuando la fracción de lactato en la alimentación fue mayor que 0.8 (Figura 3.6A). Por otro lado el reactor LFI mostró tasas de conversión a sulfuro de 3.7 gDQO/L-día cuando la fracción de lactato fue de 0.85. Tomando en cuenta lo anterior puede decirse que el desempeño del reactor LFI como reactor sulfatorreductor es comparable con el desempeño del reactor UASB.

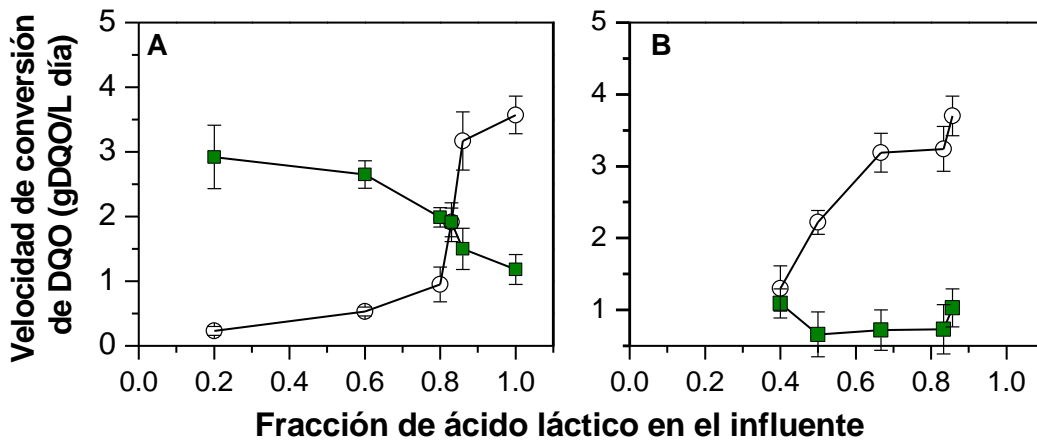
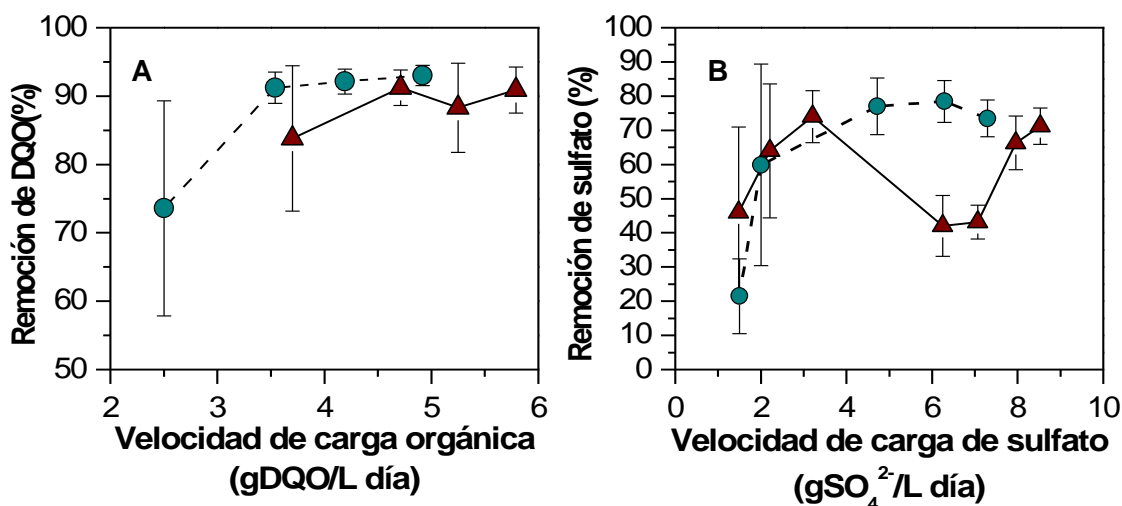


Figura 3.6 Velocidad de conversión de DQO a metano (■) y a sulfuro (○) en función de la fracción de ácido láctico en el influente en los reactores UASB (A) y LFI (B).

Los porcentajes de remoción de DQO y de sulfato en función de sus respectivas velocidades de carga para ambos reactores se comparan en la Figura 3.7. En el caso del reactor LFI la desviación estándar (± 15.7) a la carga orgánica de 2.5 gDQO/L-día es tan grande porque se incluyeron las bajas eficiencias de remoción de los primeros días de arranque. Conforme se fue aumentado la fracción de ácido láctico en la alimentación el reactor aumentó sus eficiencias de remoción y fue más estable (barras de error pequeñas). Las velocidades de carga que se muestran para el reactor UASB corresponden a la etapa III;

la eficiencia de remoción de DQO también aumentó con la carga pero no fue tan estable como en el caso del reactor LFI. En ambos reactores el aumento en la velocidad de carga orgánica tuvo un efecto positivo sobre la remoción de DQO. Similarmente cuando se aumentó la velocidad de carga de sulfato se observó un aumento en la remoción de sulfato por parte de ambos reactores. Sin embargo, en el reactor UASB duplicar la carga de sulfato de 3 a 6 tuvo un efecto negativo provocando la disminución de la remoción de sulfato en 30% aproximadamente y el reactor pudo recuperar la eficiencia de remoción de sulfato con aumentos graduales en la carga de sulfato. En términos generales, el reactor LFI no fue afectado negativamente ante los aumentos en las velocidades de carga y demostró ser más eficiente al remover DQO y sulfato que el reactor UASB. Este comportamiento puede deberse a que la velocidad superficial aplicada al reactor LFI disminuyó la limitación de transferencia de masa en la superficie de la biopelícula (Guiot *et al.*, 1992). Dando como resultado una mejor penetración del substrato en la biopelícula propiciado la proliferación de los microorganismos en la parte de la biopelícula más cercana al soporte y tal vez



permitiendo que se formara una biopelícula con más densidad de BSR.

Figura 3.7 La remoción de DQO y de sulfato con respecto a las velocidades de carga de DQO (A) y sulfato (B) en el reactor UASB (▲) y LFI (●).

Una diferencia importante entre los reactores fue el efecto que tuvo la concentración de sulfuro total (ST) producido sobre la velocidad de conversión de DQO (Figura 3.8). Parece

ser que la velocidad de conversión de DQO en el reactor LFI fue más afectada por las concentraciones de ST. Esto podría estar directamente relacionado con la menor limitación de transferencia de masa, mencionada anteriormente, promoviendo que la superficie de la biopelícula estuviera más expuesta a la presencia de sulfuro en el medio. En el caso del lodo granular la transferencia de masa está más limitada por lo que en cierto modo las bacterias en el lodo se encuentran más protegidas del posible efecto tóxico del sulfuro. Bajo las condiciones proporcionadas a cada reactor no se presentaron efectos negativos de la concentración de sulfuro sobre la remoción de DQO, se demuestra que es posible llevar a cabo un proceso anaerobio en la presencia de altas concentraciones de sulfuro sin afectar su capacidad de eliminación de DQO.

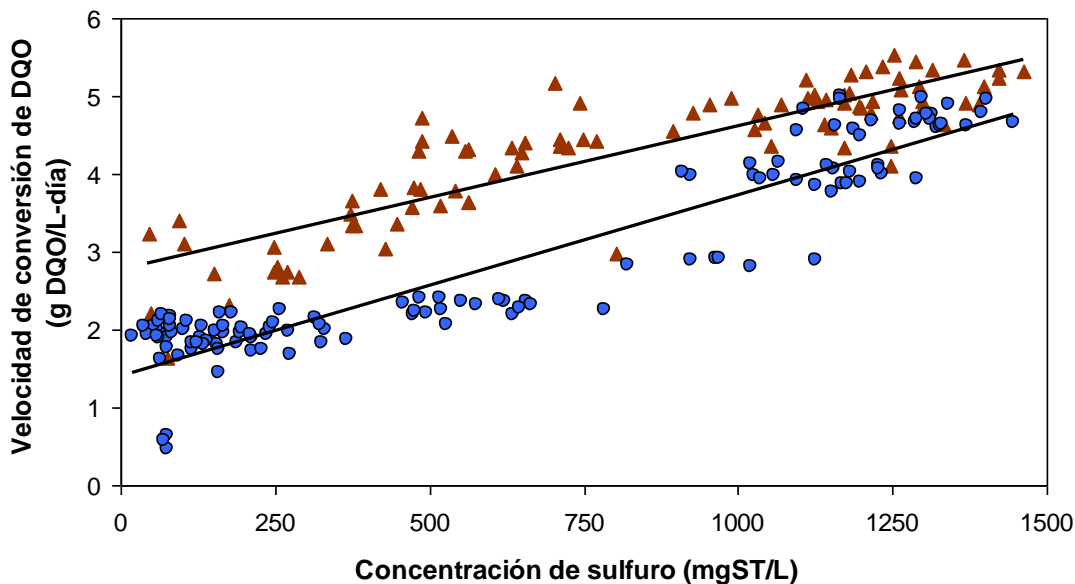


Figura 3.8 Influencia de la concentración del sulfuro total (ST) producido sobre la velocidad de conversión de DQO en el reactor UASB (▲) y LFI (●).

Al relacionar la concentración de sulfuro en el reactor con las velocidades de consumo de DQO y sulfato (como DQO) y conversión a metano, se observa que la velocidad de consumo de DQO permanece constante, la velocidad de consumo de sulfato aumenta y la velocidad de producción de metano disminuye conforme aumenta la concentración de sulfuro, al alcanzar la concentración de $0.5 \text{ g S}^{2-}/\text{L}$ las velocidades de consumo de sulfato y producción de metano fueron de 1.0 y $1.1 \text{ gDQO}/\text{L-día}$ (Figura 3.9A).

Si los resultados obtenidos en la etapa III del reactor UASB, en donde le carga fue variable, se expresan en los términos anteriores se observa que la velocidad de producción de metano disminuye de forma lineal conforme aumenta la concentración de sulfuro en el efluente, mientras que las velocidades de consumo de DQO y de sulfato aumentan, este efecto se debe al aumento en las cargas tanto de sulfato como de DQO en la alimentación (Tabla 3.3).

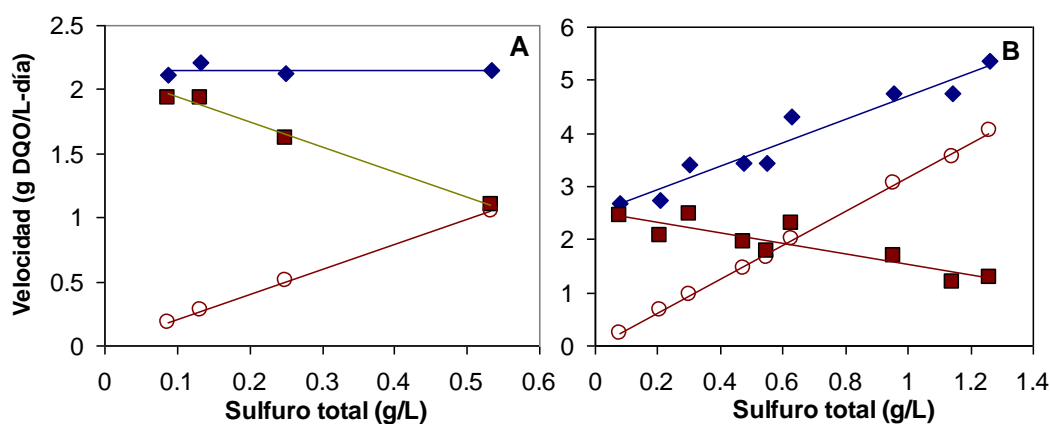


Figura 3.9 Relación entre la velocidad de consumo de DQO (◆), consumo de sulfato (○) y producción de metano(■) con respecto a la concentración de sulfuro total en el reactor en la Etapa I (A) y Etapa III (B) de operación del reactor UASB.

Cuando la concentración de sulfuro es aproximadamente 0.6 g/L las velocidades de consumo de sulfato y producción de metano son de 2.0 y 2.3 gDQO/L-día respectivamente; estas velocidades corresponden a la relación DQO/SO_4^{2-} de 0.66 (período O). A concentraciones de sulfuro mayores que 0.6 g/L se nota que la velocidad de consumo de sulfato es mayor que la de producción de metano (Figura 3.9B)

En el caso del reactor LFI las velocidades de consumo de DQO y sulfato así como la de producción de metano en función de la concentración de sulfuro mostraron que la velocidad de producción de metano disminuyó al aumentar la concentración de sulfuro en el reactor; mientras que las velocidades de consumo de DQO y sulfato aumentaron conforme la concentración de sulfuro. La velocidad de carga fue constante solo a las dos concentraciones más bajas de sulfuro, mientras que a concentraciones mayores de 0.6 mg/L la velocidad de carga impuesta se aumentó gradualmente, esto se reflejó en el aumento en las velocidades de consumo de DQO y sulfato en el reactor (Figura 3.10).

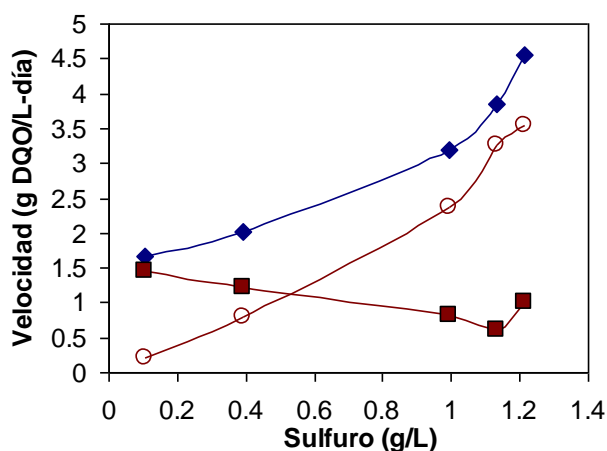


Figura 3.10 Relación entre la velocidad de consumo de DQO (◆), consumo de sulfato (○) y producción de metano(■) con respecto a la concentración de sulfuro total en el reactor LFI.

Otro factor importante en el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato es la relación DQO/SO_4^{2-} , en la Figura 3.11 se comparan las eficiencias de producción de metano y consumo de sulfato calculadas a partir de las velocidades de producción y la velocidad de carga.

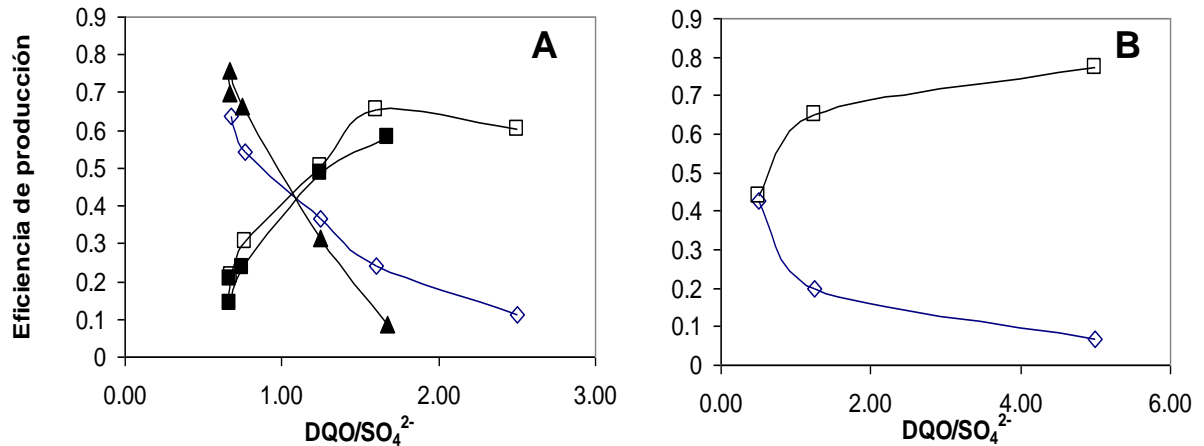


Figura 3.11 Influencia de la relación DQO/SO₄²⁻ en la eficiencia de producción de metano (▲, ◇) y consumo de sulfato (■, □) en el reactor LFI (símbolos llenos), en la etapa III del el reactor UASB (símbolos vacíos) a velocidad de carga variable (A), y las eficiencias de producción de metano (□) y producción de sulfuro (◇) en la etapa I del reactor UASB a velocidad de carga constante (B).

Se observa que para ambos reactores la eficiencia de consumo de sulfato aumentó al ir disminuyendo la relación DQO/SO₄²⁻ en la alimentación, mientras que en la eficiencia de producción de metano se notó un decremento. El mismo fenómeno ocurrió cuando la velocidad de carga fue constante (2.5 gDQO/L-día) en la etapa I del reactor UASB (Figura 3.11B). Cuando la relación DQO/SO₄²⁻ fue mayor a 1.0 la eficiencia de producción de metano estuvo entre 0.4 y 0.7 en el reactor UASB y entre 0.5 y 0.6 en el reactor LFI. A relaciones menores a 1.0 la eficiencia de consumo de sulfato en ambos reactores estuvo entre 0.6 y 0.7.

3.5 Discusión

Los resultados obtenidos en la Etapa I del reactor UASB muestran claramente que las BSR llegan a predominar sobre las BM cuando la relación DQO/SO₄²⁻ es de 0.6 (cercana a la estequiométrica) y cuando la concentración de sulfuro es mayor a 500 mg/L; por lo que es posible obtener lodo sulfatorreductor partiendo de un lodo metanogénico. La velocidad de conversión de DQO a sulfuro casi se duplicó de 0.641 a 1.0 gDQO/L-día cuando la carga

de sulfato se aumentó de 2.0 a 5.0 g SO_4^{2-} /L-día. Sin embargo los porcentajes de remoción de sulfato permanecieron por debajo del 50% aún teniendo la relación estequiométrica DQO/ SO_4^{2-} de 0.66, buena parte de la DQO fue removida vía metanogénesis. Lo anterior apunta a que las BSR no fueron capaces de competir con las bacterias acetogénicas a pesar de no estar limitadas por sulfato. Resultados previos han demostrado que en los casos en los que no hay limitación de sulfato, el propionato y butirato son degradados más rápido por las BSR que por el consorcio sintrófico de bacterias acetogénicas y metanogénicas (Colleran *et al.*, 1995). Los estudios llevados a cabo en un reactor UASB alimentado con acetato, propionato y butirato (1:1:1 en base DQO) y una relación DQO/ SO_4^{2-} de 0.5, revelaron que la eficiencia de remoción de sulfato alcanzó 18% y la DQO removida por las bacterias sulfatorreductoras fue de 21% (Visser *et al.*, 1993a). Para un reactor EGSB operando con la misma proporción de AGV se obtuvo una remoción de sulfato de 68% y la participación de las BSR en la remoción de DQO fue de 97% (Omil, *et al.*, 1996). La diferencia entre estos resultados tienen que ver en gran medida con el inóculo utilizado pues Visser utilizó lodo metanogénico mientras que Omil usó lodo sulfatorreductor. En el presente estudio el reactor UASB fue inoculado con lodo metanogénico, esto confirma que el inóculo y el tiempo de corrida del experimento influyen sobre el resultado de la competencia entre las BSR y BM. No basta operar el reactor a la relación estequiométrica DQO/ SO_4^{2-} de 0.66 para tener un proceso 100% reductor de sulfato y otros factores como el tiempo del experimento, el origen del inóculo y la estrategia aplicada para alimentar el reactor también son importantes.

Los cambios en las condiciones de operación en la Etapa II del reactor UASB no fueron los más adecuados para promover el proceso de reducción de sulfato sino todo lo contrario. Al final de la etapa la reducción de sulfato era mínima. La carga elevada de sulfato tuvo un profundo efecto en la producción de metano y sulfuro. Duplicar las cargas de DQO y sulfato condujo a la recuperación de las BM a pesar de las altas concentraciones de sulfato (10 g/L) y sulfuro (700 mg/L). Parece ser que los cambios en las velocidades de carga volumétrica no fueron una buena aproximación para dirigir la competencia entre las BSR y las BM. Además dichos cambios derivaron en el colapso del reactor y alimentar el reactor solo con acetato no mejoró la situación para las BSR. El colapso del reactor entre los días

532 y 540, cuando la DQO removida fue menor a 10% se debió más que a la toxicidad del sulfuro que llegó hasta 1400 mg/L, al aumento brusco en la velocidad de carga orgánica durante el cual las BM fueron las más afectadas, por el contrario las BSR utilizaron más DQO.

