



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**CONVERSIÓN DE SULFATO A AZUFRE ELEMENTAL EN UN  
REACTOR DE LECHO FLUIDIFICADO INVERSO BAJO  
CONDICIONES DE LIMITACIÓN DE OXÍGENO DISUELT**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Biotecnología**

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

**GEHOVANA GONZÁLEZ BLANCO**

**COMITE TUTORIAL**

**DIRECTORA: Dra. MONICA ALICIA MERAZ RODRIGUEZ**

**ASESORES: Dra. MARIA DE LOURDES BERENICE CELIS GARCIA**

**Dr. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales y Microbiología Ambiental W-106, del Grupo de Ciencia y Tecnología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Fue financiado a través de la beca número 181018 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Iztapalapa, D. F., a 12 de febrero del 2007

El Honorable Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, **aprobó** la tesis

**CONVERSIÓN DE SULFATO A AZUFRE ELEMENTAL EN UN REACTOR DE LECHO FLUIDIFICADO INVERSO BAJO CONDICIONES DE LIMITACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO**

Que presentó

**Gehovana González Blanco**

**Comité Tutorial**

Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez  
Directora, UAM-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García  
Asesora, IPICyT-S.L.P.

\_\_\_\_\_

Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo  
Asesor, UAM-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

**Honorable Jurado**

Dra. Florina Ramirez Vives  
Presidente, UAM-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

Dra. Anne Claire Texier Valentin  
Secretaria, UAM-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García  
Vocal, IPICyT-S.L.P.

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

*El tiempo es el mejor autor;  
siempre encuentra un final perfecto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Una tesis, siempre es el resultado sinérgico de esfuerzos individuales, institucionales y comunitarios. Una página no alcanzaría para citar y agradecer a todos los que directa o indirectamente contribuyeron para obtener los resultados que a continuación se presentan, sin embargo, y corriendo el riesgo de caer en omisiones, se referencia a continuación a los pilares de esta investigación.

A mi directora de tesis, Dra. Mónica Meraz por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, fundamental para la realización de este trabajo.

A la Dra. Lourdes Celis, por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de esta tesis.

Al Dr. Oscar Monroy, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

Al Jurado evaluador, Dra. Lourdes Celis, Dra. Florina Ramirez, Dra. Anne-Claire Texier y el Dr. Germán Buitrón; por la detallada revisión y enriquecimiento de esta tesis. Espero no haber omitido ninguno de sus comentarios.

Mi más sincero agradecimiento a la Mtra. Carmen Fajardo por introducirme y auxiliarme siempre en el uso y manejo de los equipos del laboratorio analítico.

A mis amigos y maestros: Paty, Xitlalli, Nancy, Itzamna, Ruth, Ángeles, Javier, Sergio, Ulises García, Juan Carlos Maya, Ricardo Huizache, Juan Carlos Peña, Joe y Ulises Duran. Gracias por su experiencia compartida, por las discusiones fuera y dentro del laboratorio, por los momentos de sano esparcimiento que aminoraron las dificultades con las cuales me pude enfrentar.

A MIS AMADOS PADRES

*Gloria Blanco y José Luis González Frías*

A MIS HERMANOS,  
QUIENES SON MIS MEJORES AMIGOS

*Alejandra, Néstor, Gerardo, Angélica y Alma Rosa*

Y POR SUPUESTO A TI  
AMIGO, COMPLICE, CONFIDENTE  
Y AMADO ESPOSO

*Ricardo Beristain Cardoso*

# CONTENIDO

Índice de Tablas .....	I
Índice de Figuras .....	II
Notación .....	III
Resumen .....	IV
Abstract .....	VI
<b>1. Introducción</b>	
1.1 Química de los compuestos azufrados .....	1
1.2 Ciclo biológico del azufre .....	3
1.3 Reducción biológica del sulfato .....	5
1.3.1 Fisiología de las bacterias sulfato reductoras .....	5
1.3.2 Proceso respiratorio de las bacterias sulfato reductoras .....	8
1.3.3 Efecto del sulfuro sobre las bacterias sulfato reductoras .....	10
1.4 Oxidación biológica del sulfuro .....	12
1.4.1 Fisiología de las bacterias sulfuro oxidantes .....	12
1.4.2 Proceso respiratorio de las bacterias sulfuro oxidantes .....	14
1.4.3 Inhibición de bacterias sulfuro oxidantes por compuestos azufrados .....	15
<b>2. Antecedentes</b>	
2.1 Sistemas biológicos para la remoción de compuestos azufrados .....	17
2.1.1 Eliminación de sulfato .....	18
2.1.2 Eliminación de sulfuro .....	20
2.2 Sistemas de biopelícula .....	23
2.3 Crecimiento sintrófico de bacterias sulfato reductoras y bacterias sulfuro oxidantes .....	26
<b>3. Justificación</b> .....	28
<b>4. Hipótesis</b> .....	30
<b>5. Objetivos</b>	

5.1 Objetivo General .....	30
5.2 Objetivos Particulares .....	31
<b>6. Materiales y Métodos</b>	
6.1 Materiales .....	32
6.1.1 Reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) .....	32
6.1.2 Inóculo .....	32
6.1.3 Medio de cultivo .....	32
6.1.4 Inmovilización de la biopelícula .....	34
6.1.5 Operación en continuo del RLFI .....	34
6.1.6 Actividad específica bajo condiciones anaerobias .....	35
6.1.7 Actividad específica sulfuro oxidante (Respirometría) .....	36
6.1.8 Velocidad de consumo de oxígeno ( $q_{O_2X}$ ) .....	37
6.2 Métodos de análisis .....	38
6.2.1 Cuantificación de sulfato, tiosulfato y lactato .....	38
6.2.2 Cuantificación de ácidos grasos volátiles .....	39
6.2.3 Cuantificación de azufre elemental .....	40
6.2.4 Determinación de sulfuro por yodometría .....	41
6.2.5 Determinación de carbono inorgánico .....	42
6.2.6 Detección de oxígeno disuelto .....	42
6.2.7 Determinación de sólidos suspendidos volátiles .....	43
6.2.8 Determinación de biomasa inmovilizada .....	44
6.2.9 Determinación de proteína soluble .....	45
6.2.10 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	45
6.3 Cálculos de los parámetros de operación .....	46
6.3.1 Parámetros de operación .....	46
6.3.2 Cálculo del equivalente teórico de DQO .....	47
6.3.3 Cálculo de las actividades específicas .....	48
6.3.4 Cálculos para la alimentación del flujo de aire .....	49

6.3.5 Cálculo del $k_La$ .....	50
6.3.6 Cálculos de oxidación-reducción .....	54
<b>7. Resultados y Discusión</b>	
7.1 Inmovilización del consorcio bacteriano en el RLFI .....	55
7.1.1 Seguimiento de la inmovilización por microscopía electrónica de barrido .....	57
7.1.2 Actividades específicas durante la inmovilización .....	59
7.2 Operación en continuo del reactor de lecho fluidificado inverso .....	62
7.2.1 Determinación del $k_La$ en el RLFI .....	73
7.2.2 Actividades específicas durante la operación en continuo del RLFI .....	74
<b>8. Conclusiones</b> .....	79
<b>9. Recomendaciones</b> .....	81
<b>10. Bibliografía</b> .....	82

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Estados de oxidación de compuestos azufrados .....	1
<b>Tabla 1.2</b> Donadores de electrones usados para la reducción del sulfato .....	5
<b>Tabla 1.3</b> Características importantes en la clasificación de géneros bacterianos con capacidad sulfato reductora .....	6
<b>Tabla 1.4</b> Reacciones metabólicas de las bacterias sulfato reductoras y sus cambios de energía libre de Gibbs .....	7
<b>Tabla 1.5</b> Valores de $CI_{50}$ para las bacterias sulfato reductoras en lodos anaerobios	11
<b>Tabla 1.6</b> Características de algunas bacterias oxidantes del azufre .....	13
<b>Tabla 2.1</b> Procesos que generan corrientes que contienen compuestos azufrados ..	17
<b>Tabla 2.2</b> Tipo de reactores usados para el tratamiento anaerobio de aguas residuales ricas en sulfato y materia orgánica .....	19
<b>Tabla 2.3</b> Concentraciones de sulfuro que causan el 50% de inhibición de la actividad metanogénica .....	20
<b>Tabla 3.1</b> Niveles de toxicidad del $H_2S$ y su efecto a la salud .....	29
<b>Tabla 6.1</b> Medio mineral .....	33
<b>Tabla 6.2</b> Condiciones de operación para las etapas de inmovilización, I, II y III del RLFÍ .....	33
<b>Tabla 7.1</b> Balance de azufre para las diferentes velocidades de carga de sulfato en el RLFÍ .....	65
<b>Tabla 7.2</b> Balance de carbono para las diferentes velocidades de carga de lactato en el RLFÍ .....	67
<b>Tabla 7.3</b> Reacciones metabólicas propuestas .....	68
<b>Tabla 7.4</b> Reacciones parciales de oxidación-reducción .....	69
<b>Tabla 7.5</b> Datos obtenidos durante el estado estacionario en el reactor LFI alimentado con sulfato y lactato .....	70
<b>Tabla 7.6</b> Valores de $k_La$ obtenidos con los diferentes flujos de aire aplicados al reactor .....	73
<b>Tabla 7.7</b> Diferentes sistemas biológicos quimiótrofos para la oxidación de sulfuro ..	78

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Esquema del ciclo biológico del azufre .....	4
<b>Figura 1.2</b> Esquema de la posible ruta bioquímica de la sulfato reducción .....	9
<b>Figura 1.3</b> Representación esquemática de la transferencia de electrones de la cadena respiratoria en <i>Desulfovibrio</i> , con lactato como fuente de energía y sulfato como aceptor final de electrones .....	10
<b>Figura 1.4</b> Escala de oxidación-reducción y transporte de electrones quimiolitotrófico en bacterias sulfuro oxidantes .....	15
<b>Figura 6.1</b> Diagrama del reactor de lecho fluidificado inverso operado en lote y en continuo .....	35
<b>Figura 6.2</b> Evolución típica de la concentración de oxígeno disuelto por el método dinámico para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y de la velocidad de consumo de oxígeno .....	50
<b>Figura 7.1</b> Concentración de sulfato S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> alimentado, perfiles de concentración de biomasa y producción de azufre elemental .....	56
<b>Figura 7.2</b> Micrografías de la biopelícula formada durante la inmovilización .....	58
<b>Figura 7.3</b> Evolución de consumo de concentraciones de sulfato, lactato y producción acetato .....	60
<b>Figura 7.4</b> Consumo de oxígeno cuantificado por respirometría con biopelícula activa y biopelícula esterilizada y perfil de consumo de sulfuro .....	61
<b>Figura 7.5</b> Velocidad de carga de sulfato, formación de azufre elemental, sulfuro, tiosulfato, sulfato residual y azufre total efluente .....	64
<b>Figura 7.6</b> Velocidad de carga de lactato, formación de acetato, propionato, butirato, lactato residual, bicarbonato y carbono total efluente .....	64
<b>Figura 7.7</b> Eficiencia de remoción de sulfato, DQO y recuperación de S <sup>0</sup> en las tres etapas .....	66
<b>Figura 7.8</b> Balance de electrones sobre el RLFI .....	72
<b>Figura 7.9</b> Actividades máximas específicas en las diferentes etapas de operación del RLFI .....	75
<b>Figura 7.10</b> Sólidos volátiles inmovilizados en las diferentes etapas de operación en continuo del RLFI .....	76
<b>Figura 7.11</b> Micrografías al final de cada etapa de operación en continuo del RLFI ..	77

## NOTACIÓN

<b>AESR</b>	Actividad específica sulfato reductora
<b>AESO</b>	Actividad específica sulfuro oxidante
<b>AME</b>	Actividad metanogénica específica
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>BM</b>	Bacterias metanogénicas
<b>BSO</b>	Bacterias sulfuro oxidantes
<b>BSR</b>	Bacterias sulfato reductoras
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibidor que reduce la actividad microbiana en 50%
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Relación másica entre la DQO y el sulfato
<b>Ef<sub>c</sub></b>	Eficiencia de consumo
<b>k<sub>L</sub>a</b>	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>meq e<sup>-</sup></b>	Miliequivalentes de electrones
<b>OD</b>	Oxígeno disuelto
<b>O<sub>2</sub>/HS<sup>-</sup></b>	Relación molar entre el oxígeno y el sulfuro consumidos
<b>qO<sub>2</sub></b>	Demanda específica de consumo de oxígeno
<b>Qv</b>	Velocidad de carga
<b>RLFI</b>	Reactor de lecho fluidificado inverso
<b>S<sup>0</sup></b>	Azufre elemental
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles
<b>SVI</b>	Sólidos volátiles inmovilizados
<b>TRH</b>	Tiempo de residencia hidráulica
<b>UASB</b>	Upflow anaerobic sludge blanket (lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente)

**González Blanco, G. Conversión de sulfato a azufre elemental en un reactor de lecho fluidificado inverso bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto. Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa.**

**Resumen**

En corrientes de aguas residuales provenientes de industrias que utilizan ácido sulfúrico en sus procesos se encuentran altas concentraciones de compuestos oxidados del azufre. La aplicación de tecnologías anaerobias a estas aguas residuales ha sido problemática debido a la producción de sulfuro por acción de bacterias sulfato reductoras (BSR). La liberación de sulfuro es indeseable debido a su olor, toxicidad y propiedades corrosivas. Actualmente existen biotecnologías que implican la reducción biológica de sulfato a sulfuro y su subsiguiente oxidación del sulfuro a azufre elemental ( $S^0$ ) en condiciones limitadas de oxígeno por medio de bacterias sulfuro oxidantes (BSO) en sistemas espacialmente separados.

En este trabajo se propuso y se estudió un proceso biológico con limitación de oxígeno que permitiera el desarrollo de BSR y BSO en un solo sistema, donde las BSO utilizarían los productos de degradación de las BSR (sulfuro y  $CO_2$ ) para la formación de  $S^0$ , usando un reactor de lecho fluidizado inverso (RLFI) que por sus características hidrodinámicas permitiría la recuperación del  $S^0$  en continuo.

La biopelícula se obtuvo al operar el RLFI en lote por un periodo aproximado de 55 días, utilizando como material de soporte polietileno con una densidad aparente de  $400 \text{ kg m}^{-3}$ . Las condiciones de operación fueron: velocidad descendencial del líquido de  $6.4 \text{ m h}^{-1}$ , flujo de aire de  $3.5 \text{ L min}^{-1}$ , temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , tiempo de retención hidráulica de 1 día y medio mineral con  $40.6 \text{ mM}$  de sulfato y  $33.7 \text{ mM}$  de lactato a una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.76. La formación de la biopelícula fue seguida a través de observaciones por microscopía electrónica de barrido y cuantificada como sólidos volátiles inmovilizados (SVI) por volumen de soporte seco. Después de 28 días de operación del RLFI en lote se alcanzó la mayor concentración de biomasa inmovilizada ( $2.4 \text{ kg SVI m}^{-3}$ ) y el estado estacionario de la formación de la misma. La producción de  $S^0$  al final de la inmovilización fue de  $18.7 \text{ mM } S^0$ , que corresponde a una transformación del 50% del  $SO_4^{2-}$  alimentado. La biopelícula mostró una actividad específica sulfato reductora (AESR) de  $79.50 \text{ mmol } SO_4^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y una actividad específica sulfuro oxidante (AESO) de  $30.76 \text{ mmol } HS^- \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y no mostró actividad metanogénica. Por otro lado, se realizó un estudio sobre la aportación de la oxidación química del  $S^{2-}$  en el proceso biológico, observando que la oxidación biológica del  $S^{2-}$  fue 70% más rápida con respecto a la velocidad de oxidación química, por lo que el sulfuro producido por las BSR fue oxidado principalmente por acción biológica.