Posteriormente la baja producción de sulfuro se debió a la alimentación del reactor solo con acetato en aras de recuperar la actividad del lodo, la estrategia sin embargo no fue adecuada pues en este caso resultó que las BM fueron capaces de predominar sobre las BSR aún teniendo una relación baja de DQO/SO₄²⁻. Se ha visto que durante el tratamiento anaerobio de mezclas de AGV con exceso de sulfato la competencia por los donadores de electrones se enfoca principalmente en el acetato. De hecho una de las desventajas de llevar a cabo la reducción de sulfato para el tratamiento anaerobio es la ineficiente remoción de acetato (Hulshoff Pol *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos entre los períodos H y J de la Etapa II del reactor UASB mostraron como las BM fueron capaces de predominar sobre las BSR, aún a la relación DQO/SO₄²⁻ de 0.5. Resulta interesante que a pesar de trabajar con bajas relaciones de DQO/SO₄²⁻ la metanogénesis no haya podido suprimirse ya que una buena parte de la DQO transformada fue por la acción de las BM. La presencia de acetato en el medio permitió la recuperación de las BM pero las BSR no fueron capaces de utilizar el acetato y la actividad de éstas se perdió.

El desempeño del reactor UASB como reactor sulfatorreductor resultó satisfactorio en la Etapa III después de reducir la relación DQO/SO₄²⁻ a 0.6, sin embargo la metanogénesis siguió presente. Como fue postulado por Omil *et al.* (1997a), un incremento rápido en la competitividad de las BSR podría ser retrasado si la biomasa metanogénica se adaptó previamente a altos niveles de sulfuro o si la relación DQO/SO₄²⁻ se reduce paulatinamente, como se hizo en este experimento por lo que la mejor estrategia para tener un reactor sulfatorreductor a partir de un lodo metanogénico sería no alimentar el reactor con acetato y trabajar con relaciones de DQO/SO₄²⁻ cercanas a 0.66 desde el arranque del reactor.

Los resultados obtenidos en la operación del reactor LFI mostraron que es un reactor adecuado para la reducción de sulfato, ya que el tiempo en el que se tiene un proceso sulfatorreductor equivalente al obtenido en el reactor UASB se reduce considerablemente.

El mejor desempeño del reactor LFI se basa en la teoría de la presión selectiva, la cual propone que una comunidad bacteriana se puede seleccionar a través de una función primordial como resultado de imponer alguna condición ambiental; temperatura, TRH, velocidad ascendente (o descendente), carga orgánica, pH, configuración del reactor o tipo de inóculo entre otros (Liu y Tay, 2002). En este caso una velocidad descendente alta pudo haber causado el lavado de las bacterias dispersas y solo aquellas bacterias capaces de adherirse al plástico permanecieron en el reactor, a diferencia de que una velocidad descendente baja podría haber permitido el crecimiento de la biomasa en suspensión, y no favorecer el proceso de formación de biopelícula. Además los niveles de remoción de sulfato fueron mayores en el reactor LFI que en el UASB. Posiblemente con la presión selectiva se redujo también el número de bacterias acetogénicas que podrían competir con las BSR por el propionato y el butirato. En el reactor LFI también se observó que las BSR predominaron después de reducir la relación DQO/SO_4^{2-} a 0.75 que aunque no es la estequiométrica fue suficiente para que las BSR redujeran más de 70% de sulfato y utilizaran más de 50% de la DQO removida. El tiempo que las BSR tardaron en consumir más de 50% de la DQO fue de 30 días aún cuando la relación DQO/SO_4^{2-} no era de 0.66 y el lactato representaba 40% de la alimentación de DQO. En el reactor UASB este mismo proceso tardó 60 días aún cuando la alimentación consistía de 80% de lactato.

El mejor desempeño del reactor LFI pudo deberse también al tipo de biopelícula formada gracias a la fuerza de corte hidrodinámica aplicada mediante la alta velocidad de recirculación del efluente. Recientemente Liu y Tay (2002) revisaron el papel de la fuerza de corte hidrodinámica en la formación de biopelícula. La fuerza de corte se considera como uno de los factores decisivos en la formación de biopelículas bajo condiciones hidrodinámicas. La estructura estable de las biopelículas depende de la fuerza de corte pues promueve el equilibrio en el grosor y densidad de la biopelícula. Una fuerza de corte alta da como resultado una biopelícula delgada y densa lo que disminuye el fenómeno de desprendimiento de la biopelícula que está asociado con la inestabilidad de la calidad del efluente. Al parecer la biopelícula formada en el reactor LFI fue compacta y estable mientras que el diseño del reactor y las condiciones de operación favorecieron un mejor desempeño de las BSR como lo demuestran las actividades sulfatorreductoras más altas que las del lodo

granular. En la biopelícula también estaban presentes las BM pues las actividades metanogénicas fueron similares en ambos reactores.

Por otro lado, el uso de lactato en la alimentación de ambos reactores pudo contribuir de manera sustancial a que las BM no redujeran considerablemente su participación en el consumo de DQO ya que como se ha visto la oxidación incompleta de lactato, propionato y butirato produce acetato como intermediario. En este estudio muy probablemente, las BM presentes consumieron el acetato generado por la degradación de los sustratos más complejos y por esta razón la metanogénesis no pudo ser suprimida por completo aún teniendo una relación DQO/SO_4^{2-} de 0.66. Las BSR acetotróficas fueron incapaces de degradar el acetato producido por la oxidación del lactato, propionato y butirato. Una situación similar se observó en un reactor EGSB operado con una mezcla de acetato:propionato:butirato (1:1:1) a pH 8.0 en donde las BM contribuyeron con la remoción de DQO hasta en 40% (Omil *et al.*, 1997b). Otros autores ha reportado que las BSR acetotróficas no tenían una gran afinidad por el acetato (Maillacheruvu *et al.*, 1993). Además otros estudios coinciden en que la conversión de acetato es el factor limitante de la capacidad de remoción de AGV en los sistemas sulfatorreductores (Omil *et al.*, 1997a,b; Hulshof Pol, *et al.*, 1998; Kaksonen *et al.*, 2003). Aunque los factores termodinámicos y cinéticos predicen el predominio de las BSR por acetato.

Por otro lado la oxidación incompleta de propionato y butirato por las BSR también generan acetato como producto. McCartney y Oleszkiewicz (1993) encontraron que la ruta de degradación de lactato era dependiente de la relación DQO/SO_4^{2-} utilizada en la alimentación. Una relación de 3.7 propició la formación de propionato y acetato como productos, pero no resultó en una reducción de sulfato significativa. Una relación ≤ 1.6 dio como resultado una ruta que tenía acetato como producto y que procedió conjuntamente con la reducción de sulfato. Estos mismos autores también reportaron que la reducción de sulfato asociada con la degradación de lactato fue mucho menos sensible al sulfuro que las bacterias metanogénicas acetotróficas. Lo anterior puede explicar por que las altas concentraciones de sulfuro alcanzadas en los reactores en las últimas etapas de operación, que fueron mayores a 1000 mg/L, no hayan afectado de forma considerable el proceso de sulfatorreducción y si se haya observado una disminución en las velocidades de producción

de metano (Figuras 3.9 y 3.10). Una vez que el proceso sulfatorreductor predominó sobre la metanogénesis los niveles de sulfuro que se alcanzaron en los reactores UASB y LFI estuvieron entre 630 y 1300 mg/L, estas concentraciones son en general mayores a las que se reportan como causantes del 50% de inhibición (CI_{50}) de la actividad y aparentemente tuvieron efecto sobre el proceso metanogénico, pero no sobre la sulfatorreducción.

Con respecto a la inhibición de sulfuro se ha observado que ésta no solo depende de la concentración de las especies de sulfuro en el medio sino también de las características del lodo, la máxima concentración de sulfuro reportada por Omil *et al.* (1997a) en un reactor EGSB operando a eficiencias de remoción de DQO de 75% alimentado con acetato, propionato y butirato a un pH de 0.8 fue de 756 mg/L, mientras que los valores de IC_{50} reportados son de 590 mg/L para las BM y 1125 mg/L para las bacterias sulfatorreductoras para un lodo granular alimentado con acetato (Visser *et al.*, 1996).

De acuerdo a los resultados, las concentraciones de sulfuro alcanzadas en los reactores UASB (Etapa III) y LFI no tuvieron un efecto inhibitorio sobre la población metanogénica de ambos reactores. Esto sugiere la adaptación satisfactoria de las bacterias metanogénicas a altas concentraciones de sulfuro que probablemente fue propiciada por la disminución gradual de la relación DQO/SO_4^{2-} en la alimentación.

Como se ha visto, el resultado de las interacciones de competencia entre las BSR y otras bacterias anaerobias como las sintróficas y metanogénicas en el reactor son las que determinarán en gran medida la cantidad de sulfuro en el digestor, y hasta donde podría fallar el proceso. Un factor que debe tomarse en cuenta es el origen y la composición microbiana del inóculo y si este a sido aclimatado al sulfato o no.

En este estudio se observó como las altas concentraciones de sulfuro en los reactores no afectaron negativamente el desempeño de los mismos (Figuras 3.9 y 3.10), en donde la concentración de sulfuro fue mayor a 1g/L. Tanto las velocidades de consumo de DQO y sulfato no fueron afectadas por la alta concentración de sulfuro que finalmente también está relacionada con la relación DQO/SO_4^{2-} , a relaciones mayores a la estequiométrica la velocidad de consumo de sulfato fue menor que la de producción de metano, pero cuando la relación fue la estequiométrica la velocidad de consumo de sulfato aumentó. De esta forma se puede notar que es la combinación de una serie de factores los que determinan

que el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato sea exitoso. Puede argumentarse que existió una inhibición por parte del sulfuro producido sobre las bacterias metanogénicas y por eso se observó la disminución en las velocidades de producción conforme aumentó la concentración de sulfuro, sin embargo puede ser solamente que las BSR aumentaron su capacidad de consumo de sulfato y una mayor parte de la DQO fue removida por éstas.

La distinción entre el crecimiento y la actividad adquiere importancia cuando las condiciones ambientales se vuelven extremas y el consumo de energía cambia de crecimiento a mantenimiento. Se ha especulado que bajo condiciones con altas concentraciones de sulfuro la producción de sulfuro asociada al crecimiento disminuirá, mientras que la producción de sulfuro total permanecerá relativamente constante debido a que el decremento del crecimiento es contrarrestado por el incremento en la producción de sulfuro no asociada al crecimiento causada por el incremento de la energía de mantenimiento (Okabe *et al.*, 1995). Es posible que la alta producción de sulfuro encontrada en los reactores se deba a que las bacterias sulfatorreductoras siguieron creciendo, y no fueron afectadas drásticamente por el sulfuro. El reactor LFI pudo aplicarse con éxito en el proceso de reducción de sulfato. Este resultado como se ha visto no se debe a un solo factor como la relación estequiométrica DQO/SO_4^{2-} si no también a la combinación de una serie de factores que al final definen como será el desempeño del reactor que trata aguas residuales con alto contenido de sulfato. Sin embargo, tanto en el reactor LFI como en el UASB no se pudo alcanzar un proceso 100% de reducción de sulfato. Los resultados anteriores indican que la oxidación del ácido láctico y la subsiguiente reducción de sulfato y metanogénesis pueden jugar un papel significativo en la degradación de DQO por el lodo. El incremento rápido en la producción de sulfuro a expensas de la metanogénesis que ocurrió después de alimentar el reactor con ácido láctico y la recuperación de la producción de metano después de elevar la carga de lactato, indica que las BSR tienen una mayor afinidad por los substratos un poco más complejos que las BM.

4. Tratamiento aerobio de efluentes que contienen sulfuro

4.1 Resumen

Se estudió la formación de azufre elemental en cultivos autotróficos aerobios utilizando un reactor de recirculación para aumentar la recuperación de azufre. La relación molar de oxígeno y sulfuro se mantuvo alrededor de 0.5 para lograr limitar el oxígeno sobre el cultivo. El reactor se operó primero adicionando sulfuro de sodio a cargas de 0.7, 1.0 y 1.4 g S²⁻/L-día. La recuperación de azufre fue de 32, 72 y 74% respectivamente. El sulfato siempre estuvo presente en el efluente del reactor. Posteriormente la alimentación se cambió por el efluente de un reactor anaerobio que contenía sulfuro. Bajo este régimen las cargas evaluadas fueron aproximadamente de 0.85 y 0.95 g/L-día, a las cuales se logró tener 16 y 44% de recuperación de S⁰. La regulación de la relación molar O₂/HS⁻ en esta etapa no fue la adecuada debido a la variación de la concentración de sulfuro en el influente, reflejándose en la baja conversión de sulfuro en azufre elemental. La velocidad específica máxima de oxidación de sulfuro para el consorcio utilizado se calculó en 15.2 mg HS⁻/g proteína-min.

4.2 Introducción

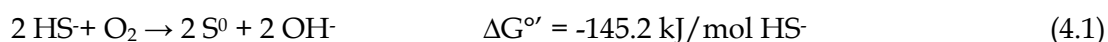
La remoción de compuestos azufrados de corrientes de desecho puede lograrse biológicamente a través de la aplicación de procesos que involucran a las bacterias del ciclo natural del azufre. La oxidación biológica ofrece el potencial de una tecnología que se regenera, es selectiva para los sulfuros, no es peligrosa, es efectiva a bajas temperaturas y económica en comparación con los procesos fisicoquímicos que muchas veces requieren de alta temperatura y presión (McComas *et al.*, 2001). Además permite la recuperación de azufre sólido disminuyendo el contenido total de azufre en la corriente de desecho.

Las bacterias incoloras del azufre del género *Thiobacillus* pueden oxidar el sulfuro a S⁰ o sulfato en presencia de oxígeno o nitrato. Los electrones del sulfuro se usan para convertir

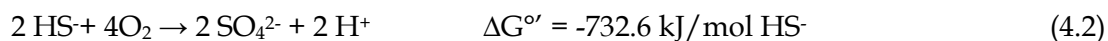
el oxígeno o nitrato en H₂O y N₂ respectivamente, mientras que el CO₂ es la fuente principal de carbono (Smet *et al.*, 1998). Se prefiere el uso de especies de este género por que casi siempre depositan el S⁰ fuera de la célula. Este tipo de bacterias ha sido estudiado ampliamente en cultivos continuos para la producción de sulfato; en contraste, casi no se han realizado estudios sistemáticos sobre la formación de S⁰ por tiobacilos (Stefess *et al.*, 1996)

Las investigaciones con sulfuro como substrato en cultivos aerobios presentan ciertos problemas prácticos. El sulfuro se oxida espontáneamente con oxígeno, especialmente en presencia de iones metálicos (Chen y Morris, 1972). Siendo un ácido débil, el sulfuro se vuelve volátil a pH ácido. A pH alcalino puede precipitar con sulfuros metálicos. También puede reaccionar químicamente con azufre elemental para formar polisulfuros. Finalmente el sulfuro puede inhibir a los tiobacilos en concentraciones entre 0.15-1.0 mM (Sublette, 1987), también se ha reportado que la tasa de crecimiento se redujo a la mitad a concentraciones entre 1.87-3.75 (Buisman *et al.*, 1990).

Las aplicaciones prácticas para la eliminación de sulfuro dependen de la oxidación incompleta de sulfuro hasta azufre elemental llevada a cabo por los tiobacilos de acuerdo con las siguientes reacciones (Kelly, 1999):



La oxidación completa del sulfuro llevará a la formación de sulfato:



Además de la conversión biológica de sulfuro a sulfato y azufre, también puede ocurrir la conversión química de sulfuro a tiosulfato (Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001):



La formación de S^0 se prefiere sobre la oxidación hasta sulfato, porque el azufre siendo insoluble en el agua puede ser recuperado, purificado y reutilizado haciendo que el proceso tenga un valor agregado. Además se requiere menor energía para su producción pues la oxidación a azufre elemental requiere 4 veces menos oxígeno que se traduce en un menor costo por aireación. Sin embargo, los microorganismos prefieren oxidar completamente el sulfuro a sulfato pues de esta forma generan más energía útil para su crecimiento.

Para poder obtener S^0 como producto, es necesario forzar la sulfuro-oxidación en dirección de la producción de azufre, por ejemplo mediante altas concentraciones de sulfuro o bajas concentraciones de O_2 . De acuerdo a la estequiometría se necesita una relación O_2/HS^- de 0.5 para lograr la producción de S^0 . A concentraciones de sulfuro menores a 20 mg/L la concentración del oxígeno se debe mantener baja (menos de 1 mg/L) para limitar la oxidación de sulfuro a sulfato (Buisman *et al.* 1990). Por otro lado se encontró que bajo condiciones limitadas de oxígeno, esto es, concentraciones de oxígeno disuelto menores a 0.1 mg/L el S^0 es el mayor producto final, mientras que el sulfato se forma bajo condiciones de limitación de sulfuro. En cuanto a la sedimentación de las partículas de azufre producidas biológicamente se observó que cuando la sedimentación de las partículas de azufre elemental se lleva a cabo por gravedad, a veces es necesario el uso de un floculante para promover la floculación de las partículas recién excretadas. Sin embargo, en reactores con un tiempo de retención de sólidos largo, las partículas de azufre producidas biológicamente forman agregados en los que los tiobacilos se inmovilizan (Janssen *et al.*, 1996)

En estudios realizado en un reactor de lecho expandido se encontró que la relación molar O_2/HS^- óptima era de 0.7 y que se podía lograr un mejor control de esta relación modificando la carga de sulfuro más que la concentración de oxígeno. En este sentido se reportó que cuando las condiciones de corte son bajas, es decir, cuando el líquido del reactor es aireado en una unidad separada de aireación, las partículas que sedimentan fácilmente (diámetro promedio 3 mm, velocidad de sedimentación >25 m/h para 90% de lodo) se forman bajo condiciones autotróficas. Así las cargas máximas de sulfuro pueden ser desde 6 g HS^-/L día (en suspensión de células libres) hasta 14 g HS^-/L -día (reactor con agregados). De esta forma se desarrolló el concepto de los bacilos inmovilizados en un material

acarreador (S^0) formado por ellos mismos, el cual puede aplicarse para reactores que operan bajo condiciones autotróficas. Sin embargo encontraron que el sistema se deteriora cuando se opera bajo condiciones heterotróficas, después de la introducción de ácidos grasos volátiles (60 mg/L) se desarrollan condiciones anaerobias en las capas profundas de la biopelícula, lo que promueve la proliferación de bacterias sulfatorreductoras que utilizan los ácidos grasos volátiles y el consumo completo del material acarreador (S^0) al competir con los oxidadores de azufre elemental (Janssen *et al.*, 1997).

Otros autores aislaron una bacteria dominante autotrófica presente en reactores biológicos productores de S^0 , designada *Thiobacillus* sp. W5 pues se trató de una nueva especie de *Thiobacillus*. En estudios realizados con este microorganismo sobre la producción de azufre elemental en reactores de tratamiento de aguas residuales, se encontró que a una carga de sulfuro dada *T. sp. W5* producía casi exclusivamente S^0 , mientras que *Thiobacillus neapolitanus* solo convertía 50% del sulfuro a azufre elemental y el otro 50% era convertido a sulfato. Sin embargo sus máximas velocidades específicas de utilización de oxígeno eran muy similares y no se observó otra diferencia bioquímica significativa entre los dos organismos. Puede decirse que los ambientes de los biorreactores son selectivos para especies como el *Thiobacillus* sp. W5 (Visser *et al.* 1997 a, b).

Por otro lado los estudios realizados en un reactor de recirculación mostraron que las relaciones de carga de oxígeno y carga de sulfuro a las cuales se produjo azufre elemental fueron entre 0.5 y 1.5. La máxima formación de azufre elemental ocurrió a una relación de 0.5 donde el 85% del azufre adicionado al reactor como sulfuro se transformó a azufre elemental, mientras que el sulfuro fue completamente oxidado a sulfato a una relación de 2 (Alcántara, 2004).

En este capítulo se describen los experimentos realizados para llevar a cabo la oxidación de sulfuro en un sistema con recirculación utilizando primero una alimentación con sulfuro y posteriormente el efluente de un reactor anaerobio reductor de azufre, bajo condiciones quimiolitotróficas.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Condiciones experimentales

Los experimentos que se llevaron a cabo en el reactor aerobio descrito en el Capítulo 2 fueron básicamente de tres tipos:

- A) Como reactor alimentado, para determinar la toxicidad del sulfuro de sodio y las tasas de oxidación a azufre elemental y eventualmente a sulfato.
- B) Como reactor continuo alimentado con sulfuro sintético, con el objeto de encontrar las relaciones sulfuro/oxígeno adecuadas para la producción de azufre elemental.
- C) Como reactor continuo que utilizaba como influente el efluente del reactor UASB que contenía sulfuro.