Después de haberse obtenido la biopelícula con actividad sulfato reductora y sulfuro oxidante, el RLFI fue operado en continuo por 91 días, en tres etapas, a una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.66 y aumentando las velocidades de carga ( $Bv$ ) de sulfato, lactato y oxígeno de forma estequiométrica para cada etapa evaluada. En la etapa I, la velocidad de carga de  $SO_4^{2-}$ , lactato y oxígeno fue de  $40.6$ ,  $27.2$  y  $20.64 \text{ mM d}^{-1}$  respectivamente, la eficiencia de consumo ( $\%Efc$ ) de  $SO_4^{2-}$  fue de 75% con una recuperación de  $S^0$  de 52%. El sulfuro residual fue de  $2.6 \text{ mM d}^{-1}$ .

En la etapa II ( $63.64 \text{ mM } SO_4^{2-} \text{ d}^{-1}$ ,  $43.9 \text{ mM}$  lactato  $\text{d}^{-1}$  y  $31.68 \text{ mM } O_2 \text{ d}^{-1}$ ) los compuestos azufrados no presentaron cambios significativos en términos de consumo, transformación y recuperación de  $S^0$  con respecto a la etapa I. En la etapa III ( $92.47 \text{ mM } SO_4^{2-} \text{ d}^{-1}$ ,  $62.1 \text{ mM}$  lactato  $\text{d}^{-1}$  y  $46.56 \text{ mM } O_2 \text{ d}^{-1}$ ) la  $\%Efc$  de  $SO_4^{2-}$  fue de 72%, con un decremento en la recuperación de  $S^0$  (30%) y un incremento en la concentración de  $S^{2-}$  residual, siendo 6.4 veces mayor comparada con la etapa I. Respecto a la fuente carbonada, el lactato sólo fue parcialmente oxidado a acetato por el proceso sulfato reductor y parte del acetato residual fue fermentado a propionato. Por lo que el lactato no actuó como el principal donador de electrones. Lo anterior sugirió que el  $S^0$  formado pudo ser utilizado como donador alternativo de electrones y se ciclaba dentro del sistema. La AESR no presentó cambios significativos durante las tres etapas. Sin embargo, la AESO disminuyó al aumentar las velocidades de carga en el sistema. Esto se atribuyó a una pérdida de biomasa en la biopelícula debido a un efecto de fricción entre las partículas por el incremento en el flujo de aire, que provocó problemas de espumado y la compactación del lecho, lo que limitó la transferencia de oxígeno. Esta limitación generó que la concentración de sulfuro incrementara en el sistema y que probablemente tuviera un efecto inhibitorio sobre las BSO principalmente. Esto indicaría que esta población fue más susceptible a los cambios de velocidad de carga en el reactor que las BSR.

Los resultados mostraron que en la operación en lote la concentración de oxígeno, así como el régimen hidrodinámico del RLFI, permitieron la inmovilización de BSR tolerantes al oxígeno y de BSO que secretan el azufre elemental. Además de que se llevó a cabo la transformación del sulfato en azufre elemental de manera continua, disminuyendo así, el contenido total de azufre soluble en el agua residual. Por lo tanto, el proceso biológico alcanzado en el RLFI podría ser una biotecnología atractiva para la eliminación de compuestos azufrados y competir exitosamente con los sistemas reportados en la literatura.

**González Blanco, G. Sulfate conversion to elemental sulfur under limitation of dissolved oxygen using an inverse fluidized bed reactor. Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa.**

**Abstract**

The wastewaters coming from industries which produce sulfuric acid have high concentration of oxidized sulfurous compounds. Anaerobic technologies applied to this wastewater have been a problem due to the sulfide production from sulfate reducing bacteria (SRB). The sulfide is corrosive, malodorous, toxic, and exerts an oxygen demand. Nowadays, there are biotechnologies which imply a sulfate reduction process to produce sulfide and subsequently the sulfide is converted to elemental sulfur ( $S^0$ ) under limitation of oxygen through sulfide oxidizing bacteria (SOB) in other reactor.

In the present research, a biofilm formation under limitation of oxygen was promoted formed by sulfate reducing and sulfide oxidizing bacteria in a single reactor. The sulfide and  $CO_2$  produced from sulphate reduction by sulfide reducing bacteria was subsequent converted to elemental sulphur through biological oxidation by sulfide oxidizing bacteria and separated in a continuous process using an inverse fluidized bed reactor (IFBR).

The biofilm formation on a plastic support for the elimination of sulphurous compounds was achieved within 55 days of batch operation. Fine particles (0.59 mm mean diameter) of low-density polyethylene were used as carrier media. The reactor was operated at a down-flow superficial liquid rate of  $6.4 \text{ m h}^{-1}$ , air flow of  $3.5 \text{ L d}^{-1}$ , HRT of 1 day and  $30^\circ\text{C}$ . The mineral medium was supplemented with 40.6 mM of sulphate and 33.7 mM of lactate, having a  $DQO/SO_4^{2-}$  ratio of 0.76. Biofilm formation was followed by scan electronic microscopic observations and quantified as immobilized volatile solids per volume of dry support ( $\text{kg IVS m}^{-3}$ ), which after 28 days of batch operation attained  $2.4 \text{ kg IVS m}^{-3}$  reaching the steady state. The elemental sulphur production rate was of  $2.49 \text{ mM d}^{-1}$ , recovering 18.7 mM of elemental sulfur at the end of the immobilization, which represented 50% of sulphate feed. The biofilm developed in the reactor showed a sulphate reducing activity of  $79.50 \text{ mmol } SO_4^{2-} \text{ g IVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  and a sulfide oxidizing activity of  $30.76 \text{ mmol } HS^- \text{ g IVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Methanogenic activity was not observed. The biological oxidation rate of sulfide was 70% faster with regard to the chemical oxidation rate, indicating that the biological oxidation is the main metabolic pathway that carries out the elimination of sulfide produced by the sulfate reducing bacteria.

After the biofilm formation the IFBR was operated in continuous during 91 days in three stages with a  $DQO/SO_4^{2-}$  ratio of 0.66 and increasing the loading rate ( $Q_v$ ) of sulfate, lactate and oxygen stoichiometrically for each evaluated stage. In stage I, the loading rate for sulfate, lactate and oxygen was of 40.6, 27.2 and 20.64  $\text{mM d}^{-1}$ , respectively, the efficiency of sulfate consumption reached was of 75% with an  $S^0$  recuperation of 52%. The residual sulfide was of  $2.6 \text{ mM d}^{-1}$ . In stage II ( $63.64 \text{ mM } SO_4^{2-} \text{ d}^{-1}$ ,  $43.9 \text{ mM lactate d}^{-1}$  and  $31.68 \text{ mM } O_2 \text{ d}^{-1}$ ) the sulfurous compounds in the influent and effluent did not show significant changes with regard to stage I. In stage III ( $92.47 \text{ mM } SO_4^{2-} \text{ d}^{-1}$ ,  $62.1 \text{ mM lactate d}^{-1}$  and  $46.56 \text{ mM } O_2 \text{ d}^{-1}$ ) the sulfate consumption efficiency was of 72% and a decreasing in  $S^0$  was observed from 55 to 30%. The sulfide concentration in the effluent increased 6.4 times higher than in stage I. The carbon source for all stages was only partially oxidized to acetate under sulfate reduction conditions and some fraction of residual acetate was fermented to propionate. The lactate was not the main electron donor, indicating that  $S^0$  also could be used as an alternative electron donor, which was cycling in the system. The sulfate reducing activity along three stages did not present significantly changes. However, the sulfide oxidizing activities suffered a diminution when the loading rates were increased. The decrease on sulfide oxidizing activities was due to biomass loss due to attrition between particles by the increase in air flow that caused foaming problems and compacted the bed that limited the oxygen transference increasing the sulfide concentration in the system causing an inhibitory effect on SOB, that were more susceptible to the changes made inside the IFBR in regard the SRB.

The results obtained showed that oxygen limitation conditions into the reactor, allowed the immobilization of a mixed culture of aerobic and anaerobic bacteria, besides promoting the formation of  $S^0$ . Also the possibility of eliminating sulfate in form of  $S^0$  was shown diminishing the total content of sulfide and sulfate in the residual water. The biological process coupled in the IFBR is a feasible technology for sulfurous compounds elimination. The elemental sulfur recuperation in this system might compete successfully with other systems reported in the literature



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Química de los compuestos de azufre

La química del azufre es sumamente compleja debido a los diferentes estados de oxidación que presentan los compuestos inorgánicos del azufre en la naturaleza: sulfuro de hidrógeno, azufre elemental, tiosulfato, tetrionato, sulfito y sulfato (Tabla 1.1). Algunas de sus transformaciones ocurren químicamente o por procesos biológicos. El grupo sulfhidrilo es la forma del azufre asociada a la producción de compuestos orgánicos, en tanto que el sulfuro de hidrógeno es el compuesto más reducido mientras que el sulfato el más oxidado

**Tabla 1.1** Estados de oxidación de compuestos azufrados modificado de Brüser *et al.*, (2000).

Compuesto		Estado de oxidación del azufre
Grupo sulfhidrilo	R-SH	-2
Sulfuro	H <sub>2</sub> S, HS <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup>	-2
Polisulfuros	-S(S <sub>n</sub> )S-	-1 (S terminal) / 0 (S interno)
Tiosulfato	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-1 (S sulfano) / +5 (S sulfona)
Politionatos	-O <sub>3</sub> S(S) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0 (S interno) / +5 (S sulfona)
Azufre elemental	Anillos S <sub>n</sub> (S <sup>0</sup> )	0
Sulfito	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+4
Bisulfito	HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+4
Sulfato	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	+6

El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) es tóxico, inflamable, corrosivo y muy soluble en agua (aproximadamente 0.1 M a 25 °C) con un pKa<sub>1</sub> alrededor de 7 y un pKa<sub>2</sub> de 13 (Suzuki, 1999). La forma en que el sulfuro está presente en el ambiente se relaciona

con el pH, ya que a pH mayor que 8 la forma dominante es el ion sulfuro ( $S^{2-}$ ), a pH neutro existe un equilibrio entre la forma no ionizada de sulfuro ( $H_2S$ ) y ion sulfuro de hidrógeno ( $HS^-$ ), y por debajo de pH 6 la principal especie es el  $H_2S$  que se volatiliza fácilmente. El  $HS^-$  y el  $S^{2-}$  son muy hidrosolubles (Madigan *et al.*, 1999). En condiciones óxicas y pH neutro, el  $HS^-$  se oxida de forma espontánea.

El ion sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) es uno de los oxianiones universales que se encuentra en aguas naturales, se forma bajo condiciones aerobias a partir de los compuestos azufrados que son sensibles al proceso de oxidación y en presencia de microorganismos especializados. El sulfato es químicamente inerte y no volátil. El efecto negativo del sulfato está asociado con la actividad de bacterias que reducen el sulfato en procesos de digestión anaerobia, donde el sulfato es usado como el aceptor de electrones resultando en la producción de sulfuro (Hao *et al.*, 1996).

El azufre elemental ( $S^0$ ) es un sólido amarillo, no tóxico, que forma cristales ortorrómbicos. Contiene más unidades de azufre por masa que cualquier otra forma química. Su molécula más estable es la que presenta un anillo octaédrico ( $S_8$ ). Es poco soluble en agua ( $5 \mu g L^{-1}$  de  $S_8$  a  $25^\circ C$ ) pero muy soluble en bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes no polares análogos (Suzuki, 1999).

El tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) tiene dos átomos de azufre no equivalentes, es decir, es un ión sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) en el que uno de los átomos de oxígeno ha sido desplazado por un átomo de azufre. El átomo de azufre central tiene un número de oxidación de +6 y el átomo de azufre unido, tiene un número de oxidación de -2. Esta propiedad sugiere su posible formación a partir de la combinación del azufre elemental con sulfito, o de sulfuro con el trióxido de azufre con el estado de oxidación de 2 por átomo de azufre (Suzuki, 1999).

El sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) es un intermediario en la mayoría de las vías de oxidoreducción de los compuestos azufrados, es inestable, pero se puede encontrar permanentemente en las fuentes hidrotermales submarinas (Brüser *et al.*, 2000).

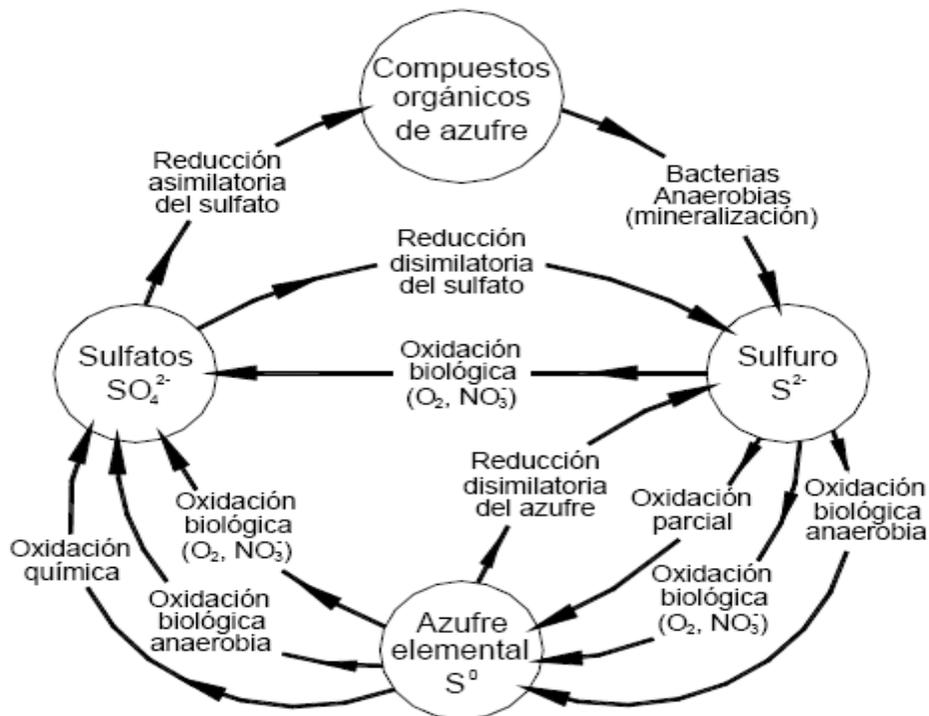
Los polisulfuros son cadenas de aniones de azufre de diferentes longitudes que tienden a oxidarse fácilmente en el ambiente, lo que les confiere su carácter inestable. Pueden ser producidos por la apertura del anillo del azufre elemental con sulfuro o por la oxidación parcial de sulfuro (Steudel, 2000). En el agua se encuentran sólo a pH mayor que 6 y su presencia en una solución acuosa da una coloración de amarillo-verdoso a naranja.

Los politionatos son moléculas que presentan grupos sulfato ( $\text{O}_3\text{S-Sn}$ ) de cadenas poliméricas de azufre de valencia cero (Steudel, 2000). Se forman cuando el ion tiosulfato se oxida con diferentes compuestos como: el yodo ( $\text{I}_2$ ), el bicloruro de azufre ( $\text{SCl}_2$ ) y el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ).

## 1.2 Ciclo biológico del azufre

El azufre es un componente esencial de la biosfera; constituye alrededor del 1% de la masa seca de los organismos vivos (Hao *et al.*, 1996). Plantas, animales y bacterias requieren el azufre para la síntesis de aminoácidos (metionina y cisteína). Los compuestos azufrados inorgánicos pueden ser utilizados como fuente de asimilación del azufre e incorporarse a compuestos orgánicos, o ser empleados como donadores o aceptores de electrones (Gibson, 1990; Brüser *et al.*, 2000).

En la naturaleza el azufre puede tener diferentes estados de oxidación, aunque sólo tres formas son significativas debido a su estabilidad química: -2 (sulfhidrilo, R-SH, y sulfuro,  $\text{HS}^-$ ), 0 (azufre elemental,  $\text{S}^0$ ) y +6 (sulfato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Las diferentes formas de azufre se intercambian mediante procesos químicos o biológicos de oxidación-reducción, constituyendo un ciclo denominado ciclo biológico del azufre, en la Figura 1.1 se presenta un esquema que muestra los diferentes compuestos involucrados en las transformaciones del azufre (Robertson y Kuenen, 1992).



**Figura 1.1** Esquema del ciclo biológico del azufre (Robertson y Kuenen; 1992).

La etapa de reducción presenta dos vías bioquímicas: la asimilativa y la no asimilativa. La primera es realizada por todos los organismos (eucariotes y procariotes) capaces de reducir el sulfato a sulfuro mediante el catabolismo de compuestos que contienen azufre y que son necesarios para el crecimiento celular. Mientras que la reducción no asimilativa la realizan principalmente organismos procariotes (eubacterias y archaea) denominados bacterias sulfato reductoras (BSR) que utilizan sulfato, tiosulfato y azufre elemental como aceptores finales de electrones durante la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos, en condiciones anaerobias (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2** Donadores de electrones usados para la reducción del sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ )

Hidrógeno ( $\text{H}_2$ )	Propionato
Acetato	Colina
Lactato	Butirato
Piruvato	Formiato
Alcoholes (etanol y metanol)	Benzoato
Fumarato	Indol
Malato	Hexadecano

La segunda etapa del ciclo, la constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos del azufre que pueden ocurrir bajo las siguientes condiciones: (1) anóxicas en presencia de bacterias de los géneros *Thiobacillus*, *Paracoccus* y *Thiosphera* (Barrenstein *et al.*, 1986), (2) anaerobias, metabolizadas por bacterias fototróficas de los géneros de la familia *Chlorobioaceae* y *Chromaticeae* (Cork *et al.*, 1986) y (3) aerobias, en presencia de bacterias sulfuro oxidantes de los géneros *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thiosphera*, *Wollinella*, *Sulfolobus*, entre otras (Holt *et al.*, 1994 y Alcántara, 2000). Bajo las tres condiciones el producto principal de la oxidación del sulfuro es el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Estos procesos biológicos de oxidación compiten exitosamente con las reacciones químicas, ya que pueden llegar a tener velocidades de 100 a 1000 veces mayores (Lens y Kuenen, 2001).

### 1.3 Reducción biológica del sulfato

#### 1.3.1 Fisiología de las bacterias sulfato reductoras

Las BSR son un grupo de microorganismos procariotes que han sido clasificados a través de un análisis secuencial de ARN ribosomal (Castro *et al.*, 2000) y agrupados en numerosos géneros, con características fisiológicas diversas como se muestra en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3** Características importantes en la clasificación de géneros bacterianos con capacidad sulfato reductora. Compilado de Holt *et al.* (1994) y de Castro *et al.* (2000).

Género	Características fisiológicas	Temperatura (°C)	pH	Donadores de electrones									Oxidación de acetato
				H <sub>2</sub>	For	L	E	A	AG	F	M	B	
<i>Desulfobulbus</i>		25-40	6.6-7.5	+	+	+	+	+	3-16	+	+	-	I
<i>Desulfomicrobium</i>		25-40	6.6-7.5	+	+	+	-	-	-	+	+	nr	nr
<i>Desulfomonas</i>		30-40	6.6-7.5	+	-	+	+	-	-	-	nr	nr	I
<i>Desulfovibrio</i>	Anaerobias estrictas, mesófilas, Gram negativo	25-40	6.6-7.5	+	+	+	+	-	-	nr	-	nr	I
<i>Desulfobacter</i>		20-33	6.6-7.6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	I
<i>Desulfobacterium</i>		20-35	6.6-7.5	+	+	+	±	±	3-20	±	±	±	C
<i>Desulfococcus</i>		28-35	6.5-7.5	nr	+	±	+	+	3-16	-	-	-	C
<i>Desulfonema</i>		28-32	6.7-7.6	±	+	±	-	+	3-14	+	-	±	C
<i>Desulfosarcina</i>		25-33	7.2-7.6	+	+	+	+	+	3-14	+	-	+	C
<i>Desulfotomaculum</i>	Heterótrofas o autótrofas Formadoras de esporas. Gram positivo	La mayoría de 25-40 y algunas de 40-65	6.6-7.4	+	nr	±	nr	+	-	nr	nr	nr	I/C
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Termófilas	65-70	6.6-7.5	+	nr	±	nr	-	nr	nr	nr	nr	I
<i>Archaeoglobus</i>	Arqueas Termófilas	60-95	4.5-7.5	+	nr	±	nr	-	nr	nr	nr	nr	I

+, propiedad presente. - propiedad ausente. C, completa. I, incompleta. nr, no reportado. For, fórmico. L, láctico. E, etanol. A, acetato. AG, ácidos grasos. F, fumarato. M, malato. B, benzoato.

Dependiendo de la capacidad de utilización de la fuente de energía las BSR se pueden clasificar en organótrofas o litótrofas. Las organoheterótrofas utilizan compuestos orgánicos como donadores de electrones y fuente de carbono. Las BSR litoautótrofas utilizan  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono, mientras que los electrones son obtenidos de la oxidación de un compuesto inorgánico como el hidrógeno ( $\text{H}_2$ ). En sistemas de tratamiento de aguas residuales, el hidrógeno puede ser alimentado directamente al reactor o puede ser generado por la oxidación o hidrólisis de compuestos orgánicos presentes en el agua residual como alcoholes (etanol, metanol, propanol y butanol), carbohidratos, propionato y butirato (Lens y Kuenen, 2001).

En base a su capacidad oxidativa, las BSR pueden ser subdivididas en dos grupos. El primer grupo lo comprenden especies cuyo metabolismo implica la oxidación incompleta del sustrato orgánico a acetato, mientras que el segundo grupo abarca aquellos microorganismos capaces de oxidar completamente la materia orgánica excretando dióxido de carbono, como se muestra en la tabla 1.4 (Widdel, 1988).

**Tabla 1.4** Reacciones metabólicas de las bacterias sulfato reductoras y sus cambios de energía libre de Gibbs. Compilado de Hao *et al.* (1996) y Widdel (1988).

Reacción	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)	Género representativo
$3\text{LA}^- \rightarrow 2\text{PA}^- + \text{AC}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-165	<i>Desulfobulbus</i>
$2\text{LA}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{AC}^- + 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}^+$	-189	<i>Desulfovibrio,</i> <i>Desulfotomaculum</i>
$2\text{LA}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 6\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	-255.3	<i>Desulfobacter</i>
$4\text{PA}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{AC}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	-150.6	<i>Desulfobulbus</i>
$4\text{PA}^- + 7\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 12\text{HCO}_3^- + 7\text{HS}^- + 2\text{H}^+$	-88.9	<i>Desulfococcus,</i> <i>Desulfobacterium</i>
$4\text{AC}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6	<i>Desulfobacter,</i> <i>Desulfobacterium</i>

$\text{LA}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$  (lactato).  $\text{PA}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$  (propionato).  $\text{AC}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  (acetato).

En general, las bacterias que realizan la oxidación incompleta se caracterizan por ser nutricionalmente menos versátiles y presentan velocidades de crecimiento más rápidas que las especies que oxidan completamente (Vincke *et al.*, 2000).

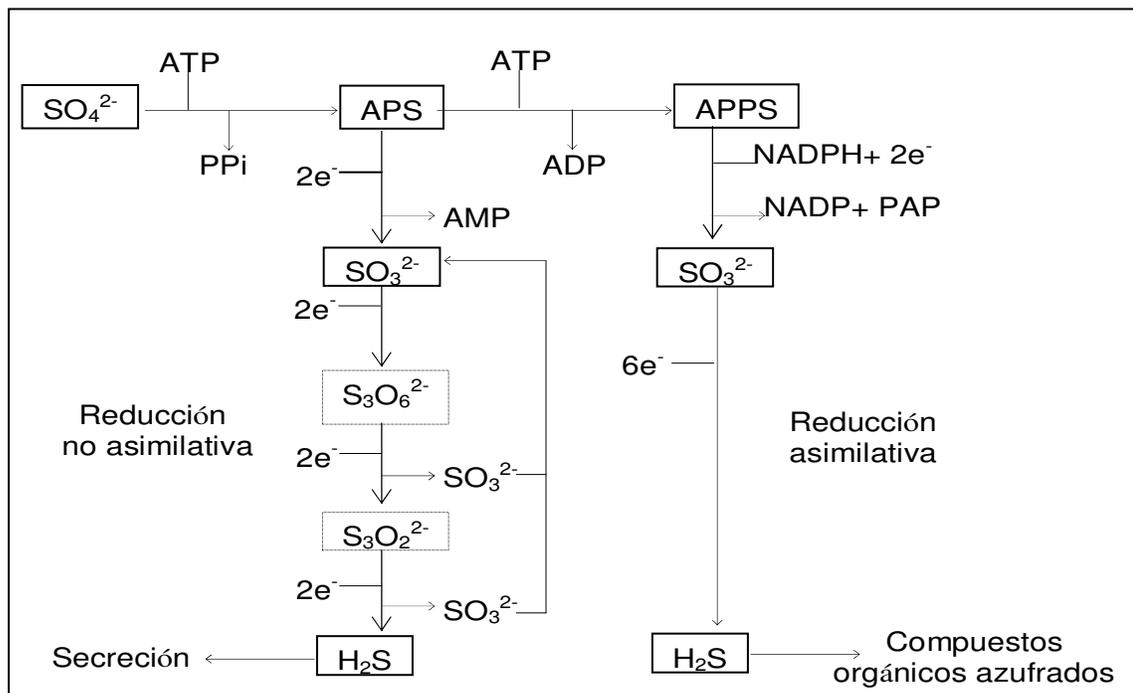
La selección de compuestos químicos puros como el lactato, acetato, propionato, etanol, etc., para la reducción de sulfato permite el entendimiento, descripción y predicción del proceso (van Houten, 1996). La aplicación de un compuesto como el lactato puede acelerar el arranque de un bioproceso sulfato reductor, ya que en términos de energía y rendimiento de biomasa, el lactato es considerado un donador de electrones superior al propionato, acetato, etanol e H<sub>2</sub> (Kaksonen *et al.*, 2004; Celis-García, 2004).

Desde su descubrimiento en 1895 por Beijerinck, las BSR han sido clasificadas como microorganismos anaerobios estrictos. Sin embargo, desde hace dos décadas se ha publicado que géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus*, permanecen viables por horas o aún por días cuando son expuestos a concentraciones de oxígeno que van desde 0.24 μM hasta 1.17 mM (Hardy y Hamilton, 1981; Cypionka *et al.*, 1985; Fukui y Takii, 1990; Kjeldsen *et al.*, 2004), debido a la presencia de enzimas que las protegen del oxígeno como la superóxido dismutasa, la NADH oxidasa y la catalasa (Cypionka, 2000; Dolla *et al.*, 2006).

### **1.3.2. Proceso respiratorio de las bacterias sulfato reductoras**

El sulfato es un compuesto muy estable con un potencial redox extremadamente bajo y tiene que ser activado antes de su reducción. Después de ser transportado hacia el interior de la célula, el sulfato reacciona con el ATP para formar adenosin fosfosulfato (APS), una reacción que es catalizada por la ATP sulfurilasa. El APS es el primer aceptor de electrones para la cadena respiratoria y es reducido por la APS reductasa a sulfito, que posteriormente es reducido por la sulfitorreductasa de manera no asimilativa. Para la asimilación del sulfato, el APS subsecuentemente se fosforila

formando la adenosin fosfato fosfosulfato (APPS), donde la enzima sulfitorreductasa cataliza una transferencia de 6 electrones del NADPH al sulfito (Figura 1.2). El sulfito es probablemente reducido directamente a sulfuro aceptando 6 electrones, aunque también se ha propuesto que la reducción procede con tiosulfato o tetratiónato como intermediarios, sin embargo las etapas intermedias de la reducción de sulfito a sulfuro no han sido esclarecidas en su totalidad (Matias *et al.*, 2005).



**Figura 1.2** Esquema de la posible ruta bioquímica de la sulfato reducción. Modificado de Gottschalk, 1986; Cypionka, 1995 y Madigan *et al.*, 1999.

Cuando el lactato es el donador de electrones, se utiliza la vía del piruvato y acetil-CoA (Figura 1.3). Una flavoproteína probablemente funciona como aceptor de protones ( $H^+$ ) en el primer paso de oxidación, y la ferredoxin-piruvato oxidorreductasa está involucrada en la formación de acetil-CoA. El producto final es acetato acoplado a la síntesis de ATP.

Los 8 electrones generados en la oxidación de lactato son usados para la reducción de sulfato a sulfuro. Dos aspectos de la reducción no asimilativa del sulfato



(Visser, 1995). El sulfuro puede inhibir a las BSR, debido a un efecto indirecto donde cualquiera de las especies de sulfuro ( $H_2S$ ,  $HS^-$  y  $S^{2-}$ ) se combina con el hierro de la ferredoxina y del citocromo C provocando que el sistema de transporte de electrones cese su actividad (Reis *et al.*, 1992).

Los datos disponibles de la inhibición del sulfuro sobre las BSR son contradictorios ya que se han observado efectos inhibitorios a distintas concentraciones. Estas diferencias pueden deberse posiblemente a diversos factores como la concentración y tipo de sustrato, así como tipo e historial del inóculo, entre otros (Tabla 1.5.).

**Tabla 1.5** Valores de  $CI_{50}$  para las bacterias sulfato reductoras en lodos anaerobios (modificada de O'Flaherty y Colleran, 2000)

Tipo de biomasa	Substrato	Temperatura °C	pH	H <sub>2</sub> S (mM)	Referencia
Lodo suspendido	Lactato	35	7.2-7.6	2.35	Okabe <i>et al.</i> (1992)
Axénico ( <i>Desulfovibrio sp.</i> )	Lactato	37	6.2-6.6	13.23	Reis <i>et al.</i> (1992)
Axénico ( <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> )	Lactato	35	7.0	7.35	McCartney y Oleskiewicz (1991)
Lodo suspendido	Lactato	35	7.0	> 8.8	McCartney y Oleskiewicz (1993)
Cultivo mixto	Propionato	37	7.5	5.3	Uberoi y Battacharya (1995)
Lodo granular	Acetato	30	7.2-7.4 8.1-8.3	5.0 1.67	Visser (1995)
Biopelícula anaerobia	Acetato	30	7.2 7.6 8.0	16.17 25.5 29.0	O'Flaherty <i>et al.</i> (1998)
Biopelícula Lodo granular	Acetato Propionato	35	7.5	25.3 22.0	Celis-García <i>et al.</i> (2004)

## 1.4 Oxidación biológica de sulfuro

La oxidación biológica de sulfuro se puede llevar a cabo de tres diferentes formas. En ausencia de oxígeno es realizada por microorganismos fotótrofos que utilizan la luz solar como fuente de energía, para la oxidación del sulfuro y asimilación del CO<sub>2</sub> (Cork *et al.*, 1986). En condiciones anóxicas se realiza en presencia de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), donde las bacterias sulfuro oxidantes (BSO) del género *Thiobacillus*, oxidan el sulfuro liberando electrones para reducir el nitrato a nitrógeno molecular (Lens y Kuenen, 2001). Mientras que en condiciones aerobias las BSO utilizan el oxígeno para oxidar el sulfuro utilizando el CO<sub>2</sub> como la fuente principal de carbono (Smet *et al.*, 1998). Aunque el sulfuro es el principal donador de electrones para los tres procesos, también se ha observado que pueden utilizar otros compuestos reducidos de azufre (Tabla 1.6) como azufre elemental y tiosulfato (Holt *et al.*, 1994).