Cabe recordar que el reactor consistía de dos recipientes separados, uno de 1.4 L y otro más pequeño en el que se llevaba a cabo la aireación del medio. A continuación se detallan las condiciones experimentales para cada tipo de ensayo y en lo subsiguiente se hará referencia a cada tipo de experimento como si se tratara de diferentes reactores.

4.3.2 Reactor alimentado

El volumen del reactor fue de 1.4 L y el de la unidad de aireación de 0.4 L. La temperatura y pH del reactor se mantuvieron en 30°C y 8.0 respectivamente. Primero el reactor se llenó con 1.8 L de medio de cultivo y fue inoculado con 50 mL del consorcio de *Tiobacilos* recién colectado, tal como se describe en el Capítulo 2. Posteriormente el reactor se alimentó con una solución concentrada de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ para obtener cargas de sulfuro en el reactor de 0.7 g S^{2-} /L día (21.8 mmol S^{2-} /L-día) y de 1.4 g S^{2-} /L día (44.8 mmol S^{2-} /L-día). La carga de sulfuro en el reactor se modificó al aumentar o reducir la concentración de la solución concentrada de sulfuro pues los experimentos se llevaron a cabo a la misma tasa de dilución que fue de 0.5 d⁻¹. Para ambos experimentos se utilizó el mismo flujo de aire a 300 mL/min, con lo que el oxígeno disuelto en el reactor estuvo entre 4.1 y 4.5 mg O_2 /L.

4.3.3 Reactor continuo alimentado con sulfuro sintético

Los experimentos en continuo se llevaron a cabo a una tasa de dilución de 0.5 d⁻¹, el volumen total del reactor fue de 1.8 L. Como inóculo se utilizaron 100 mL del efluente de

un reactor de 10 L que oxidaba tiosulfato. El medio mineral y una solución concentrada de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ se alimentaron por separado. El flujo de la solución de nutrientes y el de la solución de sulfuro eran idénticos pues se utilizó una sola bomba peristáltica con dos cabezales y mangueras del mismo tamaño. De esta forma las dos corrientes se mezclaban dentro del reactor evitando que el sulfuro de sodio reaccionara con el cloruro férrico contenido en el medio mineral. La recirculación del líquido del reactor se hizo mediante una bomba magnética y el flujo varió entre 100 y 250 mL/min. En el recipiente de aireación la concentración de oxígeno disuelto estuvo entre 4.8 y 5.4 mg/L. La relación molar oxígeno/sulfuro se trató de mantener alrededor de 0.5 aumentando la concentración de la solución concentrada de sulfuro de sodio y ajustando el flujo de recirculación.

4.3.4 Reactor continuo alimentado con el efluente de un reactor UASB

Una vez que se logró tener la estabilidad en el reactor en continuo utilizando como fuente de azufre una solución concentrada de sulfuro, se procedió a alimentar el reactor aerobio con el efluente del reactor anaerobio directamente, es decir sin la adición adicional de medio mineral para los microorganismos aerobios.

4.3.5 Experimentos en lote

Para evaluar las tasas de oxidación de sulfuro se llevaron a cabo pruebas de microcosmos, las cuales se realizaron en un micro-respirómetro equipado con un recipiente de reacción de 2 mL de volumen, un electrodo de oxígeno disuelto modelo YSI 5300 y el software 'Biocrom' que permitía el seguimiento del consumo de oxígeno de forma inmediata. El recipiente de reacción tenía una chaqueta de agua para controlar la temperatura efectivamente, manteniéndose en 30°C. Dentro del recipiente se colocaban 1400 μL de medio previamente saturado de oxígeno, 100 μL de células (consorcio de Tiobacilos) recién colectadas y lavadas con solución salina isotónica; y la cantidad necesaria de una solución concentrada de sulfuro para obtener concentraciones finales de 0.33, 0.66, 0.83, 1.16 y 1.66 mM. Las tasas específicas de oxidación se calcularon a partir de la pendiente obtenida al graficar la concentración de oxígeno disuelto contra el tiempo y la cantidad de proteína utilizada en la determinación. Para el cálculo final se tomó en cuenta la tasa de respiración endógena a partir de un experimento sin adición de sulfuro.

4.3.6 Determinación del k_{la}

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en el reactor (k_{la}) y la velocidad de consumo de oxígeno ($Q_{O_2}X$) se determinaron utilizando un electrodo de oxígeno disuelto siguiendo la metodología propuesta por González (2002), que se basa en la determinación del $Q_{O_2}X$ y la estimación del cambio de la concentración de oxígeno en el sistema, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$k_{la} = \frac{\frac{F_R}{V_A} ([O_2]_A - [O_2]_S) + Q_{O_2}X}{([O_2]_G - [O_2]_A)} \quad (4.4)$$

donde:

$[O_2]_G$ concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con la presión parcial del oxígeno en el gas (mg/L)

$[O_2]_A$ concentración de oxígeno disuelto en el aireador (mg/L)

$[O_2]_S$ concentración de oxígeno disuelto en el reactor (mg/L)

k_{la} coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (1/h)

$Q_{O_2}X$ velocidad específica de consumo de oxígeno (mg/L h)

F_R flujo de recirculación de líquido en el aireador (L/h)

V_A volumen del aireador (L)

De esta forma la estimación del k_{la} se basa en el supuesto de que la concentración de oxígeno entre las fases gaseosa y líquida alcanza rápidamente el estado estacionario, pues los flujos de recirculación y del aire alimentado son constantes durante la determinación. Además también se considera que la actividad oxidativa del consorcio ($Q_{O_2}X$) no cambia significativamente durante el experimento.

En primer lugar se midió la concentración de oxígeno disuelto en el aireador y en el reactor. Posteriormente se determinó la velocidad de consumo de oxígeno ($Q_{O_2}X$) se determinó a partir de una alícuota de 250 mL tomada del aireador, en donde la concentración de oxígeno era la máxima en el sistema. Rápidamente se introdujo el electrodo de oxígeno disuelto y se siguió el cambio de oxígeno disuelto con respecto al tiempo mientras la muestra se agitaba. Con los datos obtenidos se calculó la pendiente

obtenida al graficar la concentración de oxígeno disuelto con respecto al tiempo, que corresponde al término $Q_{O_2}X$.

4.3.7 Análisis

En el efluente del reactor aerobio se llevaron a cabo determinaciones de proteína, azufre elemental, sulfato, tiosulfato y sulfito de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Velocidad específica de consumo de sulfuro en el consorcio sulfoxidante

Los experimentos en lote de microcosmos se llevaron a cabo para evaluar la máxima velocidad específica de oxidación del sulfuro por parte del consorcio sulfoxidante. Esta prueba se basa en la medición del consumo de oxígeno utilizando células libres. Es importante destacar que las células que se utilizan en el experimento deben de ser recién cultivadas y pueden provenir ya sea de un cultivo en lote con 12 horas de iniciado como máximo o de un reactor en continuo. Las células de un cultivo en lote con más de 24 horas o refrigeradas, no son adecuadas para este tipo de experimentos. Las velocidades específicas de oxidación para concentraciones de sulfuro entre 0.33 y 1.66 mM se presentan en la Figura 4.1. Los datos se ajustaron a una línea recta y considerando la estequiometría de la reacción de oxidación del sulfuro se calculó la velocidad específica máxima de oxidación de sulfuro en 15.24 mg HS⁻/g proteína-min y la constante de saturación (K_S) fue de 0.93 mM. En la literatura se encuentran valores que van desde 1.1 a 61.7 mg HS⁻/g proteína-min. Recientemente se reportó una velocidad específica de oxidación de sulfuro de 22.4 mg HS⁻/g proteína-min y una K_S de 0.28 mM para un consorcio sulfoxidante obtenido de un reactor en estado estacionario bajo condiciones de producción de sulfato a partir de sulfuro (Alcántara *et al.*, 2004). Por otro lado para un consorcio proveniente de un biofiltro que trataba efluentes gaseosos ricos en bisulfuro de carbono y H₂S pero adaptado a tiosulfato la tasa de oxidación específica máxima y la K_S reportadas fueron de 13.8 mg HS⁻/g proteína -min y 1.3 mM (Alcántara, 2000).

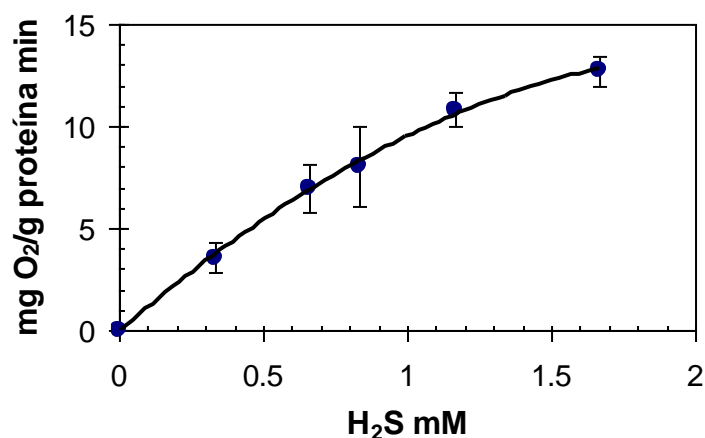


Figura 4.1 Velocidades específicas de oxidación de sulfuro presentadas por el consorcio sulfoxidante.

La máxima capacidad específica oxidativa reportada para *Thiobacillus* sp W5 capaz de degradar S^{2-} de forma estequiométrica a S^0 se reportó en $1.87 \mu\text{mol O}_2/\text{mg proteína-min}$, mientras que para *Thiobacillus neapolitanus* se estimó en $2.3 \mu\text{mol O}_2/\text{g proteína-min}$, sin embargo este último solo convertía 50% del sulfuro suministrado a S^0 , aunque *T. Neapolitanus* poseía una capacidad oxidativa mayor el azufre elemental comenzaba a producirse a una carga de $1.9 \mu\text{mol S}^{2-}/\text{L-h}$ (Visser *et al.*, 1997a)

Las diferencias entre las velocidades específicas tienen que ver con la historia del inóculo, pues aunque se trata de prácticamente el mismo consorcio en ambos reportes de Alcántara y en el presente trabajo la mayor afinidad por el sulfuro y mayor velocidad de oxidación se presentaron cuando la biomasa utilizaba sulfuro como fuente de azufre (Alcántara *et al.*, 2004). Mientras que para los consorcios adaptados a tiosulfato como en el reportado por Alcántara (2000) y el presente estudio las constantes de saturación y velocidades de oxidación fueron muy similares. En este sentido otros estudios demostraron la influencia que tienen los factores biológicos como son el tipo de organismo, las condiciones de crecimiento e historia del cultivo sobre la formación de azufre elemental. Al observar que las características de producción de azufre en células pre-cultivadas a diferentes tasa de dilución eran distintas, las células pre-cultivadas a tasa de dilución de

0.05 y 0.2 h⁻¹ comenzaron a producir azufre a cargas de sulfuro de 7.5 y 11 mmol/L-día respectivamente (Visser *et al.*, 1997b).

De acuerdo con lo anterior puede decirse que las diferencias en las velocidades de oxidación se deben a las condiciones de cultivo bajo las cuales ciertos microorganismos del consorcio pueden alcanzar su máxima capacidad oxidativa.

4.4.2 Determinación del k_{la}

El consumo específico de oxígeno del reactor se determinó a partir de una alícuota obtenida del aireador, esta estimación se realizó por triplicado. El valor de Q_{O_2X} que se encontró en promedio para los experimentos fue de 131 ± 18.9 mg O₂/L-h. Una vez teniendo este valor se puede estimar el k_{la} de acuerdo a la ecuación 4.4. El flujo de recirculación del medio al cual se determinó el k_{la} fue de 110 mL/min, los flujos de aire con los que se hicieron las determinaciones de k_{la} fueron: 0.6, 0.4, 0.2 L/min. También se determinó el k_{la} en el reactor sin la adición de aire, solo con la recirculación del líquido pues cuando el líquido de recirculación llegaba a la parte de arriba del aireador se generaba turbulencia en la superficie del líquido permitiendo cierta incorporación de aire atmosférico al líquido contenido en el aireador. Los valores de k_{la} que se obtuvieron en el reactor aerobio se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Valores de k_{la} obtenidos con diferentes flujos de aire aplicados al aireador.

Flujo de aire (L/min)	vvm (1/min)	k_{la} (1/h)
0	0	87.3
0.2	0.5	183.3
0.4	1.0	226.7
0.6	1.5	238.0

Dado que en el reactor de recirculación que se utilizó, el flujo de aire y el volumen del aireador son los parámetros que tienen mayor influencia sobre el k_{la} ya que estos modifican el área y el tiempo de contacto entre la interfase gas-líquido; se esperaba un aumento en el k_{la} conforme se aumentaba el flujo de aire en el aireador. Al tener un volumen de aire mayor se obtiene una mejor transferencia de masa en el aireador. Los valores de k_{la} encontrados al

flujo de aire de 0.6 L min corresponden muy bien con los valores reportados para un matraz agitado y con los valores típicos usados en fermentaciones aireadas, por lo que puede decirse que el sistema a un flujo de aire de 0.6 no estaba limitado por oxígeno.

4.4.3 Reactor alimentado

Los experimentos llevados a cabo bajo el régimen de reactor alimentado tuvieron como objetivo estudiar la velocidad de producción de azufre elemental a partir de sulfuro. Los resultados para cargas de 21.8 y 44.8 mmol S²⁻/L-día se muestran en la Figura 4.2.

Durante el experimento la concentración de oxígeno se mantuvo en 3.0 mg/L en el aireador y no se detectó la presencia de sulfuro residual, en el reactor la concentración de oxígeno se cuantificó en 0.2 mg/L. Se observa que desde la primera hora las bacterias fueron capaces de oxidar el sulfuro a azufre elemental y sulfato.

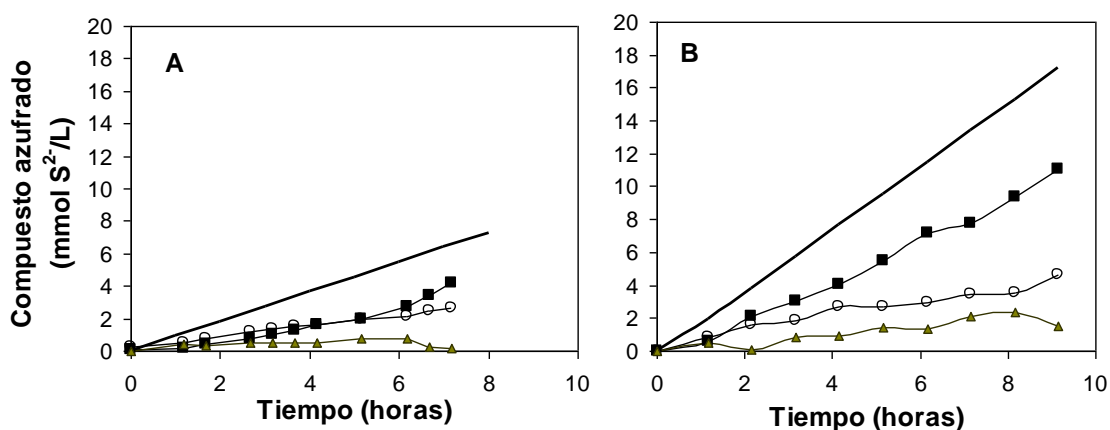


Figura 4.2 Concentración de sulfuro adicionado (—), azufre elemental (■), sulfato (○) y otras especies azufradas no cuantificadas (▲) en un reactor alimentado a cargas de 21.8 mmol S²⁻/L-día (A) y de 44.8 mmol S²⁻/L-día (B).

A lo largo de las 8 horas en las que se llevó a cabo el experimento la velocidad de producción de sulfato determinada de la Figura 4.2 fue similar para ambas cargas de sulfuro, mientras que un aumento en la carga de sulfuro favoreció considerablemente la tasa de producción de azufre elemental (Tabla 4.1 y Figura 4.2 B). Bajo las condiciones de operación aplicadas al reactor, no se encontró sulfuro residual en el efluente. Sin embargo,

al llevar a acabo el balance de azufre se notó que el azufre convertido a sulfato y azufre elemental no correspondía con el azufre alimentado pues se recuperó 85% y 88.6% para las cargas de sulfuro de 21.8 y 44.8 g S²⁻/L-día respectivamente (Tabla 4.2). Probablemente la presencia de especies como tiosulfato, sulfito, politionatos o polisulfuros que no fueron cuantificados en el experimento sean la causa del azufre faltante, estas especies representaron aproximadamente el 20% del azufre adicionado (Figura 4.2). Es poco probable que la producción biológica de tiosulfato ocurra en un sistema que oxida sulfuro (Kuenen y Robertson, 1992); sin embargo, cabe la posibilidad de que éste se haya formado por la oxidación química del sulfuro o partir de la interacción entre los intermediarios producidos por la oxidación biológica del sulfuro, como puede ser el sulfito que al reaccionar con sulfuro puede producir tiosulfato. Pero, según Janssen *et al.* (1995) la producción de tiosulfato por oxidación química ocurre a relaciones molares de O₂/S²⁻ cercanas a 0.5 y la formación de azufre elemental a relaciones entre 0.5 y 1.0 esta acompañada por la formación de tiosulfato. En el presente experimento las relaciones molares de O₂/S²⁻ fueron de 0.5 y 1.0 para el experimento con carga de 44.8 y 22.8 mmol S²⁻ L-día, respectivamente. En este sentido, Chen y Morris (1972) también encontraron que el tiosulfato es el principal producto de la oxidación química del sulfuro bajo condiciones ligeramente alcalinas.

Tabla 4.2 Tasas de producción de azufre y sulfato, y porcentaje de azufre utilizado para dos cargas de sulfuro en el reactor alimentado.

Carga de sulfuro (mmol S-S ²⁻ /L-día)	Tasas de producción		Azufre convertido (%)
	Azufre elemental (mmol S-S ⁰ /L-día)	Sulfato (mmol S-SO ₄ ²⁻ /Ldía)	
21.8	10.5	8.1	85.32
44.8	29.2	10.5	88.6

De los experimentos anteriores se observó que al aumentar la carga de sulfuro se logró un aumento en la producción de azufre elemental, y aunque las tasas de producción de

sulfato son similares el porcentaje de sulfuro utilizado para la formación de sulfato disminuyó de 37% para la carga de 21.8 mmol S²⁻/L-día a 23% para la carga de 44.8 mmol S²⁻/L día.

4.4.4 Reactor continuo alimentado con sulfuro sintético

Uno de los objetivos de operar el reactor en continuo fue el de evaluar el desempeño del consorcio microbiano sobre la degradación de sulfuro, ya que el consorcio de donde se obtuvo el inóculo había estado por casi tres años degradando tiosulfato. Una de las razones por las que casi no se utiliza sulfuro para los experimentos es su toxicidad hacia los microorganismos que se ha reportado entre 0.15 y 375 mM. Sin embargo, se han usado fermentadores, biofiltros, reactores air-lift y de lecho expandido para la eliminación de sulfuro utilizando consorcios o cepas puras como ha sido reportado por Buisman *et al.* (1990), Sublette, (1987a), Stefess, *et al.* (1996), Degorce-Dumas *et al.* (1997), Visser *et al.* (1997b), Janssen *et al.* (1997) entre otros.