### 1.4.1 Fisiología de las bacterias sulfuro oxidantes

Debido a la amplia diversidad metabólica y filogenética de las BSO involucradas en el ciclo del azufre han sido recientemente reclasificadas. Las BSO que originalmente se clasificaron como especies *Thiobacillus* fueron reclasificadas en las subclases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  del grupo *Proteobacteria*. Esta clasificación se basa en diferentes factores como: la habilidad de las bacterias para utilizar diferentes compuestos azufrados, su capacidad de metabolizar carbono orgánico o inorgánico y condiciones de cultivo como el pH y temperatura (Kelly y Wood, 2000; Brüser *et al.*, 2000). Estudios en medios sintéticos han permitido identificar diversas fuentes de carbono que son utilizadas por estas bacterias, estableciendo dos clases de microorganismos sulfuro oxidantes de acuerdo a su capacidad de crecimiento en los medios orgánicos (Alcántara, 2000).

1. *Quimiótrofos obligados*. Son bacterias especializadas, que requieren una fuente inorgánica de energía y obtienen carbono a través de la fijación de CO<sub>2</sub>

por el ciclo de Benson-Calvin utilizando para ello el flujo inverso de electrones para la generación de poder reductor en forma de NADPH.

2. *Quimiótrofos facultativos*. Estos microorganismos crecen adecuadamente con una fuente inorgánica de energía y CO<sub>2</sub>, o bien heterotróficamente con compuestos orgánicos que proveen carbono mientras los compuestos inorgánicos proporcionan los electrones para la generación de energía en un proceso conocido como mixotrofia. Aunque también se ha observado que pueden utilizar simultáneamente dos o más vías metabólicas para la utilización de energía y carbono, perdiendo en algunos casos la capacidad quimiolitótrofa.

**Tabla 1.6** Características de algunas bacterias oxidantes del azufre. Compilado de: Alcántara (2000), Kelly y Wood (2000) y Brüser *et al.* (2000).

EUBACTERIA	Autótrofo	Quimiótrofo	Temperatura (°C)	pH	Donador de electrones		
					H <sub>2</sub> S	S <sup>0</sup>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
<b>α-Proteobacteria</b>							
<i>Thiobacillus novellus</i> <sup>a</sup>	+	F, C	25-35	6.0-8.0	-	-	+
<i>Acidiphilium acidophilum</i> <sup>b</sup>	+	F	Nr	1.0-5.0	-	-	+
<b>β-Proteobacteria</b>							
<i>Thiobacillus thioparus</i>	+	O, C	25-30	6.0-8.0	+	+	+
<i>Thiobacillus desnitrificans</i>	+	O/F,C	25-30	6.0-8.0	+	+	+
<i>Thiomonas intermedius</i>	+	F,C	nr	3.0-7.0	+	+	+
<i>Thiomonas cuprinus</i>	+	F	nr	nr	-	+	-
<b>γ-Proteobacteria<sup>c</sup></b>							
<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	+	O, C	25-30	6.0-8.0	+	+	+
<i>Acidothiobacillus thiooxidans</i>	+	O,C	25-30	2.0-4.0	-	+	-
<i>Acidothiobacillus ferrooxidans</i>	+	O	30-35	2.0-4.0	+	+	-
<i>Thermithiobacillus hydrothermalis</i>	+	F	nr	nr	-	-	+
<i>Beggiatoa</i>	+	O	15-30	6.0-8.0	+	-	+
<i>Thiomicrospira</i>	+	O,C	nr	6.0-8.0	+	-	+
<b>ε-Proteobacteria</b>							
<i>Thiovulum</i>	+	O	50-87	6.0-8.0	+	-	-
<b>ARQUEOBACTERIAS</b>							
<i>Sulfolobus</i>	+	O/F,C	45-90	1-5	+	+	-
<i>Acidianus</i>	+	O/F, C	Nr	1-5	-	+	-

+ propiedad presente. - propiedad ausente. F, facultativo. O, obligado. C, ciclo B. Calvin. (a) "*Thiobacillus*" es marcado entre comillas por que no pertenece a la subclase *β proteobacteria*. (b) antes llamado *Thiobacillus acidophilus*. (c) Los géneros *Acidothiobacillus*, *Halothiobacillus* y *Thermithiobacillus* se denominaban *Thiobacillus*.

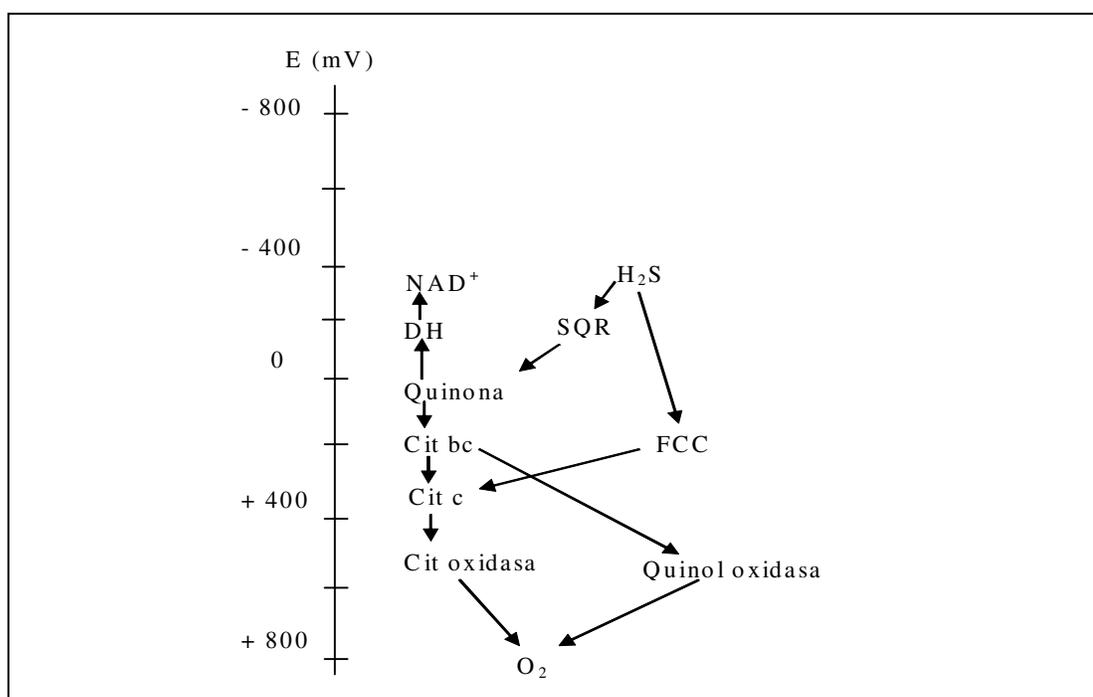
Las BSO se pueden distinguir también por su capacidad de almacenar o secretar el azufre elemental. *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira*, son géneros que producen y acumulan el azufre elemental de manera intracelular. Mientras que las bacterias del género *Thiobacillus* (*T. denitrificans*, *T. thioparus*, *Halothiobacillus neapolitanus*) tienen la capacidad de secretar el azufre elemental (Lens y Kuenen, 2001).

Las especies de *Thiobacillus* son microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, Gram negativos con forma de bacilos pequeños que miden aproximadamente 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho por 1-4  $\mu\text{m}$  de largo, móviles por un flagelo polar sencillo y no forman esporas. Las bacterias de este género se pueden encontrar en la naturaleza en ambientes marinos, agua, suelo y áreas donde se desprenden gases de sulfuro como sedimentos o suelos anaerobios (Holt *et al.*, 1994). Algunas especies son capaces de vivir en ambientes extremadamente ácidos, pueden utilizar el ion ferroso y el ion férrico como una fuente de energía y algunas son capaces de llevar a cabo la desnitrificación utilizando al nitrato como último aceptor de electrones.

#### **1.4.2 Proceso respiratorio de las bacterias sulfuro oxidantes**

Durante el proceso respiratorio de las BSO, el sulfuro de hidrógeno provee electrones para la reducción del  $\text{NAD}^+$  que es requerido para la fijación del  $\text{CO}_2$  en el Ciclo de Benson-Calvin. Los compuestos reducidos se incorporan a la vía por varios puntos según sus potenciales de reducción, utilizando el oxígeno como el aceptor final de electrones (Figura 1.4). El potencial redox del par  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a pH 7 es aproximadamente 50 mV más negativo que el potencial del par  $\text{S}^0/\text{H}_2\text{S}$ . Por lo tanto, se requiere energía para transportar los electrones del sulfuro de hidrógeno hacia el  $\text{NAD}^+$ . Los electrones para el sulfuro entran a la cadena a nivel de la quinona (Q), vía la sulfuro quinona oxidoreductasa (SQR), dependiendo de las especies de quinona el potencial del par  $\text{Q}/\text{QH}_2$  es de 100 a 300 mV más positivo que el par  $\text{S}^0/\text{H}_2\text{S}$ . Los electrones también pueden entrar a nivel del citocromo tipo c (Cit c) vía sulfuro

Citocromo c oxidorreductasa (Cit oxidasa) con potencial de 500 a 700 mV, más positivo que el potencial del par sulfuro. Si los electrones entran a la cadena a nivel de quinona vía SQR, entonces el complejo citocromo bc contribuye a la generación del gradiente protónico necesario para el transporte de electrones al  $\text{NAD}^+$ . Así la sulfuro oxidación por la SQR proporciona más energía que la sulfuro oxidación por la Cit oxidasa (Griesbeck *et al.*, 2000).



**Figura 1.4** Escala de oxidación-reducción y transporte de electrones quimiolitotrófico en bacterias sulfuro oxidantes. SQR, sulfuro quinona reductasa; Cit bc, complejo citocromo bc; Cit c, citocromo c; DH,  $\text{NAD}^+$  deshidrogenasa. Modificado de Griesbeck *et al.* (2000).

### 1.4.3 Inhibición de bacterias sulfuro oxidantes por compuestos azufrados

Las concentraciones inhibitorias del sulfuro para las BSO están reportadas entre 0.15 y 1 mM (Steffes *et al.*, 1996). Sin embargo, Buisman *et al.* (1990) observaron inhibición por sulfuro hasta una concentración de 18.75 mM, en células en suspensión obtenidas de un reactor que operaba a una concentración de 2.96 mM de sulfuro. Las concentraciones inhibitorias reportadas para *Thiobacillus denitrificans*

van desde 0.2 hasta 1.0 mM de sulfuro (Sublette, 1987), aunque también se ha reportado que la tasa de crecimiento se reduce a la mitad a concentraciones entre 1.87-3.75 mM (Buisman *et al.*, 1990). Como se observa los datos disponibles de inhibición por sulfuro sobre las BSO son contradictorios ya que se han observado efectos inhibitorios a diferentes concentraciones. Estas diferencias pueden atribuirse al tipo e historial del inóculo.

La inhibición por sulfato en las BSO ha sido reportada por Ongcharit *et al.* (1991) y Sublette *et al.* (1998), quienes observaron que a concentraciones de 208 y 260 mM de sulfato las bacterias del género *Thiobacillus denitrificans* fueron inhibidas, los autores argumentan que la inhibición se presentó como consecuencia de un fuerte estrés iónico. Yang y Allen (1994) observaron el mismo efecto inhibitorio a concentraciones mayores de 260 mM de sulfato en un cultivo sulfuro oxidante obtenido de un biofiltro. Alcántara (2000), observó que un consorcio de bacterias sulfuro oxidantes cultivado con concentraciones de tiosulfato de 268 mM, fue capaz de mantener su capacidad sulfuro oxidante a concentraciones de sulfato de 416 mM.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Sistemas biológicos para la remoción de compuestos azufrados

Muchas industrias como las procesadoras de alimentos (alimentos marinos, aceite comestible, etc.), petroquímica, farmacéutica, de pulpa y papel, generan aguas residuales con alta demanda química de oxígeno (DQO) y altas concentraciones de sulfato (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1** Algunos procesos que generan corrientes que contienen compuestos azufrados. Tomado de Celis-García, (2004).

Tipo de industria	Compuesto azufrado g L <sup>-1</sup>	pH	DQO g L <sup>-1</sup>
Pulpa y papel (proceso Químico-termomecánico)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (1.2-1.5) H <sub>2</sub> S (0.05-0.20)	7-9	7.5-10.4
Viscosa y rayón (agua residual)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (3.0)	2-3	1-2
Planta de celofán y rayón (emisión gaseosa)	H <sub>2</sub> S (0-1000 ppm) CS <sub>2</sub> (0-400 ppm)	-	-
Fermentación (ácido cítrico)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (2.5-4.5)	-	30
Aceite comestible	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (10-50)	2-3	2-6
Aceite comestible	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (9.6-11.5)	-	2.0-2.9
Procesadora de mariscos	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (2.1-2.7)	-	12.4-16.9
Tenería	H <sub>2</sub> S (0.15-0.3) SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (1.2-2.0)	8.6	4.8-8.0
Proceso fotográfico	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (45.5) SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (8.0) SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (3.5)	-	67.8
Producción de TNT	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (51.4) SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (5.5)	7.6	68.5
Refinería (sosas gastadas)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (20.3) H <sub>2</sub> S (48.5)	13	320

El fundamento y aplicación de los procesos biológicos de eliminación de compuestos azufrados se basa en el conocimiento del ciclo del azufre, de tal forma que se han desarrollado diversos procesos biológicos para el tratamiento de corrientes de aire contaminadas con sulfuro, bisulfuro y compuestos orgánicos volátiles azufrados y para corrientes acuosas contaminadas con sulfatos, sulfuros y tiosulfato (Sublette, 1987; Jensen y Webb, 1995).

### **2.1.1 Eliminación de sulfato**

Para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con sulfato y materia orgánica, se han implementado diversos tipos de reactores anaerobios: de biomasa suspendida, inmovilizada, granular expandida y sedimentada para la eliminación de ambos contaminantes (Tabla 2.2). La materia orgánica en estos sistemas es eliminada por sulfato reducción y metanogénesis (Lens *et al.*, 1998a), ya que ambas poblaciones pueden utilizar los mismos sustratos y compiten por ellos (hidrógeno, acetato, propionato y butirato). La competencia entre las bacterias metanogénicas y sulfato reductoras ha sido estudiada por diversos autores (Overmeire *et al.* 1994; Colleran *et al.*, 1995; Visser *et al.* 1996; Lens *et al.*, 1998b; Omil *et al.*, 1998; Hulshoff Pol *et al.*, 2001) quienes señalan que la competencia depende de distintos factores: ambientales (pH y temperatura), tipo de inóculo, sustrato orgánico, concentración de sulfato y la relación entre la demanda química de oxígeno y el sulfato ( $DQO/SO_4^{2-}$ ).

La competencia es importante ya que determinará los productos finales del proceso de mineralización anaerobia. Aumentando la mineralización al disminuir la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  del agua residual.

Para aguas residuales con una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.67, hay estequiométricamente suficiente sulfato disponible para mineralizar completamente la materia orgánica únicamente por sulfato reducción. Para una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  menor que 0.67, la cantidad de materia orgánica presente en el agua residual es

insuficiente para una completa reducción del sulfato y un sustrato extra deberá ser adicionado si la eliminación de sulfato es el objetivo del tratamiento.

**Tabla 2.2** Tipo de reactores usados para el tratamiento anaerobio de aguas residuales ricas en sulfato y materia orgánica.

Tipo Reactor	Fuente de carbono	Influente			Efluente		Referencia
		DQO (g L <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (g L <sup>-1</sup> )	DQO/ SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	% SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> reducido	% DQO removido BSR	
UASB	Acetato	1.5-2.1	0.7-3.4	2.14-0.61	70	50-90	Visser <i>et al.</i> (1993)
EGSB	Acetato, propionato y butirato	0.5-2.5	1.2-4.6	0.41-0.54	27-68	59-97	Omil <i>et al.</i> (1996)
MUSB	Acetato	0.2-0.4	0.1-0.2	2	40-80	100	Arora <i>et al.</i> (1995)
UASB	Etanol	Nr	0.84-5.0	-	80	nr	Kalyuzhnyi <i>et al.</i> (1997)
AF	Ac. Citrico	25.8	3.4	7.58	93	18	Colleran <i>et al.</i> (1994)
UASB	Agua residual	2.0	0.033	60	85-90	95	Yamaguchi <i>et al.</i> (1999)
UASB	Agua residual	2.0	1.0	2	75-80	90	Yamaguchi <i>et al.</i> (1999)
LFI	Acetato propionato butirato	2.5	1.25	1.67	21.4	< 20	Celis-García (2004)
LFI	Lactato propionato butirato	3.5	5.2	0.67	73.5	70	Celis-García (2004)

UASB reactor de lecho de lodos granulares de flujo ascendente; EGSB reactor de lecho de lodos granulares expandido; MUSB reactor de lecho granular microaerofílico; AF filtro anaerobio y LFI reactor de lecho fluidizado inverso. nr: no reportado.

Por otro lado, para aguas residuales con relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mayores que 0.67, una eliminación completa de la materia orgánica puede ser alcanzada sólo si, aparte de la sulfato reducción también ocurre la metanogénesis (Omil *et al.*, 1998). Sin embargo la metanogénesis es inhibida por concentraciones de sulfuro que varían desde 100 a 1250 mg L<sup>-1</sup> dependiendo del tipo de biomasa, sustratos y pH (Tabla 2.3).

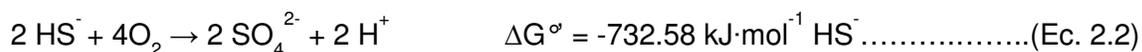
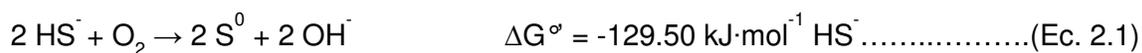
**Tabla 2.3** Concentraciones de sulfuro que causan el 50% de inhibición de la actividad metanogénica.

Tipo de biomasa	Sustrato	Temperatura °C	pH	CI <sub>50</sub> (mM)	Referencia
Lodo granular	Acetato	30	7.0-7.2	25.3	Koster <i>et al.</i> (1986)
Lodo granular	Acetato	30	7.8-8.0	26.3	Koster <i>et al.</i> (1986)
Lodo granular	Lactato	35	7.0	3.1	McCartney y Oleskiewicz (1993)
Lodo granular	Acetato y propionato	35	7.2-7.4	17.6	Visser <i>et al.</i> (1996)
Lodo granular	Acetato y propionato	35	8.1-8.3	18.4	Visser <i>et al.</i> (1996)
Lodo granular	Acetato y propionato	35	7.5	25	Celis-García (2004)
Biomasa adherida	Acetato y propionato	35	7.5	39.0	Celis-García (2004)

### 2.1.2 Eliminación de sulfuro

Los efluentes que contienen sulfuro generado por actividad sulfato reductora han sido utilizados como influentes en procesos sulfuro oxidantes (Buisman *et al.*, 1989; Jensen y Webb, 1995; Janssen *et al.*, 1997), donde el sulfuro se elimina exitosamente ya sea por medio de cultivos puros o consorcios sulfuro oxidantes e incluso lodos anaerobios bajo condiciones limitadas de oxígeno (van der Zee *et al.*, 2007). El producto de la oxidación completa del sulfuro es el  $\text{SO}_4^{2-}$ , sin embargo, diversos investigadores se han dado a la tarea de desarrollar sistemas que favorecen la formación de  $\text{S}^0$  sobre la del  $\text{SO}_4^{2-}$  (Buisman *et al.* 1989; Janssen *et al.*, 1995; Stefess *et al.*, 1996; Visser *et al.*, 1997a; Celis-García, 2004; Krishnakumar *et al.*, 2005; Beristain-Cardoso, 2004), debido a que el  $\text{S}^0$  presenta las siguientes ventajas: a) no es tóxico, b) es insoluble en agua por lo que se puede separar de las corrientes acuosas que lo contienen, c) se puede purificar y reutilizar, lo que le da un valor agregado al proceso y d) la formación no deseada de sulfato requeriría mayor consumo de oxígeno y consecuentemente mayor consumo de energía para la aireación (Janssen *et al.* 1996).

La obtención de  $S^0$  depende de la oxidación incompleta del sulfuro, llevada a cabo por bacterias del género *Thiobacillus* de acuerdo con las siguientes reacciones estequiométricas (Kelly, 1999):



En función de la estequiometría de la reacción, el oxígeno es el parámetro que determina el producto final de la oxidación. De acuerdo a la estequiometría se necesita una relación  $O_2/HS^-$  de 0.5 para producir  $S^0$ , por lo que la formación de azufre elemental puede ser regulada dosificando estequiométricamente las cantidades de oxígeno (Janssen *et al.*, 1997).

Buisman *et al.* (1990) establecieron que a concentraciones de sulfuro menores que 0.6 mM, la concentración del oxígeno se debe mantener a menos de 0.03 mM, para limitar la oxidación de sulfuro a sulfato. Janssen *et al.* (1995), observaron que bajo condiciones limitadas del aceptor final de electrones ( $< 3.125 \mu\text{mol } O_2 \text{ L}^{-1}$ ) el  $S^0$  es el producto final de la oxidación del  $H_2S$ , mientras que la formación de  $SO_4^{2-}$  se ve favorecida por concentraciones limitadas de la especie reducida de azufre. Stefess *et al.* (1996) reportaron que un cultivo puro de *Thiobacillus neapolitanus*, acumuló azufre elemental de la oxidación parcial del sulfuro y tiosulfato. Encontraron que a una relación  $O_2/HS^-$  de 1.6 y con una velocidad de carga de sulfuro de  $18 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , obtenían una recuperación de 42% de azufre elemental.

Visser *et al.* (1997 a, b) observaron que de una cepa pura de *Thiobacillus* sp. W5, aislada de un consorcio de microorganismos sulfuro oxidantes a velocidades de carga de sulfuro menores que  $10 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , el producto de la oxidación era sulfato. Sin embargo, a mayor carga se observó acumulación de  $S^0$  en el medio. La velocidad de carga máxima, sin que fuera tóxica para la cepa, fue de  $30 \text{ mmol } S^{2-} \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$  con

una recuperación de  $S^0$  de 96%. La máxima capacidad específica oxidativa reportada para *Thiobacillus sp* W5 capaz de oxidar  $S^{2-}$  a  $S^0$  se reportó en  $1.87 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , mientras que para *Thiobacillus neapolitanus* fue de  $2.3 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Aunque este último, poseía una capacidad oxidativa mayor sólo convertía el 50% del sulfuro suministrado a  $S^0$ .

Janssen *et al.* (1997) reportaron un proceso biotecnológico para la recuperación de  $S^0$  a partir de la oxidación parcial de  $\text{HS}^-$ . El proceso consistió de un sistema donde el compartimiento de aireación de la fase líquida y el proceso de oxidación del  $\text{HS}^-$  a  $S^0$  se llevaron a cabo en dispositivos separados espacialmente. La oxidación se realizó bajo condiciones autotróficas, a velocidades de carga de 3.4 hasta  $14 \text{ g HS}^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  con células libres y agregados bacterianos, obteniendo una eficiencia de recuperación de azufre elemental de 92% cuando se operó el reactor a una relación  $\text{O}_2/\text{HS}^-$  de 0.7, tanto para las células libres como para los agregados bacterianos. Sin embargo, la carga máxima de sulfuro no tóxica para células en suspensión fue de  $6 \text{ g HS}^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y los agregados bacterianos no se vieron afectados a la máxima velocidad de carga estudiada ( $14 \text{ g HS}^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). En este mismo trabajo se estudió el efecto de la materia orgánica, encontrando que el sistema se deterioró después de alimentarlo con  $600 \text{ mg L}^{-1}$  de acetato y propionato, concluyendo que esto pudo deberse a que se favoreció el desarrollo de BSR y BSO heterótrofas, y que las BSR utilizaron el azufre elemental como aceptor de electrones formando sulfuro.

Un sistema similar al propuesto por Janssen *et al.* (1997), fue utilizado por Celis-García (2004) para la formación y recuperación de azufre elemental en cultivos autotróficos aerobios con células en suspensión. Se utilizó agua residual sintética con cargas de sulfuro de 21.8, 31.25 y  $43.75 \text{ mM S}^{2-} \text{ d}^{-1}$  y una relación molar  $\text{O}_2/\text{HS}^-$  de 0.5. La recuperación de  $S^0$  fue de 32, 72 y 74%, respectivamente. Posteriormente sustituyó el agua residual sintética por el efluente de un reactor anaerobio que presentaba cargas variables de sulfuro entre  $26.56$  y  $29.68 \text{ mM S}^{2-} \text{ d}^{-1}$ . La relación de

$O_2/HS^-$  no fue controlada por la variación del influente, obteniendo una recuperación de  $S^0$  entre 16 y 44%.

## 2.2 Sistemas de biopelículas

Las biopelículas son definidas como una estructura compleja de células y productos extracelulares como biopolímeros que pueden adherirse a una superficie de origen natural o sintético. Son estructuras complejas donde la formación de micro-*habitats* y la distribución espacial de diferentes microorganismos permiten el metabolismo sintrófico entre ellos. Dentro de la biopelícula, los microorganismos por sí mismos producen y mantienen las condiciones químicas que favorecen el crecimiento de poblaciones específicas que de otra manera no podrían sobrevivir (Characklis, 1990). La alta diversidad taxonómica y fisiológica de las biopelículas heterogéneas resulta en un mejor desempeño del tratamiento de aguas residuales bajo condiciones ambientales variadas (van Loosdrecht *et al.*, 1995).

La formación de la biopelícula implica una serie de etapas que han sido descritas por distintos autores (Gorries *et al.*, 1989; van Loosdrecht *et al.*, 1995; Fleming 1995), quienes han dividido el proceso en seis fases: (1) *Inducción*, en la cual entran en contacto los sustratos con una superficie (soporte), promoviendo la adsorción de nutrientes. (2) *Transporte de células microbianas a la superficie*, que depende de la velocidad de flujo, del tipo de soporte y de los microorganismos (tamaño, forma, tipo de pared celular, densidad). (3) *Adhesión de los microorganismos a la superficie*, que puede ser reversible e irreversible. En la adhesión reversible los microorganismos pueden ser fácilmente desprendidos del soporte. Mientras que en la adhesión irreversible las bacterias ya han producido polímeros extracelulares, responsables de que los microorganismos permanezcan adheridos a la superficie. (4) *Crecimiento o acumulación de microorganismos*. El desarrollo de la biopelícula es el resultado de la transferencia de los nutrientes, para la formación de biomasa y exopolímeros. La formación y grosor de la biopelícula depende de distintos factores como es el pH,

concentración de nutrientes, condiciones hidrodinámicas, tipo de sustrato y microorganismos. (5) *Desprendimiento de microorganismos*, que se puede dar por problemas de difusión de los nutrientes en la biopelícula, por sustancias tóxicas, cambios en la tensión superficial en la biopelícula, por los esfuerzos de corte, fagocitación, entre otros factores. Normalmente se alcanza un estado estacionario, en el que la cantidad de microorganismos o secciones completas de biopelícula desprendida es similar a la cantidad de bacterias producidas. (6) *Regeneración*, una vez que la biopelícula alcanza un estado estacionario y al desprenderse las capas externas, permanece una capa delgada que tiende a engrosar, repitiéndose así el ciclo.

Los soportes empleados para el desarrollo de biopelículas en reactores presentan superficies apropiadas para la colonización y los lechos pueden ser fijos o suspendidos y a su vez fluidificados. Los reactores de lecho fijo emplean soportes de alta densidad como piedra, arena, cerámica, vidrio, metales (anillos Rashing), placas de plástico y madera, etc. En sistemas de lecho suspendido donde el líquido se recircula de forma ascendente algunos de los soportes que se han utilizado son carbón activado, zeolita, diatomeas, arena, vidrio, etc., por lo que para fluidificarlos se requieren altas velocidades de flujo de líquido presentando gastos energéticos considerables (Heijnen *et al.*, 1989). Materiales de baja densidad como el poliuretano, poliéster, nylon, polietileno y materiales especiales como extensosphere han sido utilizados en reactores de lecho fluidificado inverso (RLFI) donde el líquido se recircula de manera descendente (García-Calderón *et al.*, 1998; Castilla *et al.*, 2000; Arnaiz *et al.*, 2003).

Los reactores de biopelícula han sido usados en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con compuestos azufrados. Se ha reportado que las biopelículas son menos sensibles a compuestos tóxicos y son más eficientes para degradarlos comparadas con los sistemas de biomasa suspendida (Lee *et al.*, 1994).

Annachatre y Suktrakoolvait (2001) reportaron un proceso a nivel laboratorio en un reactor de lecho fluidizado ascendente para la oxidación biológica de sulfuro a azufre elemental, con la formación de sedimentos de este último. La oxidación del

sulfuro dependió de la concentración de oxígeno disuelto (OD), de la concentración del sulfuro ( $2.8 - 15 \text{ mmol S}^{-2} \text{ L}^{-1}$ ) y del aumento de la velocidad ascensional ( $7 - 22 \text{ m h}^{-1}$ ). A concentraciones de OD mayores que  $0.1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  ( $3.125 \text{ } \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$ ), el sulfato fue el principal producto de la oxidación y a concentraciones menores que  $0.1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  fue el  $\text{S}^0$ . La conversión de sulfuro a  $\text{S}^0$  fue de 90% a velocidades de carga de  $4.0-50 \text{ mmol S}^{-2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . El  $\text{S}^0$  producido se acumuló en el reactor y propició que el lodo granular contuviera de 65 a 76% de  $\text{S}^0$  en masa seca, formando lo que ellos denominaron biogránulos, ya que el  $\text{S}^0$  fue utilizado como soporte por los microorganismos. Por lo que el reactor de lecho fluidificado de flujo ascendente presenta el inconveniente de que el  $\text{S}^0$  queda atrapado en el sistema y puede ser utilizado como soporte por los microorganismos, lo que impide su recuperación o remoción sin que afecte al sistema, además de que eventualmente el  $\text{S}^0$  puede ser oxidado o reducido por BSR o BSO.