El diseño particular del reactor utilizado por Janssen *et al.* (1997) en el que la aireación del líquido y la oxidación del sulfuro se llevaban a cabo en recipientes espacialmente separados, permitía la recuperación máxima del azufre producido gracias a la disminución de turbulencia dentro del reactor debidas a la aireación. De la misma forma en este tipo de reactor también se favorece la sedimentación del azufre elemental al estimular la formación de partículas de azufre con buenas propiedades de sedimentación. El reactor utilizado para llevar a cabo los experimentos se basa en este principio y se ha descrito en detalle en el Capítulo 2. Basándose en los trabajos desarrollados con este mismo tipo de reactor y consorcios similares (Velasco, 2001; González, 2002) se optó por la tasa de dilución de 0.5 d⁻¹ como punto de partida para los experimentos en continuo pues a una tasa de dilución de 1.0 d⁻¹ se observaron condiciones de lavado en el sistema (González, 2002). Asimismo se eligió una relación molar teórica de O₂/S²⁻ de 0.5, pues como se observó en los experimentos con el reactor alimentado a esta relación se tenía una mejor producción de azufre elemental. Los resultados de la operación en continuo del reactor se muestran en la Figura 4.3 en donde se puede observar el efecto de la variación de la tasa volumétrica de sulfuro sobre las tasas de producción de sulfato, azufre y tiosulfato

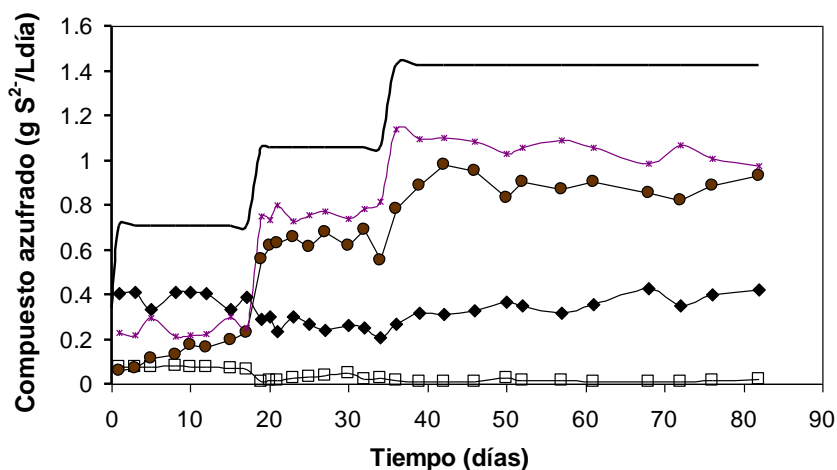


Figura 4.3 Formación de sulfato (◆), tiosulfato (□), azufre elemental calculado (⌘) y experimental (●) al incrementar la carga de sulfuro (—)

En vista de que no se detectó sulfuro residual y considerando que el azufre no está distribuido uniformemente en el reactor, la producción de azufre elemental se calculó restando las cantidades producidas de SO₄²⁻ y S₂O₃²⁻ a partir del sulfuro. Lo anterior se puede justificar ya que en estudios previos se ha visto que no hay producción de tetrionato o politionatos; además en la gráfica se muestra que hay una subestimación del azufre elemental cuando se utilizan las concentraciones determinadas experimentalmente. En el inicio la carga volumétrica de sulfuro se mantuvo en 0.7 g S²/L-día para prevenir la inhibición de la biomasa debida a las altas concentraciones de sulfuro en el reactor. Se observó que el sistema produjo principalmente sulfato a una tasa de 0.4 g S-SO₄²⁻/L-día, también se encontró tiosulfato y azufre. El azufre convertido a tiosulfato representó alrededor del 10% del azufre alimentado. Al determinar el oxígeno disuelto dentro del reactor se encontró que la concentración estaba alrededor de 0.2 mg O₂/L, esta concentración corresponde a un estado miroaerofílico, el cual permitió la acumulación de azufre elemental en el reactor. En experimentos realizados por van den Ende *et al.* (1997) con un cultivo puro de *Thiobacillus thioparus* 18% del azufre alimentado se convirtió en tiosulfato con una relación molar O₂/HS⁻ de 0.4. Por otro lado, Stefess *et al.* (1996) propusieron que a bajas concentraciones de alimentación de sulfuro la oxidación de éste

puede ser biológica y no biológica; puesto que bajas concentraciones de sulfuro rinden menos biomasa, la contribución relativa de la oxidación química sobre la oxidación total puede ser alta.

Basándose en lo anterior, es muy probable que el tiosulfato encontrado en el reactor sea resultado de la oxidación química de sulfuro debida a la baja concentración de sulfuro y un exceso de oxígeno. Sin embargo al tener un exceso de oxígeno y una concentración baja de azufre elemental este pudo haber reaccionado para dar SO_3^{2-} de acuerdo con la siguiente reacción (Kelly, 1999):



Al incrementar la carga de sulfuro a 1 g S^0 /L-día se observó un aumento en la tasa de producción de azufre elemental hasta 0.7 g S^0 /L-día, mientras que la producción de sulfato disminuyó aproximadamente a la mitad. El tiosulfato por su parte siguió presente en el efluente pero en menor proporción (1-2% del azufre alimentado).

La máxima producción de azufre elemental se observó a una carga de sulfuro de 1.4 g/L-día, en donde 73% del azufre alimentado se recuperó como azufre elemental. Se observó que al aumentar la carga la producción de sulfato fue más o menos la misma permaneciendo alrededor de 24% como en la etapa anterior; todavía se alcanzó a detectar tiosulfato pero en menor proporción (menos de 1% del azufre alimentado). El balance de azufre esta resumido en la Tabla 4.3, en donde los datos que se presentan corresponden solo al azufre contenido en cada compuesto.

Tabla 4.3 Balance de azufre para las diferentes cargas de sulfuro en el reactor en continuo a una tasa de dilución de 0.5 d^{-1}

O_2/S^2	S-S ² -in (g/L-día)	S-SO ₄ ²⁻ ef (g/L-día)	S-S ⁰ cal (g/L-día)	S-S ₂ O ₃ ²⁻ ef (g/L-día)	S ⁰ -recuperado (%)
0.58	0.7	0.39	0.24	0.08	34.5
0.60	1.0	0.26	0.77	0.027	72.4
0.67	1.4	0.35	1.06	0.01	74.3

in: influente ef: efluente cal: calculado

Annachhatre y Suktrakoolvait (2001) llevaron a cabo experimentos en un reactor de lecho fluidizado en el que la aireación se realizaba en un recipiente separado de la unidad principal. Encontraron que, a cargas de sulfuro menores a 1.2 g S²⁻/L-día el sulfato era el principal producto de la oxidación cuando había exceso de oxígeno en el reactor (>0.1 mg/L). Al operar el reactor a concentraciones de oxígeno disuelto menores a 0.1 mg/L obtuvieron que a cargas de sulfuro entre 0.8 y 1.6 g S²⁻/L-día se producía entre 1.6 y 3.5 veces más azufre elemental que sulfato. Por otro lado las velocidades de producción de azufre elemental en un reactor de 10 L en el que la aireación se llevaba a cabo separadamente y operando a una carga de sulfuro de 1 g S²⁻/L-día fue de 0.75 g S⁰/L-día, con una recuperación de azufre de 75%; cuando la carga se aumentó a 2 g S²⁻/L-día la formación de azufre fue de 1.5 g S⁰/L-día y también se recuperó 75% del azufre alimentado como S⁰, mientras que en ambos casos la velocidad de producción de sulfato fue similar (Alcántara *et al.*, 2004). Como también se observó en el presente estudio, una parte del azufre alimentado se convierte a sulfato, aunque existan condiciones microaerófilas que son las que deben favorecer la producción de azufre. Por lo que la máxima acumulación de azufre depende de muchos factores y no solo de la concentración de oxígeno o la relación molar O₂/S²⁻.

Algunos trabajos reportados en la literatura que involucran la remoción biológica de sulfuro, coinciden en que los microorganismos no utilizan la fuente de azufre reducido en forma estequiométrica. En la Tabla 4.4 se presentan los resultados de algunos de estos trabajos y se comparan con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Se observa que en la mayoría de los casos las relaciones molares de O₂/HS⁻ son mayores a la estequiométrica, que es de 0.5 para la producción de azufre elemental a partir de sulfuro. Llama particularmente la atención que para el caso en el que se utilizó tiosulfato como substrato, la relación molar fue menor a la estequiométrica que también es de 0.5; según la ecuación 4.6 (González, 2002).



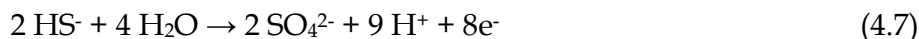
Tabla 4.4 Relación molar O_2/HS^- , sustrato proporcionado al cultivo y porcentaje de azufre elemental recuperado para diferentes tipos de cultivo.

Tipo de cultivo	O_2/HS^-	Sustrato	S^0 recuperado	Referencia
Puro (<i>Thiobacillus thioparus</i>)	0.59	Sulfuro	82%	van den Ende <i>et al.</i> (1993)
Consorcio (<i>Thiobacillus</i>)	0.6-1.0	Sulfuro	$73 \pm 10\%$	Janssen <i>et al.</i> (1995)
Puro (<i>Thiobacillus neapolitanus</i>)	1.60	Sulfuro	42%	Stefess <i>et al.</i> (1996)
Puro (<i>Thiobacillus</i> sp. W5)	0.56	Sulfuro	96%	Visser <i>et al.</i> (1997)
Puro (<i>Thiobacillus neapolitanus</i>)	1.15	Sulfuro	50%	Visser <i>et al.</i> (1997)
Consorcio (<i>Thiobacillus</i>)	0.4	Tiosulfato	63.7%	Velasco (2001)
Consorcio (<i>Thiobacillus</i>)	0.5	Sulfuro	75%	Alcántara <i>et al.</i> (2004)
Consorcio (<i>Thiobacillus</i>)	0.67	Sulfuro	74.2%	Este trabajo

Además si se toma en cuenta que en el aireador normalmente se tiene un exceso de oxígeno, pues es una característica del sistema; entonces es posible que no todo el sulfuro en la alimentación se convierta a azufre elemental. En experimentos llevados a cabo sobre el consumo oxígeno en el aireador revelaron que en este tipo de reactor en particular, se favorece el consumo de oxígeno dentro del aireador a concentraciones de oxígeno disuelto mayores a 1 mg/L, además en dicho trabajo la mayor parte del tiosulfato alimentado se oxidó totalmente a sulfato lo que dio como resultado la disminución del rendimiento de azufre elemental (González, 2002).

La formación de azufre elemental esta directamente relacionada con la capacidad máxima de transporte de electrones, que se ve reflejada en la máxima capacidad oxidativa del cultivo. La capacidad máxima oxidativa podría definirse como la velocidad máxima de desaparición de sulfuro cuando los microorganismos no se encuentran limitados por oxígeno o por sulfuro. Los estudios llevados a cabo por Visser *et al.* (1997a) demostraron que la reducción de los citocromos en la cadena de transporte de electrones no es de 100%, aún cuando el

microorganismo alcanza su máxima capacidad oxidativa. Esto quiere decir que la capacidad oxidativa del cultivo es la que limita la tasa de oxidación de sulfuro, por lo que se tiene producción de S⁰ y no todo el sulfuro se convierte en sulfato. Lo anterior esta relacionado con la generación de electrones en las reacciones de oxidación. Para oxidar una molécula de sulfuro a sulfato se necesitan transportar 8 electrones, para oxidar una molécula de sulfuro a azufre elemental solo se necesitan transportar 2 electrones.



De esta forma, cuando la carga de sulfuro es baja la velocidad de transferencia de electrones por los microorganismos puede ajustarse a la velocidad de generación de electrones de la formación de sulfato. Cuando la carga de sulfuro aumenta, la capacidad de transferencia de electrones de los microorganismos es sobrepasada por la generación de electrones de la formación de sulfato. De esta forma, los microorganismos optan por la formación de azufre elemental, que da como resultado la generación de solo 25% de los electrones y la capacidad de transferencia de los microorganismos ya no es rebasada (Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001)

La capacidad oxidativa máxima del consorcio calculada a partir de los experimentos de microcosmos fue de 3 mmol O₂/L-h que fue 4 veces menor que la reportada para *T. sp* W5 que es de 13.5 mmol/L-h; como se ha visto dicho microorganismo puede degradar de forma estequiométrica sulfuro en azufre elemental. Por otro lado, la capacidad oxidativa encontrada en el reactor fue de 4.9 mmol O₂/L-h, dicho resultado corresponde con el valor encontrado en las pruebas de microcosmos.

4.4.5 Reactor continuo alimentado con el efluente de un reactor UASB

El reactor en continuo se comenzó a alimentar con el efluente del reactor anaerobio una vez que en el efluente del reactor anaerobio se alcanzaron concentraciones alrededor de 1 g/L de sulfuro. El cambio en la alimentación se realizó directamente; es decir, no se adicionó medio aerobio al reactor. Debido a que la concentración de sulfuro en el efluente del reactor anaerobio no podía manipularse, se cambió la tasa de dilución del reactor aerobio a 0.76 d

¹ para obtener una carga de sulfuro cercana a 1 g S²⁻/L-día. La relación molar O₂/HS⁻ se calculó utilizando el promedio de las tres últimas determinaciones de sulfuro en el efluente del reactor UASB, y ajustando el flujo de aire y de recirculación del líquido en 200 y 130 mL/min respectivamente. La concentración de oxígeno en el aireador fue cercana a 4.5 mg/L, de tal forma que la relación molar O₂/HS²⁻ inicial en el reactor fue de 0.57, esta relación varió a lo largo del experimento pues la carga de sulfuro del reactor aerobio variaba según cambiaba la concentración de sulfuro en el efluente del reactor anaerobio UASB. La transición entre el reactor continuo y el reactor secuencial presentó ciertas dificultades, en el sentido de que no se podía controlar la carga de sulfuro en la alimentación y no se podían tener condiciones estables de operación. Los resultados que se presentan son de aquellos experimentos en los que se logró operar el reactor en continuo por más tiempo.

El efluente del reactor anaerobio además de sulfuro contenía sulfato residual y algo de tiosulfato, los resultados que se presentan a continuación muestran la producción de sulfato, azufre elemental y tiosulfato considerando las concentraciones iniciales en el influente. La variación que presentó el sulfuro en el efluente del reactor UASB provocó una variación en la relación molar O₂/HS⁻.

Como se muestra en la Figura 4.4A durante el experimento se produjo mayormente sulfato a razón de 0.38 g S-SO₄²⁻/L-día, mientras que la producción de azufre elemental fue de 0.14 g S⁰/L-día. De esta forma, aproximadamente 45% del azufre alimentado se convirtió en sulfato y solo 16% se convirtió en S⁰, el tiosulfato encontrado representó 5% del azufre alimentado. Durante este ensayo no se observó la acumulación de S⁰ en el fondo del reactor, debido a la limitada conversión de sulfuro a azufre elemental y en consecuencia muchas de las partículas de azufre quedaban en suspensión y salían en el efluente. Un problema en el suministro de oxígeno al reactor provocó la acumulación de sulfuro observándose la formación de polisulfuros, cuya presencia fue detectada cualitativamente por el color verde del reactor (Buisman *et al.*, 1990), que antes del incidente tenía color blanco opaco. La concentración de proteína presentó poca variación durante los primeros 7 días de operación (Figura 4.4B) y al final del experimento había disminuido en 27% de la concentración inicial.

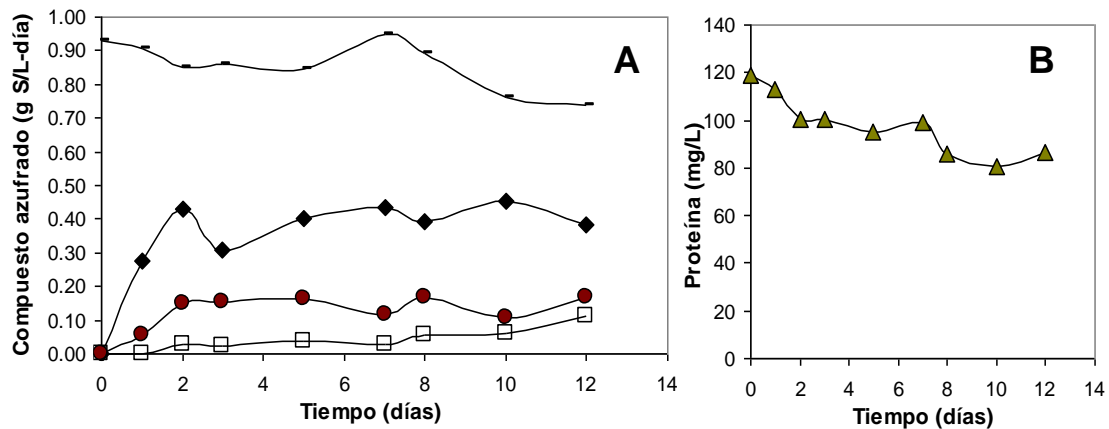


Figura 4.4 Producción de sulfato (◆), tiosulfato (□) y azufre elemental (●) en el reactor aerobio con el efluente conteniendo sulfuro (—) producido por el reactor UASB (A). Concentración de proteína (B).

Este experimento se llevó a cabo a una tasa de dilución de 0.8 d^{-1} , para alcanzar cargas de sulfuro de alrededor de $1 \text{ g S}^2/\text{L-día}$, si la tasa de dilución se hubiera dejado en 0.5 d^{-1} la carga de sulfuro no hubiera alcanzado ni siquiera 0.7 g/L-día , carga a la cual principalmente se produciría sulfato como se observó en los resultados con el reactor en continuo.

En otro experimento se probó el efluente del reactor anaerobio con un ajuste en el flujo de recirculación del aireador, éste se redujo de 300 mL/min a 100 mL/min y por otro lado también se disminuyó el flujo de aire en el aireador a 200 mL/min , con lo que el oxígeno disuelto en el aireador se mantuvo alrededor entre 3.5 y $4 \text{ mg O}_2/\text{L}$.

En esta segunda aproximación para tratar el efluente del reactor anaerobio se obtuvieron resultados un poco más satisfactorios que en el ensayo anterior; por ejemplo, la concentración de biomasa permaneció alrededor de 100 mg/L por un período de 32 días (Figura 5.5 B). La producción de azufre elemental aumentó a 44% del azufre alimentado, para el sulfato se observó una disminución en su producción con respecto al ensayo anterior siendo 28% del azufre inicial, también se cuantificó tiosulfato pero en menor proporción (2%). En este caso la carga de sulfuro estuvo más cercana a $1 \text{ g S}^2/\text{L-día}$ que en el experimento anterior (Tabla 4.5 y Figura 4.5 B). Sin embargo, en ninguno de los

experimentos se observó que la remoción de azufre alimentado haya sido mayor que 80%, lo que permite notar la sensibilidad del reactor a las variaciones en las cargas alimentadas debido a que la relación molar O_2/HS^- no pudo ser ajustada inmediatamente; para tal efecto sería necesaria la utilización de un controlador de oxígeno disuelto y la determinación de un parámetro con el que se pudiera monitorear en línea la concentración de sulfuro alimentada que podría ser con un electrodo de H_2S o con la determinación del potencial oxígeno reducción como lo propuso González (2002). En este experimento la formación de azufre precipitado se hizo más evidente, pudiéndose recuperar una buena parte en el fondo del reactor.

En la Tabla 4.5 se puede observar que la relación molar O_2/HS^- consumido es mayor que la relación estequiométrica de 0.5 pues una parte del sulfuro alimentado se convirtió en sulfato. De acuerdo con los resultados se puede sugerir que el consorcio no fue capaz de degradar de forma estequiométrica el sulfuro a azufre elemental, seguramente por que el oxígeno estaba en exceso provocando que en el aireador no se pudiera reducir la producción de sulfato. Sin embargo, se observó la acumulación de azufre elemental que aunque no fue la esperada fue suficiente para demostrar que es posible el tratamiento secuencial de una corriente que contiene sulfuro mediante el tratamiento aerobio de la misma, para la recuperación de azufre elemental.

De acuerdo con los resultados se puede sugerir que bajo las condiciones a las que se operó el reactor la carga de sulfuro a la cual se obtendría una máxima producción de azufre elemental sería de $1.8 \text{ mg } S^{2-}/L\text{-h}$, por esto la mayoría del sulfuro se transformó en sulfato, porque la carga idónea para lograr la máxima producción de azufre elemental no se alcanzó. Para operar un sistema secuencial de reducción de sulfato/oxidación de sulfuro se vuelve indispensable asegurar que el efluente del reactor cumplirá con el requerimiento de la carga de sulfuro necesaria para dirigir la oxidación de sulfuro hacia la producción de azufre elemental.

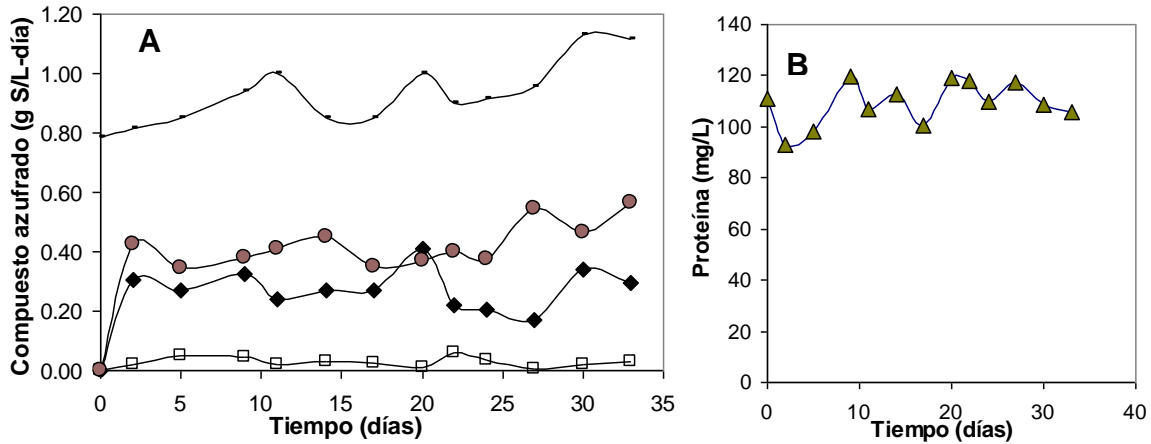


Figura 4.5 Producción de sulfato (◆), tiosulfato (□) y azufre elemental (●) en el reactor aerobio con el efluente conteniendo sulfuro (—) producido por el reactor UASB (A). Concentración de proteína (B).

Tabla 4.5 Balance de azufre para las diferentes cargas de sulfuro en el reactor en secuencial a una tasa de dilución de 0.8 d^{-1}

O_2/S^2	S-S ²⁻ in	S-S ²⁻ ef	S-S ²⁻ cons	S-SO ₄ ²⁻ ef	S-S ₂ O ₃ ²⁻ ef	S ⁰ ef	S-total convertido (%)	S no cuantificado (%)
	(g/L-día)							
0.79	0.85	0.03	0.82	0.38	0.04	0.13	67	33
0.65	0.95	0	0.95	0.26	0.03	0.42	75	25

in: influente ef: efluente

Un parámetro que resulta fundamental en la operación de un reactor sulfoxidante es la relación molar O_2/HS^- consumida, es importante señalar que fue calculada a partir de las cargas molares de oxígeno y sulfuro que se consumieron en el reactor de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{O_2}{HS^-} = \frac{Q_{O_2}}{Q_{HS^-}} \quad (5.5)$$

en donde las cargas están definidas por las siguientes ecuaciones:

$$Q_{O_2} = \frac{R \times ([O_2]_A - [O_2]_S)}{V_{total}} \quad (5.6)$$

$$Q_{HS^-} = \frac{F \times ([HS^-]_{in} - [HS^-]_{ef})}{V_{total}} \quad (5.7)$$

donde:

Q_{O_2}	velocidad de consumo de oxígeno (mmol/L-h)
Q_{HS^-}	velocidad de consumo de sulfuro (mmol/L-h)
F	flujo de alimentación (L/h)
R	flujo de recirculación de líquido, es decir del aireador al reactor (L/h)
$[O_2]_A$	concentración de oxígeno disuelto en el aireador (mmol O ₂ /L)
$[O_2]_S$	concentración de oxígeno disuelto en el reactor (mmol O ₂ /L)
$[HS^-]_{in}$	concentración de sulfuro en la alimentación (mmol HS ⁻ /L)
$[HS^-]_{ef}$	concentración de sulfuro a la salida (mmol HS ⁻ /L)
V_{total}	volumen del reactor y del aireador (L)

5. Inhibición de la digestión anaerobia de materia orgánica por sulfuro y oxígeno: Efecto del tipo de inmovilización microbiana

5.1 Resumen

Para determinar el efecto de la concentración de sulfuro y oxígeno en la actividad sulfatorreductora y metanogénica de dos diferentes tipos de agregados microbianos, obtenidos de un reactor UASB (lodo granular) y de un reactor de LFI (biomasa adherida), se hicieron experimentos en lote en botellas serológicas. Las concentraciones de sulfuro total que causaron la pérdida del 50% de la actividad metanogénica (IC50) fueron 800 y 1250 mg/L y de la sulfatorreducción 750 y 860 mg/L con el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente como inóculo. Cuando la sulfatorreducción y la metanogénesis se llevaron a cabo simultáneamente, la sulfatorreducción mostró una mayor tolerancia al sulfuro. Los resultados sugieren que la metanogénesis en el lodo granular es menos resistente al sulfuro que cuando se encuentra adherida al soporte, mientras que la sulfatorreducción en la biomasa adherida presentó mayor tolerancia a las altas concentraciones de sulfuro que el lodo granular. Al llevar a cabo simultáneamente la sulfatorreducción y la metanogénesis el proceso total no fue afectado por el oxígeno suministrado, ya que este pudo ser usado por los organismos que oxidan el sulfuro o por los organismos facultativos. Los resultados mostraron que la integración de condiciones anaerobias y aerobias podría ser posible en un solo reactor y utilizarse como una estrategia adecuada para la completa transformación de sulfato en azufre elemental.

Una versión modificada de este capítulo se publicó como:

Celis-García, M.L.B., Ramírez, F., Revah, S., Razo-Flores, E. y Monroy, O.

Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: Influence of microbial immobilization type. *Environmental Technology*. Año: 2004 Vol. 25 Num. 11 pp. 1265-1275.

5.2 Introducción

La degradación anaerobia de compuestos orgánicos se lleva a cabo gracias a la acción concertada de varios grupos metabólicos incluyendo a las bacterias fermentativas, a las acetogénicas, a las metanogénicas (BM) y si el sulfato está presente, a las bacterias sulfatorreductoras (BSR). La operación efectiva del reactor requiere que estos grupos se encuentren en un equilibrio dinámico y sintrófico. Se ha mencionado la importancia que tiene la competencia de las BM y las BSR en reactores anaerobios que contienen sulfato. El resultado de esta competencia representa la diferencia entre un proceso 100% metanogénico y un proceso 100% sulfatorreductor. Los procesos completamente sulfatorreductores han abierto las posibilidades de tratar sustratos más complejos y tóxicos como aromáticos, alcanos, compuestos clorados y ácidos grasos de cadena larga. En años recientes se han desarrollado tecnologías interesantes para la remoción biológica de sulfato que en general consisten en dos pasos: 1) la reducción del sulfato a sulfuro y 2) la oxidación biológica del sulfuro producido en el primer paso a azufre elemental. La habilidad de las BSR de competir efectivamente con otras bacterias anaerobias por los sustratos orgánicos disponibles y la sensibilidad de otras bacterias hacia el sulfuro incrementa la canalización de los equivalentes reductores hacia la reducción del sulfato. Las aplicaciones típicas de la remoción biológica de sulfato son la generación de sulfuro para la remoción de metales pesados y la combinación de condiciones anaerobias/aerobias para la producción de azufre elemental (Hulshoff Pol *et al.*, 2001).

Por otro lado Zitomer y Shrouf (2000), usaron reactores fluidificados metanogénicos aireados directamente para el tratamiento de agua residual con alto contenido de sulfato y de DQO ($DQO/SO_4^{2-} = 4$). Encontraron eficiencias crecientes de remoción de 25 a 87%, debido a las concentraciones decrecientes de sulfuro en el reactor aireado, pues la concentración de sulfuro solo alcanzó 180 mg/L. El crecimiento sintrófico de *Thiobacillus thioparus* capaz de oxidar azufre y de la bacteria sulfatorreductora *D. desulfuricans*, en co-cultivos limitados por oxígeno y usando lactato como sustrato fue reportado por van den Ende *et al.* (1997). El crecimiento de las BSR se incrementó debido al ciclo del azufre que llevaba a la formación de azufre o tiosulfato. Estos compuestos azufrados permitieron tener

mayores rendimientos pues el consumo de ATP para la reducción de sulfato ya no estaba involucrado.

La integración de condiciones sulfatorreductoras y condiciones aerobias en un solo reactor puede ser una estrategia apropiada para la transformación completa de compuestos de azufre (sulfato, sulfuro) a azufre elemental el cual puede ser separado físicamente. Para que esta estrategia funcione, el proceso anaerobio debe ocurrir en biopelículas que estén expuestas al oxígeno. En este capítulo se evaluó la capacidad del lodo granular y de la biomasa adherida para tolerar la presencia de oxígeno y sulfuro. Los resultados ayudarán a explorar la posibilidad de llevar a cabo la reducción de sulfato y oxidación de sulfuro en un solo reactor para obtener azufre elemental, por lo que se requiere tener un mejor entendimiento de la sensibilidad de las BM y BSR hacia altas concentraciones de sulfuro y oxígeno.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Biomasa y medios de cultivo

Para los ensayos en lote se utilizaron dos tipos de inóculo: lodo granular proveniente de un reactor UASB a escala laboratorio y biomasa adherida a un soporte de polietileno de un reactor de lecho fluidificado inverso. Ambos reactores trataban agua sintética que contenía medio mineral, propionato, butirato y lactato (1:1:6) en base a DQO y sulfato (3.5 g/L). El medio mineral que se utilizó en la determinación de las actividades específicas ya fue descrito en el capítulo 2.

5.3.2 Ensayos de la actividad específica

Para cada tipo de biopelícula se determinaron tres tipos de actividad, la actividad metanogénica, la actividad sulfatorreductora y la actividad total (o simultánea). En la actividad total, la actividad metanogénica y la sulfatorreductora se evaluaron al mismo tiempo a partir de la DQO removida por sulfatorreducción y metanogénesis. La actividad total fue llevada a cabo en botellas de 120 mL conteniendo 50 mL de medio, para medirla

se adicionó propionato y acetato a cada botella como sustrato (1:1, como DQO) para tener 2.5 gDQO/L. El sulfato se adicionó a una concentración de 3.75 g/L. Pasado el tiempo de acondicionamiento (72 horas) se repuso el propionato y acetato (1:1) para tener 1 gDQO/L y el sulfato se repuso a 1.5 g/L. La actividad se calculó a partir de la suma de DQO consumido proveniente del propionato y del acetato. El sulfato se determinó al inicio y al final de la prueba.

5.2.3 Ensayos de la toxicidad de sulfuro y oxígeno

Se evaluó el efecto de los diferentes niveles de sulfuro sobre las actividades metanogénica, sulfatorreductora y total. Después de inocular y adicionar los sustratos, las botellas se incubaron por una noche, al día siguiente se adicionó sulfuro a partir de una solución concentrada de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ recién preparada y con pH ajustado a 7.5 con HCl. Las concentraciones de sulfuro total (ST) que se probaron fueron: 250, 500, 1000, 1500 ó 1700 y 2000 ó 2300 mg/L. La inhibición por sulfuro se llevó a cabo a un pH de 7.5 para reducir la toxicidad por el sulfuro no ionizado (Visser, *et al.*, 1993a).

La toxicidad por oxígeno fue evaluada sobre las actividades metanogénica y total. Después de la incubación por una noche se removieron diferentes volúmenes de la fase gaseosa de las botellas y se reemplazaron con el mismo volumen de oxígeno puro (99%) para tener la concentración inicial de oxígeno disuelto deseada. Las concentraciones probadas de oxígeno disuelto inicial (ODI) fueron 1.3, 2.6, 5.4, 8.0, y 10.7 mg/L para la actividad metanogénica individual y 5.4, 10.7, 16.0, 21.5 y 26.8 para la actividad simultánea.

5.3.4 Análisis

La determinación de los SSV, acetato, propionato, sulfuro, sulfato y metano se llevó a cabo conforme se describió en el capítulo 2.

5.4 Resultados

5.4.1 Inhibición de la actividad anaerobia por sulfuro

Determinación de las actividades

Se revisaron y analizaron los perfiles de tiempo de metano producido o del sustrato consumido en cada botella y para cada concentración del inhibidor. En el proceso metanogénico con el lodo granular se observó una fase de retardo mayor a 1.5 horas cuando la concentración de sulfuro fue mayor que 1000 mg/L, pero la actividad no se perdió aún a la máxima concentración evaluada (Figura 5.1A). Con la biomasa adherida no se observó una fase de retardo, el aumento de la concentración de sulfuro total dio como resultado la disminución gradual de la actividad metanogénica tanto que a 2300 mg/L de sulfuro no se detectó actividad (Figura 5.1B). Los resultados indican que la DQO removida por la biomasa adherida fue de 60% mientras que la usada por el lodo granular fue de 51% a partir de 1 gDQO/L. La actividad sulfatorreductora en ambos tipos de agregado microbiano no presentó fase de retardo y disminuyó gradualmente con el aumento de la concentración de sulfuro total (Figuras 5.1C y D). La actividad sulfatorreductora de la biomasa adherida fue mayor que la alcanzada con el lodo granular.

Las Figuras 5.1E-H corresponden a los perfiles de tiempo de metano producido y DQO consumida por sulfatorreducción, al llevar a cabo la determinación de la actividad total con ambos tipos de agregados. La actividad metanogénica con el lodo granular mostró una fase de retardo a concentraciones de sulfuro entre 250 y 1000 mg/L, la actividad se detuvo por completo a una concentración de 1500 mg/L (Figura 5.1E). En cuanto al proceso metanogénico con la biomasa adherida la actividad correspondiente para el control se desarrolló favorablemente, aproximadamente 100% de la DQO disponible para las bacterias metanogénicas se consumió antes de 8 horas. La concentración de 1000 mg/L de sulfuro causó una fase de retardo de una hora en la producción de metano (Figura 5.1F).

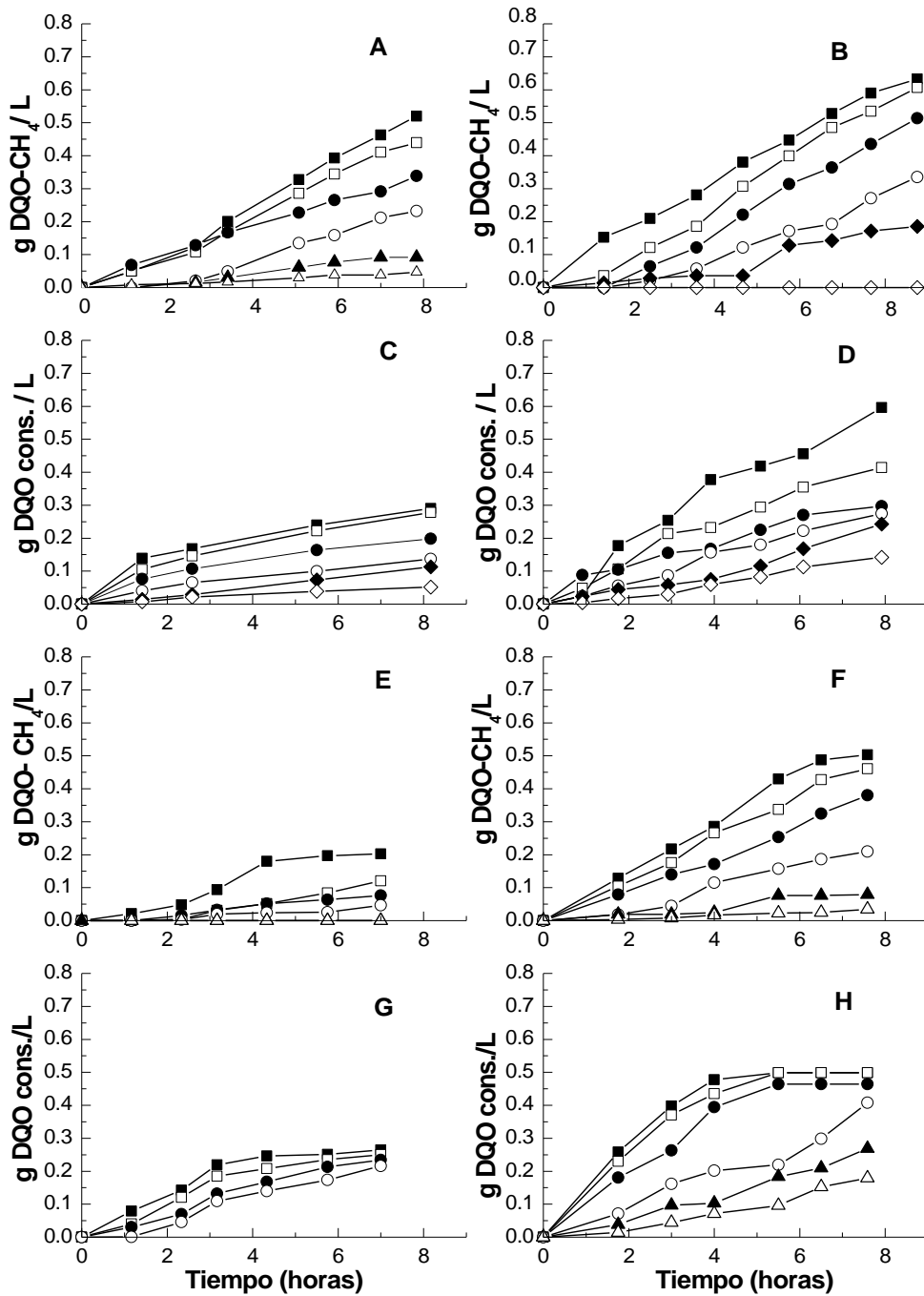


Figura 5.1 Perfiles cinéticos para determinar las actividades metanogénica y sulfatorreductora con lodo granular (LG) y biopelícula adherida (BA), a diferentes concentraciones de sulfuro total 0 (■), 250 (□), 500 (●), 1000 (○), 1500 (▲), 1750 (◆), 2000(△) y 2300 (◇) mg/L. Metanogénesis: (A) con LG; (B) con BA. Sulfatorreducción: (C) con LG; (D) con BA. Metanogénesis en la actividad total: (E) con LG; (F) con BA. Sulfatorreducción en la actividad total: (G) con LG; (H) con BA.

Al evaluar la actividad total, la actividad sulfatorreductora con el lodo granular fue afectada gradualmente por el incremento en la concentración de sulfuro total (Figura 5.1G). Mientras que con la biomasa adherida se observó un umbral de concentración a 500 mg/L de sulfuro total, las concentraciones más altas causaron una reducción drástica en las velocidades iniciales de consumo de DQO (Figura 5.1H). El consumo de DQO por las bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras en el ensayo de la actividad total fue cercano a 100% para la biomasa adherida y aproximadamente de 60% para el lodo granular, a partir de los 0.5 gDQO/L disponibles para cada grupo de bacterias.

Puesto que el análisis de los datos esta basado en las actividades específicas obtenidas en los controles, es importante mostrar la actividad específica obtenida en cada prueba (Tabla 5.1). Los valores de actividad específica están dados en velocidades equivalentes de DQO, gDQO-CH₄/gSSV-día para la actividad metanogénica y gDQO-H₂S/gSSV-día para la actividad sulfatorreductora. Cabe hacer notar que las actividades metanogénicas en las pruebas individuales fueron muy similares para los dos tipos de agregados microbianos, lo mismo se observó en las actividades sulfatorreductoras determinadas por separado y simultáneamente.

Tabla 5.1 Las actividades específicas para los ensayos separados y simultáneos del lodo granular y de la biopelícula adherida.

Tipo de agregado	Actividad específica del control (gDQO/gSSV-día)			
	Metanogénica separada	Sulfatorreductora separada	Metanogénica simultánea	Sulfatorreductora simultánea
Lodo granular	0.8	0.78	0.32	0.87
Biopelícula adherida	0.92	0.92	0.84	1.12

Pruebas de toxicidad

Se estudiaron ambos tipos de agregados para determinar su susceptibilidad al sulfuro después de una exposición de 3 días mediante la determinación de las actividades metanogénica, sulfatorreductora y total. Los resultados están dados como actividades relativas a los controles no expuestos (100% de la actividad). En la Figura 5.2 se presentan

los resultados para la actividad metanogénica y para la actividad sulfatorreductora llevadas a cabo por separado. El efecto del sulfuro en la actividad metanogénica individual fue mayor en el lodo granular que en la biomasa adherida, para el lodo granular se observó un decremento casi lineal en la actividad. En contraste, en la biomasa adherida la actividad se mantuvo alta en las concentraciones de sulfuro total menores a 500 mg/L; concentraciones mayores causaron un decremento pronunciado de la actividad, por lo que se puede hablar de un intervalo de concentración umbral entre 500 y 1000 mg/L. Las concentraciones que causaron la pérdida de la mitad de la actividad del control (CI₅₀) fueron 800 y 1250 mg/L para el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente (Figura 5.2A). El perfil obtenido en la biomasa adherida mostró una concentración crítica de 2300 mg ST/L a la cual la metanogénesis se detuvo por completo, mientras que 2000 mg/L de sulfuro total redujeron en 90% la actividad de la biomasa adherida.