El reactor de lecho fluidificado inverso que emplea soportes de menor densidad que el agua permite que sólo las partículas de mayor densidad como el azufre elemental sedimenten en el sistema (Beristain-Cardoso 2004; Krishnakumar *et al.* 2005).

Beristain-Cardoso (2004), propuso la recuperación de  $\text{S}^0$  en un reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI) acoplado a un sedimentador, con eliminación de carbono y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), mediante un proceso desnitrificante. El volumen del reactor fue de 1.7 L, como material de soporte utilizó polietileno de baja densidad y operó el reactor en continuo durante 90 días a un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 22 horas. Alcanzó una recuperación de azufre elemental de 70% con una velocidad de carga de  $2.18 \text{ mmol S}^{-2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

De igual manera Krishnakumar *et al.* (2005) propusieron un RLFI para la recuperación de azufre elemental mediante la oxidación biológica aerobia. El volumen del reactor fue de 0.48 L, el soporte utilizado fue polietileno de baja densidad de un diámetro aproximado de 1mm, empleando un cultivo puro de

*Thiobacillus denitrificans* y una concentración de sulfuro de  $7.5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Obteniendo una recuperación de azufre elemental de 95% a una velocidad de carga de  $0.34 \text{ mmol S}^{-2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , sin controlar el pH del sistema. A un pH de 8 y una carga de  $0.94 \text{ mmol S}^{-2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  la recuperación de  $\text{S}^0$  fue de 65%. Las concentraciones de oxígeno suministradas no son reportadas, debido a que el proceso fue controlado por potenciales de óxido-reducción (OPR).

Por otro lado Celis-García *et al.* (2004), llevaron a cabo experimentos en lote en botellas serológicas para determinar el efecto de la concentración de sulfuro y oxígeno en la actividad sulfato reductora de dos diferentes agregados microbianos obtenidos de un reactor UASB (lodo granular) y de un RLF1 (biomasa adherida a soporte plástico). Las concentraciones de sulfuro que causaron la pérdida de 50 % de la actividad sulfato reductora fueron de 22.0 y 25.3 mM para el lodo granular y la biomasa adherida respectivamente. Concentraciones de oxígeno disuelto de 0.1 a 0.84 mM (5.4 a 26.8 mg  $\text{L}^{-1}$ ) no tuvieron efecto inhibitorio sobre la actividad sulfato reductora en ambos agregados microbianos. Los resultados sugirieron que la sulfato reducción en la biomasa adherida presentó mayor tolerancia a las concentraciones de sulfuro que el lodo granular. Lo que permite inferir la posibilidad de integrar un sistema aerobio-anaerobio en un sólo reactor, por la tolerancia al oxígeno.

### **2.3 Crecimiento sintrófico de bacterias sulfato reductoras y bacterias sulfuro oxidantes.**

La coexistencia de bacterias sulfato reductoras y sulfuro oxidantes forman lo que se conoce como *Sulfuretum*. El término *Sulfuretum* fue introducido en 1925 por Baas-Becking y se refiere a los ecosistemas donde la reducción y oxidación de los compuestos azufrados se llevan a cabo de forma cíclica, formando una comunidad sintrófica en la que interaccionan los microorganismos presentes en las zonas óxicas y anóxicas. Esta interacción sintrófica ha sido reportada en sedimentos marinos, fuentes hidrotermales, mantos microbianos, pantanos y volcanes (van den Ende *et al.*, 1997; Massmann *et al.*, 2003). Estos ecosistemas son importantes desde los

puntos de vista científico y ambiental, por la presencia de microorganismos especializados y por el ciclaje del azufre elemental (Celis-García 2004).

Bajo condiciones limitadas de oxígeno, las BSO pueden oxidar el sulfuro parcialmente a azufre elemental y tiosulfato. Estos compuestos pueden ser usados por las bacterias sulfato reductoras como aceptores de electrones en la oxidación de compuestos orgánicos e hidrógeno (van den Ende *et al.*, 1997).

Un cocultivo estable de *Desulfovibrio desulfuricans* PA2805 y de *Thiobacillus thioparus* T5, fue desarrollado por van den Ende *et al.* (1997), en un reactor continuo de tanque agitado, alimentado con 19.6 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , 13.5 mM de lactato y 0.36 mmol  $\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$  de  $\text{O}_2$ . Se observó que ninguna de las especies pudo crecer en cultivo puro bajo estas condiciones. *D. desulfuricans* pudo crecer sólo cuando las concentraciones de  $\text{O}_2$  fueron mantenidas por debajo de 2  $\mu\text{M}$  debido al metabolismo de *T. thioparus*. Por su parte el microorganismo *D. desulfuricans* produjo sulfuro y el  $\text{CO}_2$  necesario para el crecimiento de *Thiobacillus*. La elevada producción de  $\text{S}^{2-}$  obtenida por *Desulfovibrio* resultó en un incremento de la producción de  $\text{S}^0$  por *Thiobacillus*. De esta forma se obtuvo un sistema sinérgico en el que se estabilizó y se demostró la asociación sintrófica de estos dos microorganismos. El  $\text{S}^0$  acumulado eventualmente fue utilizado por *D. desulfuricans* como aceptor de electrones, generando una mayor concentración de sulfato en el efluente.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos reporta que el sulfato causa problemas estomacales en infantes por lo que ha establecido un límite máximo permisible para aguas subterráneas de 250 ppm. En aguas residuales la presencia de sulfato no constituye una amenaza directa a la microflora en reactores anaerobios debido a que se considera químicamente inerte, no volátil y no tóxico (Vallero, 2003). El efecto negativo del sulfato está asociado con el papel activo de la sulfato reducción en procesos de digestión anaerobia, debido a que el sulfato es utilizado como el aceptor final de electrones resultando en la producción de sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  y  $\text{S}^{2-}$ ), el cual genera olores desagradables perceptibles a concentraciones de 1 ppm, además de tener propiedades corrosivas y tóxicas.

El sulfuro por sus propiedades corrosivas, tiene una gran repercusión en las industrias ya que afecta sistemas de drenaje, máquinas de combustión, tuberías de acero e incluso las paredes de concreto de los reactores (Lens y Hulshoff Pol, 2000). El sulfuro también causa daños a los ecosistemas acuáticos, debido a que cuando se disuelve en el agua reacciona rápidamente con el oxígeno disuelto causando una reducción drástica del oxígeno y muerte de organismos aerobios.

En los humanos, el sulfuro causa la pérdida de la sensibilidad al olor, irritación respiratoria y a concentraciones altas la muerte (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Niveles de toxicidad del H<sub>2</sub>S y su efecto a la salud. Tomado de Janssen (1996).

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

Por lo que la reducción biológica de sulfato a sulfuro, y la subsiguiente oxidación de sulfuro a azufre elemental, ha sido propuesta como un método efectivo para la eliminación de azufre de las corrientes de agua. Sin embargo, se han realizado en sistemas por separado. Donde en reactores anaerobios se reduce el sulfato a sulfuro y este efluente es alimentado a un reactor aerobio para oxidar parcialmente el sulfuro a azufre elemental (Celis-García 2004).

En este trabajo se propone acoplar la sulfato reducción y la sulfuro oxidación en un sólo reactor que permita la recuperación de azufre elemental a partir de un efluente sintético con sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) y materia orgánica.

## **4. HIPÓTESIS**

El reactor de lecho fluidificado inverso está reportado como un sistema que permite la sedimentación y recuperación de  $S^0$  (Krishnakumar *et al.* 2005; Beristain-Cardoso 2004), además de ser considerado un sistema eficiente de contacto entre líquido-gas, debido a que el flujo descendente del líquido tiende a mantener al gas atrapado en el sistema. Este régimen hidrodinámico permitirá en presencia de concentraciones estequiométricas de oxígeno, acoplar la actividad metabólica de microorganismos sulfato reductores y sulfuro oxidantes para la transformación de sulfato a sulfuro y la oxidación parcial de sulfuro a azufre elemental. De tal manera que los productos metabólicos de las bacterias sulfato reductoras (sulfuro y  $CO_2$ ), serán los sustratos de las bacterias sulfuro oxidantes.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Operar un reactor de lecho fluidificado inverso bajo condiciones limitadas de oxígeno disuelto, que permita obtener un cultivo mixto de bacterias sulfato reductoras y sulfuro oxidantes para la conversión de especies azufradas oxidadas en azufre elemental.

## **5.2 Objetivos Particulares**

- Obtener una biopelícula mixta, formada por bacterias sulfato reductoras y sulfuro oxidantes al operar el reactor en lote y bajo condiciones de limitación de oxígeno, así como evaluar la actividad específica de las poblaciones inmovilizadas.
- Estudiar el desempeño del proceso de sulfato reducción acoplado a la sulfuro oxidación en un reactor de lecho fluidificado inverso, operado en continuo mediante la variación de la concentración de los sustratos (DQO y  $\text{SO}_4^{2-}$ ) y la concentración de oxígeno disuelto.
- Evaluar la actividad sulfato reductora y sulfuro oxidante durante la formación de la biopelícula y la variación de la concentración de los sustratos.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Materiales**

#### **6.1.1 Reactor de lecho fluidificado inverso (RLFI)**

Los experimentos se llevaron a cabo en un RLFI con un volumen de operación de 2.3 L (Figura 6.1). Unido al reactor, se encontraba un separador de partículas con un volumen de 0.5 L, que tenía como función principal retener las partículas que se hubieran desplazado del lecho. Como material de soporte, se utilizó polietileno de baja densidad, con un diámetro promedio de partícula de 0.59 mm y densidad aparente de  $400 \text{ Kg m}^{-3}$ , que ocupó el 30% del volumen de operación del reactor sin expandir, equivalente a 0.69 L de soporte seco.

#### **6.1.2 Inóculo**

La biomasa que se utilizó para inocular el RLFI provino de la planta piloto de tratamiento de agua residual de la UAM-Iztapalapa. Antes de su inoculación, el lodo se lavó tres veces con una solución isotónica (0.9%) de cloruro de sodio para eliminar sustratos residuales orgánicos e inorgánicos. La concentración de biomasa medida como sólidos suspendidos volátiles (SSV) fue de  $31 \text{ g L}^{-1}$  y el reactor fue inoculado con 230 mL de lodo previamente lavado.

#### **6.1.3 Medio de cultivo**

El medio mineral usado fue el propuesto por Visser (1995). La composición del medio se detalla en la Tabla 6.1. Se utilizó una solución de oligoelementos 10 veces concentrada; de la que se adicionaba 1 mL a cada litro de medio.

Tabla 6.1 Medio mineral propuesto por Visser (1995)

<b>MACRONUTRIENTES</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> Cl	280
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	169
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	150
KCl	500
CaCl <sub>2</sub>	10
Extracto de levadura	18
<b>SOLUCIÓN DE OLIGOELEMENTOS</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
FeCl 4H <sub>2</sub> O	2000
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	785
ZnCl <sub>2</sub>	150
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	50
EDTA	500
HCl 37%	1 mL L <sup>-1</sup>

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

Los sustratos utilizados durante la operación del RLFI fueron: ácido láctico y sulfato de sodio (Tabla 6.2). La fuente de carbono y azufre para el crecimiento de las bacterias sulfuro oxidantes provino de los productos del metabolismo de las bacterias sulfato reductoras.

**Tabla 6.2** Condiciones de operación para las etapas de inmovilización, I, II y III del RLFI.

<b>Etapas</b>		<b>Inmovilización</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
Tiempo de operación	Días	1-55	56-103	104-125	125-147
<b>Condiciones de operación</b>					
TRH	Día	na	1	1	1
DQO (Lactato)	g L <sup>-1</sup>	3.0	2.6	4.2	5.9
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	g L <sup>-1</sup>	3.9	3.9	6.2	8.9
Flujo de aire	L d <sup>-1</sup>	3.5*	2.28	3.42	5.4
DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	na	0.76	0.66	0.67	0.66
<b>Velocidades de carga</b>					
Q <sub>v</sub> DQO	(g DQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	na	2.6	4.2	5.9
Q <sub>v</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	(g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	na	3.9	6.2	8.9
Q <sub>v</sub> O <sub>2</sub>	(g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	na	0.66	1.01	1.49

na. No aplica; \* bomba de pecera de flujo variable.

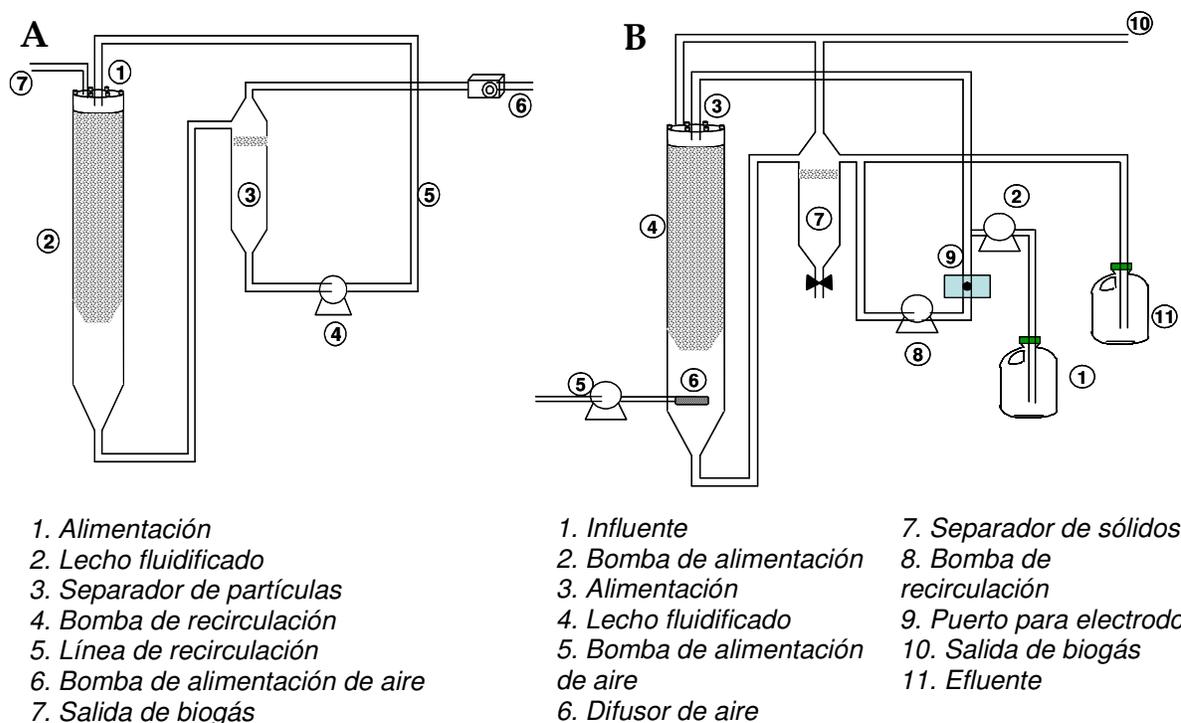
### 6.1.4 Inmovilización de la biopelícula

Antes de introducir las partículas de plástico en el reactor, fueron acondicionadas poniéndolas en un vaso de precipitados de 4 litros, que contenía 2 litros de agua destilada y 2 g de peptona de caseína. Las partículas se mantuvieron en agitación por 3 horas mediante un agitador magnético a velocidad media. Una vez acondicionadas se llenó el reactor con medio mineral, 3.0 g DQO-lactato L<sup>-1</sup> y 3.9 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>, para obtener una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.76. El soporte se agregó por la parte superior del reactor para ser inoculado posteriormente. Después de la inoculación el reactor se operó en lote por un periodo de 55 días, con una velocidad superficial descensional del líquido de 6.41 m L<sup>-1</sup> que permitió una expansión del lecho del 60% aproximadamente. El medio de cultivo se cambiaba por medio de cultivo fresco cada 48 horas y los sólidos sedimentados se introducían de nuevo al reactor. En esta etapa el separador de partículas funcionó como unidad de aireación (Figura 6.1 A). La aireación se llevó a cabo mediante una bomba de pecera de flujo variable con capacidad máxima de 3.5 L min<sup>-1</sup>, que permitía tener una concentración de oxígeno disuelto de 1.6 mg L<sup>-1</sup> en el separador de partículas. Para dispersar el aire se usó un difusor de vidrio poroso, y la temperatura de operación fue de 30 °C.