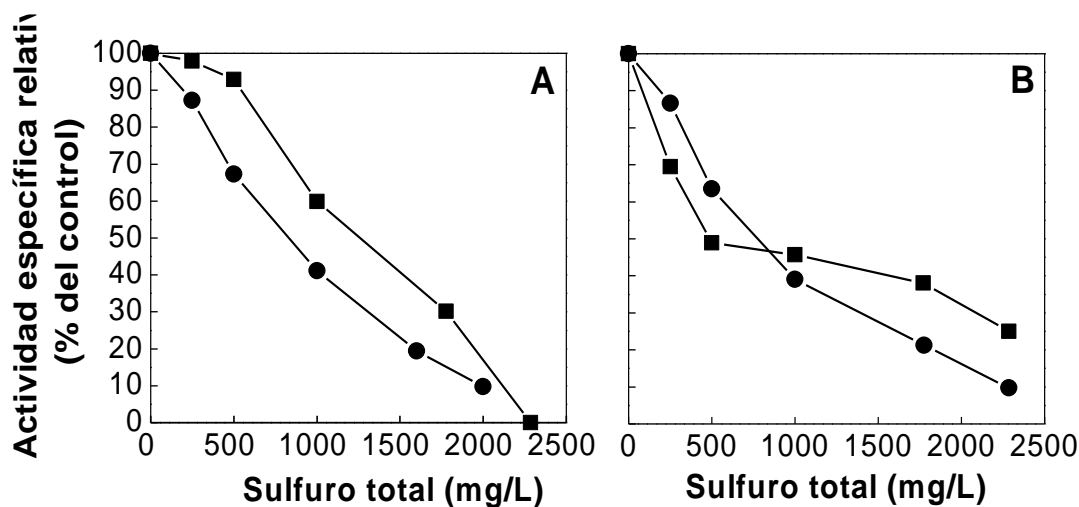


Figura 5.2 La actividad metanogénica individual (A) y la actividad sulfatorreductora individual (B) como fracción de la actividad específica no inhibida del lodo granular (●) y la biomasa adherida (■).

Con respecto a la actividad sulfatorreductora se observó una disminución drástica de la actividad a concentraciones menores de 1000 mg/L y en el caso particular de la biomasa adherida la actividad no fue tan severamente afectada como en el lodo granular a concentraciones más altas (Figura 5.2B). La DQO total removida por la biomasa adherida

fue de 60% mientras que el lodo granular solo removió 33%. La reducción de la actividad sulfatorreductora en el lodo mostró una disminución directamente proporcional con el aumento de la concentración de sulfuro, tal como se observó en el proceso individual de metanogénesis.

La Figura 5.3 resume los resultados obtenidos en la determinación simultánea de las actividades metanogénica y sulfatorreductora, la actividad total en el lodo granular fue drásticamente afectada por el incremento de sulfuro total pues a una concentración de 1500 mg/L no se observó actividad; el control metanogénico utilizó solo el 25% de la DQO disponible para dicho proceso. La DQO consumida por el proceso de sulfatorreducción fue cerca del 100% de la DQO disponible, esto quiere decir que la totalidad del propionato adicionado se consumió por sulfatorreducción. Con la biomasa adherida la actividad total disminuyó gradualmente y se detectó una concentración límite de 500 mg/L de sulfuro total. Concentraciones más altas causaron un decremento drástico en la actividad y a 2000 mg/L la sulfatorreducción representaba el 99% de la actividad total. La biomasa adherida utilizó 99.8% y 100% de la DQO disponible para el proceso sulfatorreductor y metanogénico respectivamente.

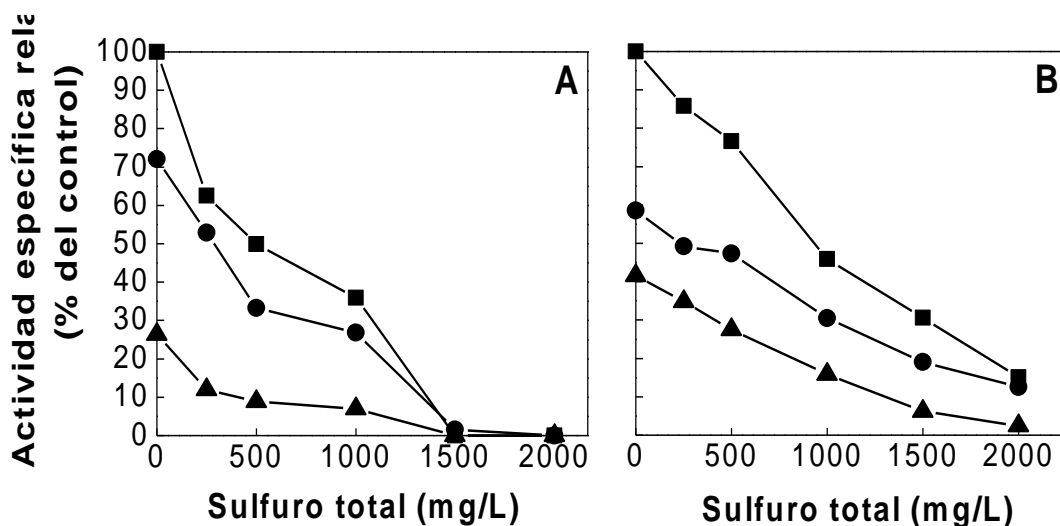


Figura 5.3 Las actividades total (■), metanogénica (▲) y sulfatorreductora (●) en el ensayo simultáneo para el lodo granular (A) y la biopelícula adherida (B).

En la digestión anaerobia en presencia de sulfato, los electrones del sustrato (en términos de DQO) normalmente se reparten entre las BSR y las BM. El flujo de energía vía sulfatorreducción en el lodo granular fue mayor a 60% y aumentó gradualmente al incrementar la concentración de sulfuro. En el caso de la biomasa adherida, 55% de la DQO total removida se consumió vía sulfatorreducción en el control sin inhibir y se incrementó a 85% cuando la concentración de sulfuro total era de 2000 mg/L (Figura 5.4).

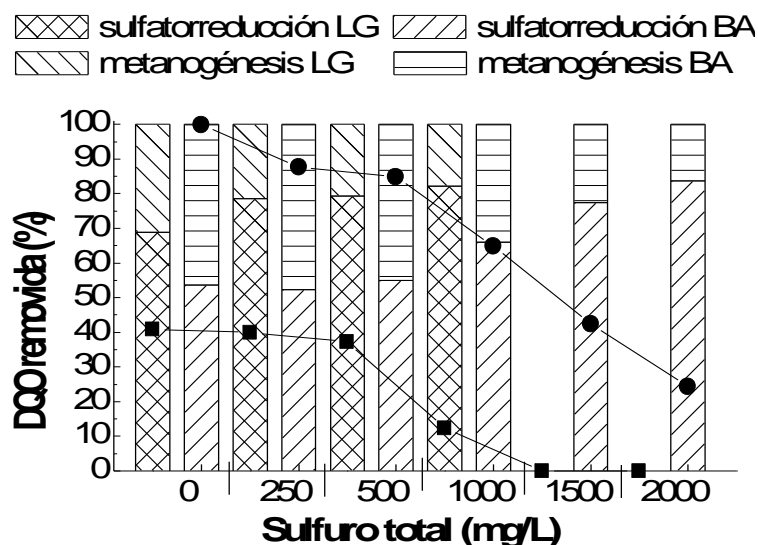


Figura 5.4 Efecto del sulfuro total en las fracciones de DQO removida atribuidas a la sulfatorreducción y metanogénesis por el lodo granular, LG (■) y la biomasa adherida, BA (●).

Balance de sulfato

La DQO utilizada en las actividades sulfatorreductoras correspondió con el sulfato reducido, esta correspondencia mostró que la utilización de propionato por las bacterias acetogénicas fue baja o probablemente no se llevó a cabo, en el período de tiempo que duró el ensayo. En la prueba de la actividad sulfatorreductora sin inhibidor la relación inicial DQO/SO₄²⁻ fue de 0.66 y la final fue de 0.67; el propionato consumido fue de 0.33 g DQO/L y el sulfato usado de 0.4 g/L en el caso del lodo granular. Con la concentración más alta de sulfuro la relación final DQO/SO₄²⁻ era de 0.68 y 0.69 en el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente. Es importante mencionar que después de la exposición por 72

al sulfuro se observó una acumulación de sulfato y propionato en los experimentos de sulfatorreducción realizados con 1700 y 2300 mg/L de sulfuro total con ambas fuentes de biomasa. Esto indica que la sulfatorreducción en esos tratamientos era muy baja o no se llevó a cabo. Cuando se analizaron los perfiles de consumo de sustrato, se detectó la acumulación de acetato a una concentración alrededor de 6.6 mM en las botellas no expuestas al sulfuro debido a la adición del inhibidor de la metanogénesis BESA. El acetato acumulado correlacionó bien con el propionato degradado, esto también mostró que el sustrato preferido por la BSR fue el propionato. El acetato acumulado fue disminuyendo con las concentraciones crecientes de sulfuro adicionado. Tal como lo han reportado otros autores, se encontró que el acetato es un intermediario en la degradación de propionato vía sulfatorreducción (Koster *et al.*, 1986; McCartney y Oleskiewicz, 1993). Sin embargo después del período de 72 horas, no se acumularon ni el acetato ni el sulfato en las botellas control, indicando que el acetato también fue oxidado por las BSR. La sulfatorreducción ocurrió en todas las diferentes concentraciones de sulfuro probadas y el propionato no fue desviado a otras rutas.

5.4.2 Inhibición de la actividad anaerobia por oxígeno

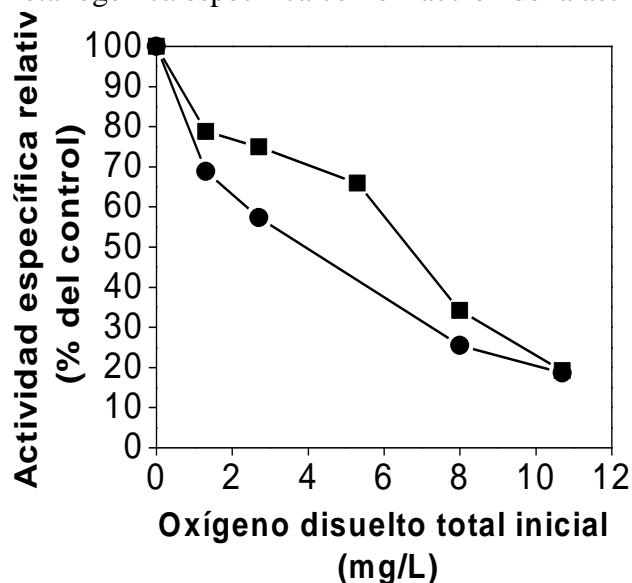
El inóculo utilizado fue retirado del reactor el mismo día en que los experimentos fueron realizados, por lo que las características del lodo pudieron variar ligeramente de los experimentos por inhibición de sulfuro. Por esta razón las actividades específicas de los controles sin inhibición de la actividad metanogénica individual y la actividad total se midieron de nuevo para esta prueba con objeto de obtener las actividades relativas (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Actividad específica del control en los ensayos de actividad metanogénica y actividad total en ambos tipos de biopelícula.

Tipo de biopelícula	Actividad específica del control (gDQO/gSSV-día)			Actividad total
	Metanogénesis (individual)	Metanogénesis (simultánea)	Sulfatorreducción (simultánea)	
Lodo granular	0.96	0.35	0.46	0.84
Biopelícula adherida	1.22	0.44	0.66	1.1

Las actividades específicas en ambos tipos de agregados no fueron muy diferentes entre sí, aunque las actividades para la biopelícula adherida fueron un poco más altas. En la determinación de la actividad metanogénica la producción estequiométrica de metano se alcanzó después de 24 horas a partir de que se repuso el acetato. Las actividades metanogénicas fueron mayores que 0.5 gDQO/gSSV-día, estas actividades son aceptables para los substratos usados en los experimentos. La actividad sulfatorreductora en la biopelícula adherida fue mayor la del lodo granular, esto corrobora la hipótesis de una mejor adhesión de las BSR al soporte plástico. La susceptibilidad de la biopelícula hacia el lodo se evaluó por medio de la de la actividad metanogénica determinada con diferentes concentraciones iniciales de oxígeno correspondientes a 5, 10, 20, 30 y 40% del volumen gaseoso de la botella. Los resultados demostraron que la metanogénesis toleró concentraciones de oxígeno disuelto hasta de 10.7 mg/L (40% v/v en el espacio gaseoso), esta concentración redujo en 85% la actividad metanogénica de ambos tipos de biopelícula (Figura 5.5).

Figura 5.5 La actividad metanogénica específica como fracción de la actividad metanogénica



del control para el lodo granular (●) y la biopelícula adherida (■) en presencia de oxígeno en la actividad metanogénica individual.

Sin embargo la biopelícula adherida mostró una mejor tolerancia a las concentraciones iniciales de oxígeno desde 1.6 a 8 mg/L comparado con el desempeño del lodo granular. Las concentraciones inhibitorias calculadas para la IC₅₀ y la IC₁₀₀ fueron 4.9 y 12.4 mg/L de oxígeno disuelto, en el caso del lodo granular. Los resultados fueron similares para la biopelícula adherida, 6.4 y 13.4 mg/L de oxígeno disuelto para la IC₅₀ y la IC₁₀₀ respectivamente. Los valores de la IC₅₀ corresponderían aproximadamente a un 24% de oxígeno en el espacio gaseoso y es comparable a los resultados reportados por Tan *et al.* (1999) que son de 18 y 26% de oxígeno en el espacio gaseoso para dos diferentes tipos de lodo con actividades metanogénicas de 0.53 y 1.1 gDQO/gSSV-día respectivamente. Las actividades reportadas también son comparables con las obtenidas en este trabajo (Tabla 5.2).

Los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de oxígeno sobre la actividad total se muestran en la Tabla 5.3 y se puede observar que no hubo inhibición de la actividad total aún a la concentración de oxígeno disuelto más alta que fue de 26.8 mg/L, dicha concentración equivale a 100% de oxígeno en el espacio gaseoso de la botella. Como se observa, la actividad sulfatorreductora en ambos tipos de biopelícula fue mayor que la actividad metanogénica, los porcentajes de DQO removida fueron de 60 y 80% para el lodo granular y la biopelícula adherida respectivamente.

Tabla 5.3 Las actividades específicas metanogénica, sulfatorreductora y total del lodo granular (LG) y de la biopelícula adherida (BA) a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto inicial y su porcentaje inicial equivalente de oxígeno en el espacio gaseoso (PIOG).

Oxígeno disuelto inicial (mg/L)	PIOG (%)	Actividad específica (gDQO/gSSV-día)					
		Metanogénica		Sulfatorreductora		Total	
		LG	BA	LG	BA	LG	AB
5.4	20	0.36	0.41	0.51	0.65	0.84	1.0
10.7	40	0.30	0.42	0.51	0.65	0.81	1.1
16.0	60	0.30	0.38	0.47	0.64	0.77	1.0
21.5	80	0.30	0.36	0.50	0.65	0.80	1.0
26.8	100	0.28	0.30	0.47	0.66	0.75	0.96

Con respecto al flujo de electrones hacia la sulfatorreducción y metanogénesis se observó que la fracción de DQO utilizada vía sulfatorreducción permaneció constante, mientras que el uso de la DQO por las BM mostró una ligera disminución pero aún así ocurrió a la concentración de oxígeno disuelto más alta. Después de la exposición de 72 horas a la atmósfera con oxígeno éste no se detectó en el espacio gaseoso de ninguna de las botellas.

5.5 Discusión

Los ensayos de actividad en lote como los que se llevaron a cabo en este trabajo generan resultados de toxicidad que son apropiados para determinar los efectos de una sola dosis de inhibidor, después de un período de tiempo corto. Los datos obtenidos pueden ser usados para relacionar el efecto de la dosis y los umbrales de toxicidad. De igual forma, los valores son útiles cuando se llevan a cabo comparaciones entre la toxicidad de varios compuestos o la sensibilidad de diferentes grupos tróficos de microorganismos (O'Flaherty y Colleran, 2000).

En términos generales, la biomasa adherida removió más DQO que el lodo granular. Esto también se reflejó en las actividades más altas obtenidas por la biomasa adherida en todas las concentraciones de sulfuro total. Las bacterias metanogénicas necesitaron un cierto período de tiempo, antes de que comenzara la producción exponencial de metano en los ensayos de actividad separada y simultánea. En contraste, las actividades sulfatorreductoras no exhibieron una fase de retardo aún a las concentraciones más altas de sulfuro total (1500, 1700, 2000 y 2500 mg/L). Aunque las actividades sulfatorreductoras determinadas en la actividad total fueron similares (Tabla 5.1) puede observarse que existe una diferencia muy marcada entre las actividades metanogénicas simultáneas. Es importante recordar que en los ensayos individuales de la actividad metanogénica no se usó sulfato para prevenir la sulfatorreducción y que en el ensayo simultáneo se usaron acetato y propionato para que no existiera competencia entre la sulfatorreducción y la metanogénesis. Los ensayos simultáneos se llevaron a cabo para evaluar las actividades correspondientes cuando los substratos preferidos para cada proceso estuvieran

disponibles en presencia de sulfato. Las actividades específicas son comparables con las reportadas en la literatura. La actividad sulfatorreductora de un lodo granular con propionato varió entre 0.42-0.75 y entre 1.5-2.1 gDQO/gSSV-día, mientras que en una mezcla de acetato, propionato y butirato la actividad era de 0.85 gDQO/gSSV-día (Visser *et al.*,1993a). La actividad metanogénica en el ensayo simultáneo fue obtenida del consumo de acetato y propionato. En la literatura la actividad total para lodo granular con acetato, propionato, butirato y sulfato se reporta entre 0.6 y 0.95 gDQO/gSSV-día (Omil *et al.*, 1997a). En el presente trabajo, la actividad total usando acetato, propionato y sulfato fue de 0.54 y 1.1 gDQO/gSSV-día en el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente. Es interesante destacar que la biomasa adherida mostró actividades más altas que las presentadas por el lodo granular, aunque los reactores de donde se obtuvo el inóculo operaron con la misma composición de sustrato, los experimentos en lote se comportaron de forma diferente. La biomasa obtenida en el reactor de lecho fluidificado inverso mostró actividades metanogénicas y sulfatorreductoras específicas más altas, esto podría explicarse porque en la biopelícula formada seguramente hubo una mejor inmovilización de las BSR al soporte plástico gracias a la velocidad descendente aplicada al reactor. La habilidad de las BM de colonizar superficies porosas como son las esponjas de poliuretano y las zeolitas más fácilmente que las BSR se ha reportado anteriormente (Isa *et al.*, 1986; Yoda *et al.*, 1987). Sin embargo en el presente trabajo las BSR mostraron una capacidad de inmovilización en el soporte plástico equivalente al de las BM como lo sugieren las actividades (Tablas 5.1 y 5.2).

Los resultados de la toxicidad del sulfuro sobre el proceso sulfatorreductor mostraron que la biomasa adherida tuvo una mejor tolerancia probablemente debido a un mejor desarrollo de las BSR en el soporte plástico (Figura 5.2 B). Además el hecho de que la DQO total removida por la biomasa adherida fuera mayor que la removida por el lodo granular apunta también hacia una mayor población sulfatorreductora en el soporte plástico. La IC₅₀ estimada para la sulfatorreducción fue de 750 y de 860 mg/L para el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente. Por esto puede decirse que el lodo granular resultó ser menos tolerante hacia el sulfuro total. Debe tomarse en consideración que a concentraciones altas de sulfuro total la biopelícula adherida mostró una menor reducción en la actividad

que el lodo granular, como se observa en la Figura 5.2 B, a 2300 mg/L de sulfuro total el lodo granular mostró 90% de reducción en la actividad, mientras que la biopelícula adherida tuvo 75% de reducción.

Con respecto al flujo de electrones se observó que en el ensayo simultáneo la sulfatorreducción fue menos afectada que la metanogénesis tanto en el lodo granular como en la biopelícula adherida. En general se observó una influencia directa de la concentración de sulfuro sobre la DQO removida que disminuyó drásticamente a concentraciones mayores de 500 mg/L. Concentraciones menores tuvieron influencia sobre la actividad total pero fue menos severa. Esta concentración parece ser una concentración umbral en el desarrollo simultáneo del proceso sulfatorreductor y metanogénico. En las botellas control, la DQO consumida por el lodo fue solo 40% mientras que la biomasa adherida utilizó 100% de la DQO suministrada. El bajo consumo de DQO en el lodo granular puede ser el resultado del efecto tan drástico del sulfuro sobre la actividad total. Respecto a la tolerancia hacia la concentración sulfuro, la biomasa adherida toleró mucho más el aumento de la concentración de sulfuro. Este fenómeno puede atribuirse a una adhesión selectiva de las BSR al soporte plástico. Los microorganismos inmovilizados se desempeñaron mejor en presencia de sulfuro cuando se encontraban adheridos a un soporte que cuando estaban agregados como lodo granular. Esta tolerancia puede estar relacionada también con un mayor contenido de BSR en la biopelícula adherida que en el lodo granular.