### 6.1.5 Operación en continuo del RLF1

El reactor se operó en continuo a un tiempo de residencia hidráulica de 1 día, a un flujo de 1.6 mL min<sup>-1</sup>, y con una velocidad superficial descensional del líquido de 7.7 m h<sup>-1</sup> que permitió una expansión del lecho entre 50 y 60% del volumen del reactor. La aireación se realizó por la parte inferior del reactor, utilizando una bomba peristáltica y un difusor de acero inoxidable (Figura 6.1 B). La operación en continuo se realizó en tres etapas (I, II y III), al aumentar tanto la concentración de sulfato como de lactato en la alimentación. En la tabla 6.2 se muestran las condiciones de

operación durante las tres etapas en continuo del RLFi. El pH no se controló y el reactor se mantuvo dentro de un cuarto a temperatura controlada a 30 °C.



**Figura 6.1** Diagrama del reactor de lecho fluidificado inverso operado en lote (A) y en continuo (B).

### 6.1.6 Actividad específica bajo condiciones anaerobias

En la determinación de las actividades metanogénica y sulfato reductora, se utilizó el mismo medio mineral usado durante la operación del reactor (Sección 6.1.3.)

La actividad específica sulfato reductora (AESR) se definió como la velocidad de consumo de sulfato o lactato con respecto al contenido de sólidos volátiles inmovilizados (SVI) en la biopelícula y es expresada en  $\text{mmol SO}_4^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ó  $\text{g DQO g SVI}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . De igual forma, la actividad metanogénica específica (AME), se definió como la velocidad de producción de metano, expresada como  $\text{g DQO-CH}_4 \text{ g SVI}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

La actividad sulfato reductora se llevó a cabo por duplicado en botellas serológicas de 120 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL. La cantidad de biomasa inmovilizada utilizada para la etapa en lote fue de 17.2 mg SVI, mientras que para las tres etapas en continuo fue de 10 mg SVI manteniendo una relación másica DQO/SVI (g/g) de 1. Los sustratos adicionados fueron ácido láctico ( $0.34 \text{ g DQO L}^{-1}$  y  $0.2 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) y sulfato de sodio ( $0.45 \text{ g SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$  y  $0.30 \text{ g SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ ) para una relación DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.76 (operación en lote) y de 0.66 (operación en continuo). A las pruebas control, sólo se les adicionó el aceptor de electrones. La actividad metanogénica se inhibió utilizando ácido 2-bromoetanosulfónico (BESA) 50 mM (Razo-Flores *et al.*, 1997). El pH del medio se ajustó a 7.5. Las botellas fueron selladas con tapones de hule y anillos de aluminio. La atmósfera de las botellas se intercambió utilizando  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80/20 %) por cinco minutos; equilibrando la fase gaseosa de las botellas con la presión atmosférica por purga simultánea. Las botellas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  en agitación (100 rpm) y oscuridad.

La actividad metanogénica se realizó por duplicado en botellas serológicas de 120 mL que contenían 50 mL de medio y  $0.34 \text{ g DQO-acetato L}^{-1}$ . La relación másica de DQO/SVI (g/g) también fue de 1. La producción de metano se midió cada hora, por un período de 12 horas, por desplazamiento de una solución de NaOH al 3%. Al final de la prueba se determinó la concentración de acetato en el medio por cromatografía de gases.

### 6.1.7 Actividad específica sulfuro oxidante (Respirometría)

La actividad específica sulfuro oxidante (AESO) se definió como la capacidad de la biomasa de oxidar el sulfuro a sulfato o el consumo de oxígeno para este proceso, y se expresó en  $\text{mM HS}^- \text{ g SVI}^{-1} \text{ h}^{-1}$  o en  $\text{mM HS}^- \text{ g proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Por otro lado, se determinó la velocidad de oxidación química de sulfuro bajo condiciones abióticas, para determinar la cantidad de sulfuro que puede oxidarse espontáneamente en presencia de oxígeno. La actividad sulfuro oxidante y la velocidad de oxidación

química se calcularon a partir del consumo de oxígeno medido en botellas de borosilicato de 500 mL, utilizando un respirómetro N-CON *Compu-OX 244*. Para esta determinación se usó el mismo medio que el descrito en el apartado 6.1.3. El principio de operación del respirómetro se basa en la caída de presión generada durante el consumo de  $O_2$  por medio de un sensor de presión; mientras el  $CO_2$  producido es removido de la fase gaseosa y captado en una trampa de hidróxido de potasio. Con la activación del sensor de presión, el sistema suministra un pulso de  $O_2$  al reactor, automáticamente se registra este evento y el tiempo en el que ocurre. El volumen de soporte plástico con biopelícula se ajustó para tener siempre 10 mg SVI. Las botellas se alimentaron con 3 mM de sulfuro ( $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) y como fuente de carbono se utilizó  $NaHCO_3$  a una concentración de  $2500 \text{ mg L}^{-1}$ . Las pruebas se realizaron por duplicado con un volumen de operación de 50 mL, a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  y a un pH de 8.0. Las botellas en las que se llevó a cabo la prueba de oxidación química fueron esterilizadas durante 20 minutos a  $120^\circ\text{C}$  después de inocularse para asegurar condiciones abióticas.

### **6.1.8 Velocidad de consumo de oxígeno ( $qO_2X$ )**

Fue necesario determinar esta variable para calcular el coeficiente volumétrico de oxígeno ( $kl_a$ ) que permite conocer la transferencia de oxígeno en el sistema. La velocidad de consumo de oxígeno ( $qO_2X$ ) se determinó midiendo la concentración de oxígeno disuelto en el reactor, utilizando un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto Applisens sensor dissolved oxygen (L=590mm 20 L) y registrador digital *OD controller 565.2 B&C Electronics*. El electrodo fue colocado en el puerto para electrodo (Figura 6.1B). El reactor fue operado en lote durante un día, con las partículas inmovilizadas y alimentado con medio mineral sin sustratos, a un flujo de aire de  $2.28 \text{ L d}^{-1}$ , con la finalidad de consumir los sustratos residuales. Esta operación se realizó también con los flujos de aire de  $3.42$  y  $5.4 \text{ L d}^{-1}$ . Después de un día de ayuno se midió la concentración de oxígeno disuelto que presentaba el

sistema a los diferentes flujos evaluados y de esta forma se determinó la concentración máxima de oxígeno disuelto. Al alcanzar la saturación de oxígeno disuelto en el medio mineral, se dejó de alimentar el aire y se comenzó a introducir el medio de cultivo con los sustratos (Tabla 6.2), y se registró el cambio de oxígeno disuelto con respecto al tiempo. Con los datos obtenidos se calculó la pendiente al graficar el consumo de oxígeno disuelto con respecto al tiempo, para obtener la velocidad de consumo de oxígeno. El procedimiento se realizó por duplicado para cada flujo evaluado. La concentración de biomasa ( $X$ ) que tenía el reactor al realizar el experimento fue de  $270 \text{ mg SVI L}^{-1}$ ; se estimó a partir de que en  $5 \text{ mL}$  de soporte inmovilizado se tenían  $4.5 \text{ mg SVI L}^{-1}$  y que el reactor contenía  $300 \text{ mL}$  de soporte inmovilizado.

La concentración de oxígeno residual se determinó durante la operación en continuo del reactor en cada etapa.

## **6.2 Métodos de análisis**

### **6.2.1 Cuantificación de sulfato, tiosulfato y lactato**

El sulfato, tiosulfato y lactato fueron determinados por electroforesis capilar. Este método se basa en la migración electroforética de iones que al aplicar una corriente a través de una columna capilar, causa una migración diferencial de los componentes de la muestra (aniones y cationes) al electrodo polarizado con la carga opuesta. El electrolito de trabajo ioniza la muestra, acelerando la migración de las moléculas. El tensoactivo (CIA Pack Anion) y el vacío suministrado a la columna hacen que la muestra fluya por el capilar, hasta el detector. El método se realizó con un analizador de iones (CIA 4000, Millipore), a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Se empleó una columna capilar de sílice fundida, de  $60 \text{ cm}$  de largo y  $75 \mu\text{m}$  de diámetro interno, se aplicó una corriente de  $18 \mu\text{A}$  y un suministro de energía negativo con un voltaje de  $20\text{KV}$ . El modo de la inyección fue hidrostática a  $10 \text{ cm}$  de altura por  $30$  segundos.

Los sulfoxianiones ( $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) se determinaron a partir de una muestra diluida con agua desionizada y filtrada a través de una membrana de nylon con poro de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se utilizó un electrolito de trabajo preparado con 4 mM de cromato de sodio y 0.5 mM del reactivo CIA Pack Anion (Waters). La absorbancia se midió en la región ultravioleta con lámpara de mercurio a 254 nm. Los tiempos de toma de muestra, de corrida y purga fueron 4 segundos, 5 y 2 minutos respectivamente.

Para la determinación de lactato, las muestras fueron diluidas y filtradas de la misma forma que las muestras azufradas. Como electrolito de trabajo se utilizó una solución de 1.02 g  $\text{L}^{-1}$  de ftalato ácido de potasio y 0.5 mM del reactivo CIA Pack Anion (Waters) a un pH de 5.6, ajustado con una solución de 100 mM de NaOH. La respuesta fue medida a la misma absorbancia y región ultravioleta que se utilizó para los iones azufrados. El tiempo de corrida fue de 10 minutos y los tiempos de toma de muestra y purga fueron de 5 y 2 minutos respectivamente.

### **6.2.2 Cuantificación de ácidos grasos volátiles**

Las muestras para la determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV) acetato, propionato y butirato se centrifugaron por 5 minutos a 14000 rpm. Se tomó una alícuota de 950  $\mu\text{L}$  y se acidificó con 50  $\mu\text{L}$  de HCl diluido al 50%. Las muestras se conservaron a  $-4^\circ\text{C}$  para su análisis posterior. Los AGV se determinaron por cromatografía de gases usando un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 automático equipado con una columna AT1000 y un detector de ionización de flama (FID). El flujo de nitrógeno como gas acarreador fue de 40  $\text{mL min}^{-1}$ . Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron 80, 200 y 280  $^\circ\text{C}$  respectivamente y se mantuvieron condiciones isotérmicas.

### **6.2.3 Cuantificación de azufre elemental**

En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona rápidamente con cianuro para formar el complejo tiocianato, este complejo puede ser determinado colorimétricamente por la adición de acetona con cloruro férrico (Bartlett y Scoog, 1954). El método es sensible a concentraciones de 2 ppm de azufre elemental.

Para determinar el azufre elemental de muestras del reactor, se tomaron 10 mL del efluente, previamente medido y homogenizado. La alícuota fue evaporada a 45 °C, por tres horas. El sólido obtenido fue pulverizado, pesado y colocado en un matraz con 25 mL de éter de petróleo y se dejó en reposo durante 24 horas para permitir la disolución del azufre elemental en el éter. Se tomó una alícuota de 5 mL y se colocó en un matraz aforado de 25 mL agregando 15 mL de solución de cianuro de sodio y se dejó reposar por 2 minutos para que se llevara a cabo la formación de tiocianato y se aforó con solución de acetona. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución formada y se colocó en tubos HACH y se agregaron 5 mL de una solución de cloruro férrico, que forma un complejo colorido que permite cuantificar el azufre elemental por absorbancia. La concentración se obtiene de una curva de calibración preparada con estándares de azufre elemental. El blanco se preparó con 5 mL de solución de acetona y 5 mL de cloruro férrico.

Además de la preparación de las muestras del reactor, se recomienda preparar una muestra de concentración conocida de azufre elemental (20 ppm), una vez determinada la concentración de azufre elemental con la curva patrón y de ser así considerando el factor de dilución, se calcula el porcentaje de azufre elemental en la muestra. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Espectronic 20<sup>+</sup> con una lámpara de tungsteno a 465 nm.

#### 6.2.4 Determinación de sulfuro por yodometría

Para la determinación de sulfuro en soluciones acuosas se utilizó el método yodométrico (Métodos Estándar para el análisis de aguas residuales, 1985), que se basa en la capacidad oxidante débil del yodo frente a un reductor fuerte como es el ion sulfuro, en medio ácido. La medición se hace en forma indirecta por una valoración en retroceso del yodo remanente por titulación, empleando una solución estándar de tiosulfato de sodio. Este es un método confiable para determinar sulfuro en concentraciones mayores de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  si no se tienen interferencias y si se evita la pérdida del  $\text{H}_2\text{S}$  gaseoso.

Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de colectarse. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se adicionaron 5 mL de solución de yodo, 10 mL de agua destilada, 1 mL de HCl 3N y 10 mL de la muestra problema sin agitar y manteniendo el matraz en oscuridad. Se dejó reposar por 10 minutos y se procedió a titular lentamente con la solución de tiosulfato de sodio, hasta obtener una coloración amarilla, se adicionó 0.5 a 1 mL del indicador de almidón. La muestra adquiere una coloración oscura, debido a que el yodo se fija en el almidón formando un complejo colorido, que al continuar con la titulación cambia a incoloro o vira de violeta oscuro a un color blanquecino.

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

La concentración de sulfuro se calcula a través de la ecuación 6.1.

$$S^{2-} (\text{mgL}^{-1}) = \frac{((A \times B) - (C \times D))}{V} \times \text{meqS}^{2-} \dots\dots\dots (\text{Ec. 6.1})$$

donde,

A= mL solución de yodo

B= normalidad de la solución de yodo

C= mL solución de tiosulfato  
D= normalidad solución de tiosulfato  
V= volumen de la muestra (mL)  
meq  $S^{2-}$  = 16000 mg $S^{2-}$

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

#### **6.2.5 Determinación de carbono inorgánico**

El carbono inorgánico se midió con un analizador de carbono orgánico total. El principio de su determinación se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presentan las moléculas poliatómicas de gas como el  $CO_2$ . El equipo utilizado fue un analizador de carbono orgánico total modelo TOC-5000 Shimadzu TM, que cuenta con un tubo de combustión para carbón total que contiene un catalizador para la combustión y es calentado a 680 °C. Como gas de arrastre utiliza aire de alta pureza.

La muestra es filtrada a través de una membrana de nylon con poro de 0.2  $\mu m$  de diámetro y se introduce mediante un inyector al tubo de combustión en donde los componentes del carbón total se descomponen. Los productos de la combustión pasan por un analizador de gas infrarrojo en donde se detecta el  $CO_2$  generando.