Para describir el comportamiento de la inhibición por producto causada por el sulfuro se propone usar un modelo (Levenspiel, 1989). El modelo propuesto (ec. 5.1) se ajusta para la constante específica de reacción exponencialmente con la constante n . Basándose en el hecho de que en un reactor sulfatorreductor el sulfuro total será un producto tóxico ya sea para las BM o para las BSR.

$$k = k_{max} \left(1 - \frac{I}{IC_{100}} \right)^n \quad (5.1)$$

donde:

k: actividad específica (g DQO/g-día)

kmax: actividad máxima específica (g/g SSV-día)

I: Concentración del inhibidor (mg/L)

IC100: Concentración de sulfuro total a la cual se detiene la reacción (mg/L)

n: constante de ajuste del modelo

La constante exponencial n fue calculada como la pendiente obtenida de la relación de las tasas específicas $\log k/k_{\max}$ vs. el término de inhibición de la ecuación 5.1: $\log (1-I/IC_{100})$, usando el método de mínimos cuadrados. En donde k representa a la actividad específica inhibida y k_{\max} es la actividad específica sin inhibir. Los valores de n , coeficientes de correlación y las concentraciones de IC100 se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 La constante exponencial n y las concentraciones inhibitorias de sulfuro total IC₅₀ e IC₁₀₀ en los diferentes ensayos de la actividad.

Proceso y tipo de biopelícula	n	r^2	IC ₁₀₀ (mg/L)	IC ₅₀ ¹ (mg/L)	IC ₅₀ ² (mg/L)
Metanogénico separado LG	1.3	0.994	1899	800	924
Metanogénico separado BA	1.9	0.998	2308	1250	1305
Sulfato-reductor separado LG	2.0	0.993	2713	750	517
Sulfato-reductor separado BA	2.8	0.893	3485	860	1083
Metanogénico simultáneo LG	2.6	0.999	1500	450	-
Metanogénico simultáneo BA	1.1	0.934	2119	900	1034
Sulfato-reductor simultáneo LG	1.7	0.999	1500	1000	-
Sulfato-reductor simultáneo BA	1.5	0.968	2962	1100	1098

¹ Determinada de las gráficas 4.2 y 4.3

² Obtenida por el modelo

Los valores de n son en todos los casos mayores a 1, los ensayos en los que n fue mayor o cercana a 2 corresponden a un decremento inicial rápido en la actividad a bajas

concentraciones de sulfuro total. Como en el caso del proceso de sulfatorreducción llevado a cabo por separado para ambos tipos de biopelícula, en el ensayo metanogénico separado para la biomasa adherida y el ensayo metanogénico simultáneo para el lodo granular. Los valores cercanos a 1 describen un decremento lineal en la actividad, conforme el valor aumenta la relación se convierte en una curva.

Reuniendo toda la información previa puede decirse que el proceso sulfatorreductor fue más resistente a la toxicidad por sulfuro y en general la biomasa adherida mostró una mejor respuesta que el lodo granular. Las concentraciones inhibitorias obtenidas para el proceso metanogénico son comparables con los valores reportados (Tabla 5.5).

Tabla 5.5 Las concentraciones que causan 50% de inhibición de la actividad metanogénica.

Tipo de biopelícula	pH	IC50 (mg/L)	Referencia
Lodo granular	7.0-7.2	810	[Koster <i>et al.</i> , 1986]
Lodo granular	7.8-8.0	841	[Koster <i>et al.</i> , 1986]
Lodo granular	7.2-7.4	564	[Visser <i>et al.</i> , 1996]
Lodo granular	8.1-8.3	590	[Visser <i>et al.</i> , 1996]
Lodo granular	7.5-7.7	924	Este trabajo
Biomasa adherida	7.5-7.7	1305	Este trabajo

Se ha reportado que la concentración de sulfuro total más que la concentración de sulfuro no ionizado (H_2S) es la responsable de dictar la inhibición del sulfuro sobre las BSR, tanto en lodo granular como en lodo floculento (Lens, *et al.* 1998). La inhibición de la sulfatorreducción en ambos tipos de biomasa utilizada es comparable con las observaciones de Visser *et al.* (1996) que reportó concentraciones de 615 y 1125 mg/L de sulfuro total para intervalos de pH de 7.2-7.4 y de 8.1-8.3 respectivamente. En los ensayos por separado, las bacterias sulfatorreductoras fueron más tolerantes al sulfuro total que los metanogénicas. Se ha reportado también que, en pruebas en lote, las BSR fueron más sensibles al sulfuro total que las BM (Koster, *et al.* 1986); sin embargo en el presente trabajo se observó lo opuesto, las BSR fueron más tolerantes al sulfuro total que las BM. Muy probablemente, la alta tolerancia puede deberse al largo período de operación de los reactores (de donde se

obtuvo el inóculo) bajo altas concentraciones de sulfuro total, mayores a 600 mg/L. La actividad sulfatorreductora incrementó su tolerancia al sulfuro cuando se llevó a cabo simultáneamente con la metanogénesis en ambos tipos de biopelícula. Sin embargo las BM fueron más inhibidas por el sulfuro que las BSR cuando los dos procesos se llevaron a cabo simultáneamente. McCartney y Oleskiewickz (1991) reportaron resultados similares para un lodo suspendido adaptado a lactato, acetato y sulfato a relaciones DQO/SO₄²⁻ de 1.6 y 0.8. Por otro lado, los mismos autores (1993) reportaron un incremento en la sensibilidad de las BSR hacia concentraciones elevadas de sulfuro, para un lodo granular suspendido adaptado a lactato, acetato y sulfato (DQO/SO₄²⁻ de 3.7). Probablemente, para el lodo adaptado a relaciones menores DQO/SO₄²⁻ una oxidación directa del lactato, propionato y otros ácidos grasos por las BSR era la ruta de degradación más importante, por lo que el efecto del sulfuro podría atribuirse directamente a la inhibición de las BSR. Aunque los dos tipos de biopelícula se adaptaron a sustratos y condiciones similares en los reactores, estos se desempeñaron de forma diferente en los estudios de inhibición. Los cambios en las sensibilidades relativas de la biomasa probada pueden sugerir un cambio en la población, pues las bacterias incapaces de adherirse a la matriz plástica fueron lavadas del reactor y estuvieron presentes en pequeños números. Es muy probable que las BSR predominaran en la biomasa adherida como lo indican las actividades sulfatorreductoras que resultaron ser mayores comparadas con las del lodo granular.

Kato *et al.* (1993a) reportan alta tolerancia del lodo anaerobio al oxígeno; para dos tipos de lodo con actividad metanogénica de 0.86 y 0.26 g DQO/g SSV-día, los valores de IC₅₀ reportados son 40 y 33% de oxígeno en el espacio de cabeza de la botella, respectivamente. Los autores reportaron también una relación espacio gaseoso/volumen de líquido de 4.5, mientras que la relación utilizada en el presente trabajo fue de 3.8. El experimento fue realizado para tener información sobre la tolerancia hacia el oxígeno por los dos tipos de agregados microbianos contenidos en los reactores. El hecho de que después de 72 horas de exposición al oxígeno no se detectara oxígeno residual en ninguna de las botellas (tanto del ensayo de la actividad metanogénica como de la actividad total) obedece a la acción de las bacterias facultativas como proponen Kato *et al.* (1993b) y en el caso de la actividad total a la combinación del papel de las bacterias facultativas junto con la reacción química del sulfuro producido con el oxígeno. En comparación con el ensayo de la actividad metanogénica

individual la metanogénesis en el ensayo simultáneo mostró mejor tolerancia a la presencia de oxígeno, mientras que ocurrió lo contrario cuando el inhibidor fue el sulfuro.

El efecto de la concentración más alta de oxígeno disuelto en la metanogénesis en el ensayo simultáneo representó una reducción del 15% en la actividad metanogénica comparada con el control. Mientras que la sulfatorreducción no fue afectada para nada y permaneció constante. La reducción en la actividad total es una consecuencia directa de la inhibición de la metanogénesis por el oxígeno.

La alta tolerancia hacia el oxígeno en el proceso simultáneo puede explicarse gracias al consumo de oxígeno debido a la reacción espontánea del sulfuro producido con el oxígeno en combinación con la actividad de las bacterias facultativas. Por lo que un aumento en el consumo de oxígeno disminuye la profundidad con la que el oxígeno pudiera penetrar la biopelícula y la metanogénesis así como la sulfatorreducción pueden llevarse a cabo sin ningún problema a altas concentraciones de oxígeno disuelto. El sulfuro producido por la sulfatorreducción pudo reaccionar con el oxígeno suministrado, existen reportes de que la velocidad de remoción de oxígeno por oxidación química de sulfuro en un agua residual es mayor comparada con el consumo de oxígeno por biomasa heterotrófica en redes de agua residual; por otro lado, la oxidación biológica de sulfuro fue menor al 40% de la oxidación total (Nielsen, *et al.*, 2003). En el presente estudio la actividad sulfatorreductora fue similar entre el control y las botellas expuestas a 26.8 mg/L de oxígeno disuelto (Tablas 4.4 y 4.5). Sin embargo, las concentraciones de sulfuro medidas al final del experimento no lo fueron. Para el lodo granular el sulfuro total en el control fue 562 mg/L y a la concentración más alta de oxígeno fue de 270 mg/L. En el caso de la biopelícula adherida el sulfuro total fue de 930 mg/L para el control y para la botella expuesta a la concentración de oxígeno disuelto más alta fue de 273 mg/L. Esta diferencia apoya la hipótesis de que efectivamente una parte del sulfuro producido reaccionó químicamente con el oxígeno suministrado. Los resultados experimentales ilustran que la actividad sulfatorreductora no fue afectada por concentraciones crecientes de oxígeno. La tolerancia de las BSR al oxígeno se ha reportado para especies del género *Desulfovibrio* (Cypionka, 2000), siendo unas de las especies más comunes de BSR encontradas en lodo anaerobio.

6. Conclusiones

En el tratamiento anaerobio de aguas residuales con alto contenido de sulfato la relación DQO/SO₄²⁻ juega un papel importante y puede marcar la diferencia entre lograr la remoción de materia orgánica y sulfato por el proceso de sulfatorreducción o tener un proceso metanogénico deficiente.

Los resultados obtenidos al operar los reactores UASB y LFI bajo condiciones de sulfatorreducción mostraron que las relaciones DQO/SO₄²⁻ cercanas a la estequiométrica de 0.66 promovieron la formación de sulfuro con la consecuente disminución de la metanogénesis. El comportamiento de ambos reactores fue igualmente eficiente al alcanzar eficiencias de remoción de DQO mayores a 90%. Para lograr tener un proceso sulfatorreductor, a partir de un lodo metanogénico es recomendable alimentar el reactor con un substrato más afín a las BSR con el fin de inducir su participación en el proceso anaerobio. También resulta adecuado mantener la relación DQO/SO₄²⁻ cercana a la estequiométrica para propiciar que la eficiencia de la producción de sulfuro sea mayor que la de metano. En este sentido, el lactato fue un substrato adecuado para promover la sulfatorreducción. Sin embargo, el uso de este compuesto resultaría ser muy costoso para una aplicación a gran escala; por lo que económicamente sería conveniente para producir inóculos ricos en BSR.

Fue posible llevar a cabo la oxidación del sulfuro presente en el efluente de un reactor anaerobio al ser tratado en un reactor aerobio; aunque no se logró la máxima recuperación de azufre elemental, ya que no se alcanzó una recuperación de azufre elemental mayor a 80% del azufre alimentado. Este hecho es atribuible a la variación de la concentración de sulfuro en el efluente del reactor aerobio. Cuando las condiciones de alimentación de reactor fueron más controladas al alimentarlo con un efluente sintético que contenía sulfuro de sodio la recuperación de azufre elemental llegó a ser de 75% del azufre alimentado.

En la operación de los reactores aerobios en los que la aireación se lleva a cabo por separado es indispensable un control adecuado de la relación oxígeno/sulfuro, tratando de mantenerla alrededor de la estequiométrica que es de 0.5; pues este parámetro marca la

diferencia entre lograr la oxidación parcial de sulfuro a azufre elemental o tener un proceso que lleve a la oxidación total hasta sulfato y regresar al punto de partida, lo cual ambientalmente no tiene ningún sentido.

La determinación de la capacidad máxima oxidativa resulta ser indispensable para poder calcular la carga máxima de sulfuro que se puede aplicar al reactor aerobio, de otra forma se corre el riesgo de no tener condiciones óptimas para que la ruta de oxidación se detenga en azufre elemental como sucedió en este trabajo. Se demostró que es posible la formación de azufre a partir de un efluente conteniendo sulfuro. Los experimentos dinámicos demostraron que el consorcio de bacterias sulfoxidantes puede pasar de la oxidación completa hasta sulfato a la oxidación parcial a azufre elemental sin mayor problema.

A manera de recomendaciones se propone un sistema en el cual se lleve a cabo el monitoreo en línea de la concentración de sulfuro o tener un sistema de suministro de oxígeno en el que se pudieran fijar concentraciones máximas y mínimas para suministrar el oxígeno intermitentemente con la finalidad de minimizar la producción de sulfato en el aireador. La concentración de oxígeno disuelto suministrada al reactor debe de ser la mínima posible, cercana a 0.2 mg/L o menor.

Los ensayos de inhibición con sulfuro y oxígeno sobre las actividades metanogénica, sulfatorreductora y total de las bacterias presentes en los reactores anaerobios mostraron que la biopelícula desarrollada en el soporte del reactor de lecho fluidificado inverso fue más tolerante a las concentraciones de sulfuro que el lodo granular, pues presentó IC_{50} de 1250, 860 mg ST/L para las actividades metanogénica y sulfatorreductora respectivamente que fueron mayores que las obtenidas para el lodo granular. En este sentido, el reactor LFI resultó ser más robusto que el reactor UASB. Puesto que las actividades metanogénica y sulfatorreductora en la biopelícula y en el lodo granular fueron similares se puede concluir que las bacterias sulfatorreductoras las bacterias metanogénicas presentaron propiedades semejantes para adherirse a la matriz de plástico, lo que aunado a la presión selectiva ejercida por la alta velocidad descendente resultó en una densa población de estos dos tipos de microorganismos. El proceso metanogénico fue más tolerante al sulfuro (IC_{50} = 800 y 1250

para el lodo granular y biomasa adherida respectivamente) cuando este se llevó a cabo individualmente que cuando ocurrió al mismo tiempo que la sulfatorreducción (IC_{50} = 450 y 900 para el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente). En cambio, para el proceso sulfatorreductor se observó lo opuesto. La IC_{50} en el proceso por separado fue de 750 y 860 mg ST/L para el lodo granular y lo biomasa adherida respectivamente, mientras que la IC_{50} en el proceso simultáneo fue de 1000 y 1100 mg/L para el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente.

En cuanto a la inhibición de oxígeno, el lodo granular y la biopelícula pudieron tolerar igualmente hasta 26.8 mg/L de oxígeno disuelto. Los resultados sugieren que la adición de oxígeno a un reactor sulfatorreductor no causaría la pérdida de la actividad sulfatorreductora de tal forma que la integración de condiciones anaerobias y aerobias dentro del mismo reactor sería posible con el objeto de alcanzar la remoción biológica de azufre a partir de compuestos oxidados de azufre.

Referencias bibliográficas

- APHA-AWA-WPCF, (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, 19a. edición, American Public Health Association, Washington, D.C., U.S.A.
- Alcántara Pérez, S.J. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial de tiosulfato en azufre elemental. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.
- Alcántara, S., Velasco, A., Muñoz, A., Cid, J., Revah, S. y Razo-Flores, E. (2004). Hydrogen sulfide oxidation by a microbial consortium in a recirculation reactor system: sulfur formation under oxygen limitation and removal of phenols. *Environ. Sci. Technol.* 38, 918-923.
- Alpheenar, P.A., Visser, A. y Lettinga, G. (1993). The effect of liquid upward velocity and hydraulic retention time on granulation in UASB reactors treating wastewater with a high sulphate content. *Biores. Technol.* 43, 249-258.
- Annachhatre, A.P. y Suktrakoolvait, S. (2001). Biological sulfide oxidation in a fluidized bed reactor. *Environ. Technol.* 22, 661-672.
- Arora, S., Mino, T. y Matsuo, T. (1995). Mechanism and favourable operating conditions of organic substrate removal in microaerophilic upflow sludge bed reactor (MUSB). *Wat. Res.* 29, 1895-1901.
- Barton, L.L. (1992). Sulfur metabolism. *Encyclopedia of Microbiology* 4, 135-150.
- Barlett, J.K. y Scoog, D.A. (1954). Colorimetric determination of elemental sulphur in hydrocarbons. *Anal. Chem.* 26, 1008-1011.
- Barret, E. y Clark, M.A. (1987). Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiol. Reviews* 51, 192-205.
- Boon, M. (2000). Bioleaching of sulfide minerals. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). International Water Association. Londres, pp. 105-123.
- Brüser, T., Lens, P. y Trüper, H. (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. Londres, pp. 47-85.
- Buffière, P., Steyer, J.P., Fonade, C. y Moletta, R. (1995). Comprehensive modeling of methanogenic biofilms in fluidized bed systems: Mass transfer limitations and multisubstrate aspects. *Biotech. Bioeng.* 48, 725-736.
- Buffière, P., Bergeon, J.P. y Moletta, R. (2000). The inverse turbulent bed: A novel bioreactor for anaerobic treatment. *Wat. Res.* 34, 673-677.

- Buisman, C.N.J., Geraats, B.G., Ijspeert, P. y Lettinga, G. (1990). Optimization of sulfur production in a biotechnological sulfide-removing reactor. *Biotech. Bioeng.* 35, 50-56.
- Buisman, C.N.J., Ijspeert, P., Hof, A., Janssen, A.J.H., ten Hagen, R. y Lettinga, G. (1991). Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur with oxygen. *Biotech. Bioeng.* 38, 813-820.
- Capone, D.G., Reese, D.D. y Kiene, R.P. (1983). Effects of metals on methanogenesis, sulfate reduction, carbon dioxide evolution, and microbial biomass in anoxic salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1586-1591
- Castilla, P., Meraz, M., Monroy, O. y Noyola, A. (2000). Anaerobic treatment of low concentration wastewater in an inverse fluidized bed reactor. *Wat. Sci. Tech.* 41(4-5), 245-251.
- Chen, K.Y. y Morris, J.C. (1972). Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. *Env. Sci. Technol.* 6, 529-537.
- Choi, E. y Rim, J.M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Wat. Sci. Tech.* 23(7-9), 1259-1264.
- Clancy, P.B., Venkatamaran, N. y Lynd, L.R. (1992). Biochemical inhibition of sulfate reduction in batch and continuous anaerobic digesters. *Wat. Sci. Tech.* 25(7), 51-60
- Colleran, E., Finnegan, S. y O'Keffe, R.B. (1994). Anaerobic digestion of high sulfate-containing wastewater from industrial production of citric acid. *Wat. Sci. Technol.* 30(12), 263-273.
- Colleran, E., Finnegan, S. y Lens, P. (1995). Anaerobic treatment of sulphide-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67, 29-46
- Cork, D.J., Jerger, D.E. y Maka, A. (1986). A biocatalytic production of sulfur process waste streams. *Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser.* 16, 149-162.
- Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 827-848.
- Day, R.A. y Underwood, A.L. (1989). Aplicaciones de las titulaciones de oxidación-reducción. En: *Química analítica cuantitativa*. 11a. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. Pp.359-365.
- Denger, K., Laue, H. y Cook, A.M. (1997). Thiosulfate as a metabolic product: The bacterial fermentation of taurine. *Arch. Microbiol.* 168, 297-301.
- Dergoce-Dumas, J., Kowai, S. y Le Cloirec, P. (1997). Microbiological oxidation of thiosulfate by *Thiobacillus novellus*. *Biochem. Biophys. Acta* 50, 371-373.
- Dolfing, J. y Bloemen, W. (1985). Activity measurements as a tool to characterize the microbiological composition of methanogenic environments. *J. Microbiol. Methods* 4, 1-12.