#### **6.2.6 Cuantificación de oxígeno disuelto**

La concentración de oxígeno en la fase líquida fue determinada en el reactor, mediante un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (Applisens sensor dissolved

oxygen L=590mm 20L) calibrado en un intervalo de 0.0 hasta 5.45 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, que es la concentración correspondiente a la saturación de medio de cultivo a las condiciones de presión de la Ciudad de México, el electrodo fue conectado a un registrador-controlador digital de oxígeno disuelto *OD controller 565.2 B&C Electronics*.

### 6.2.7 Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Se realizó por gravimetría, de acuerdo al método recomendado en los Métodos Estándar para el análisis de aguas residuales (1985). Los crisoles se ponen a peso constante, un volumen de 10 mL de muestra homogénea se depositó en el crisol y el líquido se evaporó en una parrilla a baja temperatura, para evitar ebullición y pérdidas por proyección sin llegar a sequedad total. Las muestras en los crisoles se secaron en una estufa a 105 °C por una hora, se colocaron en un desecador por 15 minutos. Se pesaron y se obtuvo el contenido de sólidos suspendidos totales. El contenido de sólidos suspendidos fijos se midió después de mantener la muestra 30 minutos en una mufla a 550 °C.

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST), se calcula de la siguiente forma:

$$gSST / L = (B-A)/V$$

Donde A = peso del crisol (g).

B = peso del crisol + residuo (g), secado a 105 °C

V = volumen de muestra (L)

Los sólidos suspendidos fijos (SSF).

$$gSSF / L = (C-A)/V$$

A = peso de crisol (g)

C= peso del crisol + residuo (g), incinerado 550 °C

V = volumen de la muestra (L).

Y por diferencia se obtienen los sólidos suspendidos volátiles.

$$SSV (g/L) = SST - SSF$$

### **6.2.8 Determinación de biomasa inmovilizada**

Se llevó a cabo por gravimetría una vez desprendida la biomasa del soporte por sonicación. Se colocaron filtros Whatman de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 55 mm de diámetro en charolas de aluminio, y se secaron en una mufla durante 30 minutos a una temperatura de 550 °C. Una vez fríos se registró el peso constante. En una probeta de 100 mL que tiene una oliva de evacuación en la parte inferior se adicionaron 5 mL de soporte con biomasa inmovilizada y se lavaron con agua destilada para retirar los sólidos no adheridos al soporte que estuvieran presentes en la muestra, drenándolos por la parte inferior. A continuación se tomaron con una espátula los 5 mL de soporte y se introdujeron en una botella serológica de 60 mL a la que se le adicionaron 20 mL de agua destilada; la botella se tapó con un tapón de hule y se colocó en un baño sónico (Sonicor) durante 5 minutos, después de este tiempo con una jeringa de 10 mL se extrajo la fase líquida y se filtró con vacío utilizando un filtro de fibra de vidrio. Este procedimiento se repitió hasta que el soporte se encontró libre de biomasa, lo cual se apreció cuando el soporte alcanzó una apariencia blanquecina y en el papel filtro no se observó biomasa. Para la determinación de los sólidos totales y fijos, se consideraron los pesos de todos los filtros utilizados. Al final, el soporte se secó en la estufa a una temperatura de 55°C y se determinó el peso (Castilla, 1997).

Cálculos:

$$\text{mg SST} = \Sigma A - \Sigma B$$

Donde:

mg ST= miligramos de sólidos totales

$\Sigma A$  = La suma de los pesos de los papeles filtro + la muestra secada a 105 °C

$\Sigma B$  = La suma de los pesos de los papeles filtro sin muestra

Cálculos:

$$\text{mg SSF} = \Sigma C - \Sigma B$$

Donde:

$\Sigma C$  = La suma de los pesos de los papeles filtro + muestra calcinada a 550 °C

*Sólidos volátiles inmovilizados (SVI)*

$$\text{mg SVI} = \text{ST} - \text{SF}$$

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

### **6.2.9 Determinación de proteína soluble**

La proteína fue determinada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) después de desprender la biomasa adherida al soporte plástico por sonicación como se describe en el apartado 6.2.8. De la fase líquida que se obtuvo se determinó la proteína soluble. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Espectronic 20<sup>+</sup> con una lámpara de tungsteno a 465 nm y comparada contra una curva de calibración de albúmina sérica bovina.

Para llevar a cabo la determinación de la proteína se prepararon las siguientes soluciones:

*Solución A.* 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> diluidos en 1 L de NaOH 0.1 N

*Solución B.* 1g CuSO<sub>4</sub> diluido en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada

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

*Solución estándar de Albúmina.* 0.03 g de albúmina diluidos en 100 mL de agua

Reactivo de Fenol Folin Ciocalteu

### **6.2.10 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB)**

La preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido, consistió en mantener las partículas durante un periodo de 24 horas a 4 °C en una solución de

glutaraldehído al 2%, que se utilizó como fijador. Posteriormente se retiró el fijador, haciendo lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 2 mM a pH de 7.2. Retirado el primer fijador se hace una segunda fijación con tetróxido de osmio. Después de dos horas fue retirado el fijador y se inició la deshidratación de muestras con inmersiones sucesivas en soluciones de acetona de 30 a 100%. Al finalizar la deshidratación, la muestra se trasvasó a cápsulas para hacer una desecación a punto crítico con CO<sub>2</sub> en un equipo Samdri-780B. Al terminar el proceso las muestras se colocaron en un portamuestras de aluminio y fueron cubiertas con carbón y oro en un equipo Denton Vacuum Desk III y se observaron en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900 LV (Bozzola y Russell, 1991).

### 6.3 Cálculos de los parámetros de operación

#### 6.3.1 Parámetros de operación

$$TRH = \frac{V_r}{Q_l} = \text{Tiempo de residencia hidráulico (d)}$$

$$Q_v = \frac{Q_l [DQO]_{al}}{V_r} = \text{velocidad de carga orgánica (g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$$

$$Q_v SO_4^{2-} = \frac{Q_l [SO_4^{2-}]_{al}}{V_r} = \text{velocidad de carga de sulfato (g SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$$

$$R = \frac{F_T}{F_a} = \text{tasa de recirculación}$$

Donde:

$V_r$  = volumen del reactor (L)

$Q_l$  = flujo volumétrico (L d<sup>-1</sup>)

DQO<sub>al</sub> = demanda química de oxígeno alimentada (g L<sup>-1</sup>)

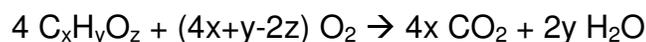
SO<sub>4</sub><sup>2-</sup><sub>al</sub> = sulfato alimentado (g L<sup>-1</sup>)

$F_T$  = flujo total (L d<sup>-1</sup>)

$F_a$  = flujo alimentación (L d<sup>-1</sup>)

### 6.3.2 Cálculo del equivalente teórico de DQO

El equivalente teórico de la demanda química de oxígeno (DQO) de los ácidos grasos volátiles (AGV) y lactato utilizados en los experimentos se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Tarvin y Buswell, 1934):



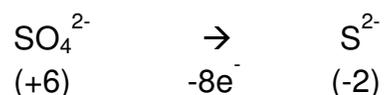
Las equivalencias teóricas utilizadas en los cálculos fueron las siguientes:

Ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ) y acético ( $C_2H_4O_2$ ): 1.066 g DQO/g

Ácido Propiónico ( $C_3H_6O_2$ ): 1.51 g DQO/g

Ácido Butírico ( $C_4H_8O_2$ ): 1.81 g DQO/g

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 usado de acuerdo a la siguiente reacción:



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



Por lo que se pueden hacer las siguientes equivalencias:

\* 2 mol de sulfato  $\equiv$  4 moles de oxígeno  
 96 g de sulfato  $\equiv$  64 g de oxígeno = 64 g de DQO  
 1 g sulfato  $\equiv$  2/3 g DQO = 0.66 g DQO

\* 2 mol de sulfuro  $\equiv$  4 moles de oxígeno  
 32 g sulfuro  $\equiv$  64 g de oxígeno = 64 g de DQO  
 1 g sulfuro  $\equiv$  2 g DQO

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.

### 6.3.3 Cálculo de las actividades específicas

La actividad específica sulfato reductora se calculó con la pendiente obtenida al graficar el  $SO_4^{2-}$  consumido menos el sulfato consumido en la prueba control (sin fuente de carbono) con respecto al tiempo y dividida entre la concentración de SVI en la botella. Utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica sulfato reductora} = \frac{mSO_4^{2-}}{[SVI]} [=] \frac{mmol SO_4^{2-}}{g SVI \times d} \dots\dots\dots (\text{Ec. 6.2})$$

La actividad metanogénica se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar la cantidad de metano producido a través del tiempo, ocupando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad metanogénica específica} = \frac{mCH_4}{V_B \times [SVI] \times fc} [=] \frac{g DQO CH_4}{g SVI \times d} \dots\dots\dots (\text{Ec. 6.3})$$

En la actividad sulfuro oxidante el sulfuro consumido fue calculado por estequiometría (Ec. 6.4), a partir del oxígeno cuantificado por respirometría. La actividad fue calculada con la pendiente obtenida al graficar el  $HS^-$  consumido con respecto al tiempo y dividida entre la concentración de SVI en la botella. Utilizando la ecuación 6.5:



$$\text{Actividad sulfuro oxidante} = \frac{mHS^-}{[SVI]} [=] \frac{mmol HS^-}{g SVI \times d} \dots\dots\dots (\text{Ec. 6.5})$$

Donde:

$mSO_4^{2-}$  =pendiente de la DQO consumida con el tiempo ( $mM SO_4^{2-} d^{-1}$ )

$[SVI]$  =concentración de sólidos volátiles inmovilizados ( $g SVI L^{-1}$ )

$mCH_4$  =pendiente de la producción de metano acumulativa ( $L d^{-1}$ )

$f_C$  = conversión de  $\text{CH}_4$  a DQO =  $0.35 \text{ L CH}_4 \text{ g DQO}^{-1}$  a temperatura y presión estándar.

$V_B$  = Volumen de líquido en la botella

$m_{\text{HS}^-}$  = pendiente del sulfuro consumido con el tiempo ( $\text{mM HS}^- \text{ d}^{-1}$ )

### 6.3.4 Cálculos para la alimentación del flujo de aire

El criterio utilizado para la alimentación de aire se hizo a partir del sulfato alimentado y de la suposición de que al mantener una relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 0.67, todo el sulfato alimentado sería reducido a sulfuro, por estequiometría sabemos que 1 mol de  $\text{SO}_4^{2-}$  produce 1 mol de  $\text{HS}^-$  (Ec. 6.6). Considerando que la relación  $\text{O}_2/\text{HS}^-$  de 0.5 favorece la producción de  $\text{S}^0$  (Ec. 6.7), se calculó el número de moles ( $n$ ) de oxígeno necesario.



Para calcular el volumen de oxígeno en la alimentación se utilizó la ecuación de los gases ideales, considerando la presión atmosférica de la Cd. de México y la temperatura a la que se operaba el reactor

$$PV = nRT$$

$$V = \frac{nRT}{P}$$

$$T = 30 \text{ }^\circ\text{C} = 203.15 \text{ }^\circ\text{K}$$

$$P = 0.78 \text{ atm}$$

$$R = 0.082 \text{ L atm mol}^{-1} \text{ }^\circ\text{K}^{-1}$$

$$n = \text{moles de O}_2$$

Como el reactor fue alimentado con aire se consideró la fracción de oxígeno en el aire.



Para la determinación tanto del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, como la velocidad específica de consumo de oxígeno, se debe hacer la suposición, de que durante el experimento la concentración de biomasa permanece constante.

Realizando un cambio de variable y derivando con respecto al tiempo obtenemos:

$$y = C^* - C_L$$

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{dC_L}{dt}$$

$$\frac{dC_L}{dt} = -\frac{dy}{dt}$$

Definimos los siguientes términos como A y K, y sustituimos en la ecuación 6.8.

$$A = qO_2X$$

$$K = k_L a_{O_2}$$

$$-\frac{dy}{dt} = Ky - A$$

$$\frac{dy}{dt} = -(Ky - A)$$

Resolviendo la ecuación por variables separables;

$$\int_{y=C^*}^y \frac{dy}{Ky - A} = -\int_{t=0}^t dt$$

$$a \quad t = 0 \qquad t = t$$

$$y = (C^* - C) = C^* \qquad y = y$$

y la integral con un nuevo cambio de variable;

$$\int_{y=C^*}^y \frac{dy}{Ky - A}$$

$$SI: u = Ky - A$$

$$du = K dy$$

$$dy = \frac{1}{K} du$$

$$\frac{1}{K} \int \frac{du}{u} = \frac{1}{K} \ln u$$

$$\int_{y=C^*}^y \frac{dy}{Ky - A} = \frac{1}{K} \ln(Ky - A) \Big|_{y=C^*}^y = \frac{1}{K} \ln \left( \frac{Ky - A}{KC^* - A} \right)$$

Por lo tanto, de la resolución de la integral se obtuvo:

$$\ln \left( \frac{Ky - A}{KC^* - A} \right) = -K \times t$$

Regresando a las variables originales y sustituyendo, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\ln \left( \frac{k_L a (C^* - C_L) - q O_2 X}{k_L a C^* - q O_2 X} \right) = -k_L a \times t$$

Dividiendo el cociente del argumento del logaritmo entre  $k_L a$ , obtenemos:

$$\ln \left( \frac{(C^* - C_L) - \frac{q O_2 X}{k_L a}}{C^* - \frac{q O_2 X}{k_L a}} \right) = -k_L a \times t$$

Conociendo que en la zona I del esquema 1

La  $\frac{dC_L}{dt} = 0$ , por lo tanto:

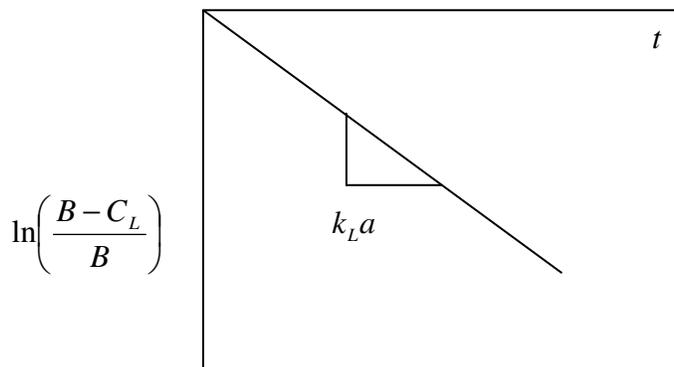
$$k_L a (C^* - C_L) = q O_2 X \dots\dots\dots(\text{Ec. 6.9})$$

Despejando  $C_L$  de la ecuación anterior, se obtiene:

$$C_L = C^* - \frac{qO_2 X}{k_L a} \dots\dots\dots(\text{Ec. 6.10})$$

$C_L$  en la ecuación 6.10 es por definición  $B$ , el cual lo podemos observar en el esquema 1 y representa la concentración de oxígeno disuelto al inicio del experimento.

Graficando la ecuación 6.10 podemos calcular  $k_L a$



Donde:

$qO_2$  = demanda específica de consumo de oxígeno (mg  $O_2$  / mg biomasa inmovilizada<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Ver apartado 6.1.8.

$X$  = concentración celular (mg biomasa inmovilizada L<sup>-1</sup>)

$C^*$  = concentración máxima de oxígeno disuelto