- Dong, X., Plugge, C.M. y Stams, A.J.M. (1994). Anaerobic degradation of propionate by a mesophilic acetogenic bacterium in coculture and triculture with different methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2834-2838.
- Friedrich, C.G. (1998). Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 39, 235-289.
- García-Calderón, D., Buffière, P., Moletta, R. y Elmaleh, S. (1998). Influence of biomass accumulation on bed expansion characteristics of a down-flow anaerobic fluidized-bed reactor. *Biotech. Bioeng.* 57, 136-144.
- Gadre, R.V. (1989). Removal of hydrogen sulfide from biogas by chemoatrophic fixed-film bioreactor. *Biotech. Bioeng.* 34, 410-414
- González, A. (2002). Operación, caracterización y modelado de un sistema de oxidación biológica de tiosulfato a azufre elemental. Tesis de maestría en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Gommers, P.J.F., Bijleveld, W. y Kuenen, J.G. (1988a). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying bed reactor. I: Start-up and reactor performance. *Wat. Res.* 22, 1075-1083.
- Gommers, P.J.F., Bijleveld, W., Zuijderwijk, F.J.M. y Kuenen, J.G. (1988b). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor. II: Measurement of activities and conversion. *Wat. Res.* 22, 1085-1092.
- Guiot, S.R. (1991). Modelling of the upflow anaerobic sludge bed-filter system: A case with hysteresis. *Wat. Res.* 23, 21-27
- Guiot, S.R., Arcand, Y. y Chavarie, C. (1992). Advantages of fluidization on granule size and activity development in upflow anaerobic sludge bed reactors. *Wat. Sci. Technol.* 26, 897-906.
- Gupta, A., Flora, J.R. V., Gupta, M., Sayles, G.D. y Suidan, M.T. (1994). Methanogenesis and sulfate reduction in chemostats. I. Kinetic studies and experiments. *Wat. Res.* 22, 1075-1083.
- Habets, L.H.A. y de Vegt, A.L. (1991). Anaerobic treatment of bleached TMP and CTMP effluent in the biopaq UASB system. *Wat. Sci. Technol.* 24 (3-4): 331-345.
- Hao, O.J., Phull, K.K. y Chen, J.M. (1994). Wet oxidation of TNT red water and bacterial toxicity of treated waste. *Water Res.* 28, 283-290
- Hao, O.J., Chen, J.M., Huang, L. y Buglass, R.L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26, 155-187.
- Hao, O.J. (2000). Metal effects on sulfur cycle bacteria and metal removal by sulfate reducing bacteria. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering.* Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). International Water Association. Londres, pp. 393-409.

- Hilton, M.G. y Archer, D.B. (1988). Anaerobic digestion of a sulfate-rich molasses wastewater: inhibition of hydrogen sulfide production. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 885-888.
- Hilton, M.G. y Oleszkiewicz, J.A. (1988). Sulfide induced inhibition of anaerobic digestion. *J. Environ. Eng.* 114, 1377-1391.
- Hoeks, F.M.J.M.M., Ten Hoopen, H.J.G., Roels, J.A. y Kuenen, J.G. (1984). Anaerobic treatment of acid water (methane production in a sulfate-rich environment). *Prog. Ind. Microbiol.* 20, 113-119.
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kroger, A., Dirmeier, R., Keller, M. y Stetter, K.O. (1998). Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *Fems Microbiol. Rev.* 22, 353-381
- Hulshoff Pol, L.W., van Lier, J.B. y Veenstra, S. (1995). Assignments: Implementation full-scale UASB reactor. *Memorias: International course on anaerobic waste water treatment.* Julio 17-28. Wageningen Agricultural University-IHE Delft. Wageningen, Holanda.
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P., Stams, A.J.M. and Lettinga, G. (1996). Perspectives for anaerobic treatment of sulfate-rich wastewaters. *Memorias: IV Seminario-Taller Latinoamericano. Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales.* Noviembre 19-22. Bucaramanga, Colombia
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P., Stams, A.J.M. and Lettinga, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewater: microbial and process technological aspects. *Biodegradation.* 9, 213-224.
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P., Weijma, J. and Stams, A.J.M. (2001). New developments in reactor and process technology for sulphate reduction. *Wat. Sci. Technol.* 44(8), 67-76.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S. y Verstraete, W. (1986a). Sulphate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Microbiological aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 580-587
- Isa, Z., Grusenmeyer, S. y Verstraete, W. (1986b). Sulphate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Technical aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 572-579.
- Janssen, A.J.H., Sleyster, R., van der Kaa, C., Jochemsen, A., Bontsema, J. y Lettinga, G. (1995). Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 47: 327-33.
- Janssen, A. (1996). Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogen sulphide. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- Janssen, A.J.H., Ma, S.C., Lens, P. y Lettinga, G. (1997). Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 32-40.
- Janssen, A.J.H., Meijer, S., Bontsema, J y Lettinga, G. (1988). Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 60, 147-155.

- Jensen, A.B. y Webb, C. (1995). Treatment of H₂S-containing gases: a review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Technol.* 17, 2-10.
- Kaksonen, A.H., Franzmann, P.D. y Puhakka, J. A. (2004). Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 332-343.
- Kaksonen, A.H., Franzmann, P.D. y Puhakka, J. (2003). Performance and ethanol oxidation kinetics of sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation* 14, 207-217.
- Karhadkar, P.P., Audic, J.M., Faup, G.M., Khanna, P. (1987). Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Wat. Res.* 21, 1061-1066.
- Kato, M.T., Field, J.A. y Lettinga, G. (1993a) Methanogenesis in granular sludge exposed to oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 317-324
- Kato, M.T., Field, J.A. y Lettinga, G. (1993b) High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1360-1366.
- Kelly, D.P. (1999). Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch. Microbiol.* 171, 219-229.
- Kim, B.W., Kim, E.H., Lee, S.C. y Chang, H.N. (1993). Model-based control of feed rate and illuminance in a photosynthetic fed-batch reactor for H₂S removal. *Bioprocess Eng.* 8, 263-269
- Kuenen, J.G. y Robertson, L.A. (1992). The use of natural bacterial populations for the treatment of sulfur containing wastewater. *Biodegradation* 3, 239-254
- Koster, I.W., Rinzema, A., de Vegt, A.L. y Lettinga, G. (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at different pH levels. *Wat. Res.* 12, 1561-1567.
- Kroiss, H., Plahl-Wabnegg, F. y Svardal, K. (1985). Anaerobic treatment of viscose wastewater. *Wat. Sci. Technol.* 17(1): 307-311.
- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1998a). Biotechnological treatment of sulfate rich wastewaters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 28(1), 41-88.
- Lens, P.N.L., van den Bosch, M., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1998b). The use of staged sludge bed reactors for the treatment of sulfate rich wastewaters. *Wat. Res.* 32, 1178-1192.
- Lens, P.N.L. y Kuenen, J.G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Wat. Sci. Tech.* 44(8), 57-66.
- Lens, P.N.L., Omil, F., Lema, J.M. y Hulshoff Pol L.W. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Eds.). International Water Association. Londres, pp.153-168.

- Levenspiel O. (1989). *The Chemical Reactor Omnibook*, OSU Book Stores, Corvallis, Oregon.
- Liu, Y. y Tay, J.H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Wat. Res.* 36, 1653-1665.
- Lomans, B.P., Pol, A. y Op den Camp, H.J.M. (2002). Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds in anoxic environments. *Wat. Sci. Tech.* 45(10):55-60
- Lovley, D.R. y Phillips, E.J.P. (1994). Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2394-2399.
- Lowry, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Maier, R.M. (2000) *Biogeochemical Cycling*. En: *Environmental Microbiology*. Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (Eds.). Academic Press. San Diego, California. Pp.319-345.
- Maillacheruvu, K.Y., Parkin, G.F., Peng, C.Y., Kuo, W.C., Oonge, Z.L. y Lebduchka, V. (1993). Sulfide toxicity in anaerobic systems fed sulfate and various organics. *Wat. Environ. Res.* 65, 100-109.
- Maree, J.P. y Hill, E. (1989). Biological removal of sulfate from industrial effluents and concomitant production of sulfur. *Wat. Sci. Tech.* 21, 256-276.
- Maree, J.P., Hulse, G., Dods, D. y Schutte, C.E. (1991). Pilot plant studies on biological sulfate removal from industrial effluent. *Wat. Sci. Tech.* 23, 1293-1300.
- McCartney, D.M. y Oleszkiewicz, J.A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Wat. Res.* 25, 203-209.
- McCartney, D.M. y Oleszkiewicz, J.A. (1993). Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD:sulfate ratio and acclimation. *Wat. Environ. Res.* 65, 655-644.
- McComas, C., Sublette, K., Jenneman, G. y Bala, G. (2001). Characterization of a novel bioatalyst system for sulfide oxidtion. *Biotechnol. Prog.* 17, 439-446
- Méndez, R., Ten-Brummeler E. y Hulshoff Pol, L.W. (1989). Start up of UASB reactors treating sucrose-containing substrates with a low COD/sulfate ratio. *Environ. Technol. Lett.* 10, 83-90.
- Méndez, R., Lema, J.M. y Soto, M. (1995). Treatment of seafood-processing wastewaters in mesophilic and thermophilic anaerobic filters. *Wat. Environ. Res.* 67, 33-45.
- Meraz, M., Monroy, O., Noyola, A. e Ilangovan, K. (1995). Studies on the dynamics of immobilization of anaerobic bacteria on plastic support. *Wat. Sci. Tech.* 32(8), 243-250.
- Middelburg, J. (2000). The geochemical sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). International Water Asociation. Londres, pp.33-46.

- Nielsen, A.H., Vollertsen, J. And Hvited-Jacobsen, T. (2003). Determination kinetics and stoichiometry of chemical sulfide oxidation in wastewater of sewer networks. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3853-3858.
- O'Flaherty, V., Mahony, T., O'Kennedy, R. y Colleran, E. (1998a). Effect of pH on growth kinetics and sulfide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulfate-reducing bacteria. *Process Biochem.* 33(5): 555-569.
- O'Flaherty, V., Lens, P., Leahy, B. y Colleran, E. (1998b). Long term competition between sulfate- reducing and methane-producing bacteria during the full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. *Wat. Res.* 32(3): 815-825
- O'Flaherty, V. y Colleran, E. (2000). Sulfur problems in anaerobic digestion. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Eds.). International Water Association. Londres, pp. 467-489.
- Okabe, S., Nielsen, P.H. y Characklis, W.G. (1992). Factors effecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotech. Bioeng.* 40, 725-734.
- Okabe, S., Nielsen, P.H., Jones, W.L. y Characklis, W.G. (1995). Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Res.* 29, 571-578.
- Oleszkiewicz, J.A., Marsteller, T., McCartney, D.M. (1989). Effects of pH on sulphide toxicity to anaerobic processes. *Environ. Technol. Lett.* 10, 815-822.
- Olmos, A., Olguín, P., Fajardo, C., Razo, E. y Monroy, O. (2004). Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour waters from mexican oil refineries. *Energy & Fuels*, 18, 302-304.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L. y Lettinga, G. (1996). Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* 31, 699-710.
- Omil, F., Bakker, C.D., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1997a). Effect of pH and low temperature shocks on the competition between sulphate reducing bacteria and methane producing bacteria in UASB reactors. *Environ. Technol.* 18, 255-264.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1997b). Characterization of biomass from a sulfidogenic, volatile fatty acid-degrading granular sludge reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 229-236.
- Omil, F, Lens, P., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1998). Long term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotech. Bioeng.* 57, 676-685.
- Ongcharit, C., Sublette, K. y Shah, Y. (1991). Oxidation of hydrogen sulfide by flocculated *Thiobacillus denitrificans* in a continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 497-504.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Visser, A., Hulsoff Pol, L.W. y Stams A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 119-136.

- Overmeire, A., Lens, P. y Verstraete, W. (1994). Mass transfer limitation of sulphate in methanogenic aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 387-391
- Parkin, G.F., Sneve, M.A. y Loos, H. (1991) Anaerobic filter treatment of sulfate containing wastewaters. *Wat. Sci. Technol.* 23(7-9), 1283-1291
- Polprasert, C. y Haas, C.N. (1995). Effect of sulfate on anaerobic processes fed with dual substrates. *Wat. Sci. Tech.* 31, 101-107.
- Razo-Flores, E., Donlon, B.A., Lettinga, G. y Field, J. (1997). Complete biodegradation of the azo dye Azodisalicylate under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2098-2103.
- Reis, M.A.M., Almeida, J.S., Lemos, P.C. y Carrondo, M.J.T. (1992). Effect of hydrogen sulfide on the growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 593-600.
- Revah, S., Acosta, M., Hugler, W., Trinidad, R., Avila, C., Estrada, I., Hinojosa, A. (1995). Air biodesulfurization from viscose plants: carbon disulfide elimination. Conference on Biofiltration (an Air Pollution Control Technology). Octubre 5-6, Los Angeles, California. U.S.A.
- Rinzema, A. y Lettinga, G. (1988). Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. En: *Biotreatment systems, Vol. III*, pp.65-109. (Wise, D.L., ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, U.S.A.
- Robertson, L.A. y Kuenen, J.G. (1992). The colorless sulfur bacteria. En: *The prokariotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.* (Barlows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schliefer, H.K., eds.) Segunda edición. Springer Verlag, New York. Vol. 1, Pp. 385-413.
- Särner, E. (1990). Removal of sulfate and sulfite in an anaerobic trickling (ANTRIC) filter. *Wat. Sci. Tech.* 22(1/2), 395-404.
- Shin, H.S., Jung, J.Y., Bac, B.U. y Paik, B.C. (1995). Phase separated anaerobic toxicity assays for sulfate and sulfide. *Wat. Environ. Res.* 67, 802-806.
- Shin, H.S., Oh, S.E. y Bae, B.U. (1996). Competition between SRB and MPB according to temperature change in the anaerobic treatment of tannery wastes containing high sulfate. *Environ. Technol.* 17, 361-370.
- Sheeren, P.J.H., Koch, R.O., Buisman, C.J.N., Barnes, L.J. y Versteegh, J.H. (1991). New biological treatment plant for heavy metal contaminated groundwater. *Trans. Instn. Min. Metall. (Sect. C: Mineral Process)* 101, C190-C199.
- Smet, E., Lens, P. y van Langenhove, H. (1998). Treatment of waste gases contaminated with odorous sulfur compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 28(1), 89-117.
- Soto, M., Mendez, R. y Lema, J.M. (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity systems. theoretical basis and experimental set up. *Wat. Res.* 27, 1361-1376.
- Speece, R.E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 17, 416A-427A.

- Stefess, G., Torremans, A., Schrijver, R., Robertson, L. y Kuenen, J. (1996). Quantitative measurement of sulphur formation by steady-state and transient state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 169-175.
- Stetter, K.O. y Gaag, G. (1983). Reduction of molecular sulfur by methanogenic bacteria. *Nature.* 305, 309-311.
- 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. Londres, pp.1-31.
- Steudel, R. (1998). Sulfur chemistry: Speciation, natural occurrence, redox reactions and colloidal aspects. En: *Sulfur Cycle: Environmental Science and Technology. Memorias del curso de verano. Abril 19-24.* Wageningen Agricultural University. Wageningen, Holanda.
- Stucki, G., Hanselmann, K.W. Hürzeler, A. (1993). Biological sulfuric acid transformation: reactor design and process optimization. *Biotech. Bioeng.* 41, 303-315.
- Subblette, K.L. y Sylvester, N.D. (1987a). Oxidation of hydrogen sulfide by continuous cultures of *Thiobacillus denitrificans*. *Biotech. Bioeng.* 29, 753-758.
- Subblette, K.L. y Sylvester, N.D. (1987b). Oxidation of hydrogen sulfide by mixed cultures of *Thiobacillus denitrificans* and heterotrophs. *Biotech. Bioeng.* 29, 759-761.
- Suzuki, I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45, 97-105.
- Svardal, K., Gotzendorfer, K., Nowak, O. y Kroiss, H. (1993). Treatment of citric acid wastewater for high quality effluent on the anaerobic-aerobic route. *Wat. Sci. Technol.* 28, 177-186.
- Takahashi, M. y Kyosai, S. (1991). Pilot plant study on microaerobic self-granulated sludge process (multi-stage reversing-flow bioreactor: MRB). *Wat. Sci. Tech.* 23, 973-980.
- Tan, N.C.G., Lettinga, G. y Field, J.A. (1999). Reduction of the azo dye Mordant Orange 1 by methanogenic granular sludge exposed to oxygen. *Biores. Technol.* 67, 35-42.
- Tanimoto, Y., Tasaki, M., Okamura, K., Yamaguchi, M. y Minami, K. (1989). Screening growth inhibitors of sulfate-reducing bacteria and their effects on methane fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 68, 353-359.
- Tarvin, D. y Buswell, A.M. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 1751-1755.
- Uberoi, V. y Battacharya, S.K. (1995). Interactions among sulfate reducers, acetogens, and methanogens in anaerobic propionate systems. *Water Environ. Res.* 67, 330-339.
- van den Ende, F.P., Meier, J. and van Gemerden, H. (1997). Syntrophic growth of sulphate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 65-80.

- van Houten, R.T., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1994). Biological sulfate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. *Biotech. Bioeng.* 44, 586-594.
- van Houten, R.T., van der Spoel, H., van Aelst, A.C., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1996). Biological sulphate reduction using synthesis gas as energy and carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* 50:136-144.
- van Lier, J.B., Tilche, A., Ahring, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M. y Hulshoff Pol, L.W. (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Wat. Sci. Technol.* 43(1), 1-18.
- Velasco, J.A. (2001). Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación biológica del tiosulfato en azufre elemental. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Visser, A., Beeksmá, I., van der Zee, F., Stams, A.J.M. y Lettinga, G. (1993a). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 549-556.
- Visser, A., Gao, Y. y Lettinga, G. (1993b). Effects of short-term temperature increases on the mesophilic anaerobic breakdown of sulfate containing synthetic wastewater. *Wat. Res.* 27, 541-550.
- Visser, A., Alpheenar, P.A., Gao, Y., van Rossum, G. y Lettinga, G. (1993c). Granulation and immobilisation of methanogenic and sulfate-reducing bacteria in high rate anaerobic reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 575-581.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate-containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Wat. Sci. Technol.* 33(3), 99-110.
- Visser, J.M., Robertson, L.A. van Verseveld, H.W. y Kuenen, J.G. (1997a). Sulphur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2300-2305.
- Visser, J.M., Stefess, G.C., Robertson, L.A. y Kuenen, J.G. (1997b). *Thiobacillus* sp. W5, the dominant autotrophy oxidizing sulfide to sulfur in a reactor for aerobic treatment of sulfidic wastes. *Antonie-van-Leeuwenhoek.* 72, 127-134.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur reducing bacteria. En *Biology of Anaerobic Microorganisms* (ed. A.J.B. Zehnder), pp.469-586, John Wiley and Sons, New York.

- Widdel, F. y Hansen, T.A. (1992). The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. En: The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Prokaryotes. (Barlows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schliefer, H.K., eds.) Segunda edición, Springer Verlag, New York. Vol. 1, pp. 583-624.
- Yadav, V.K. y Archer, D.B. (1989). Sodium molybdate inhibits sulphate reduction in the anaerobic treatment of high sulphate molasses wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 103-106.
- Yang, Y. y Allen, E. (1994). Biofiltration control of hydrogen sulfide I. Design and operational parameters. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 44, 863-868.
- Yoda, M., Kitagawa, M. y Miyayii, Y. (1987). Long term competition between sulfate reducing and methane producing bacteria in anaerobic biofilm. *Wat. Res.* 21, 1547-1556
- Zitomer, D.H. and Shrout, J.D. (2000). High-sulfate, high-chemical oxygen demand wastewater treatment using aerated methanogenic fluidized beds. *Water Environ. Res.* 72, 90-97.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00005

BIOELIMINACION DE OXIDOS DE AZUPRE DE EFLUENTES.

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 16 del mes de diciembre del año 2004 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO REVAH MOISEEV
 DRA. PATRICIA OLGUIN LORA
 DR. GERMAN BUITRON MENDEZ
 DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
 DE: MARÍA DE LOURDES BERENICE CELIS GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
 DIRECCIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES



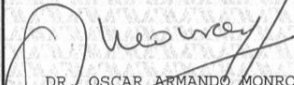
MARÍA DE LOURDES BERENICE CELIS GARCIA
 FIRMA DE LA ALUMNA

REVISÓ



LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT
 DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO

PRESIDENTE



DR. SERGIO REVAH MOISEEV

VOCAL




DRA. PATRICIA OLGUIN LORA

VOCAL



DR. GERMAN BUITRON MENDEZ

SECRETARIA



DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES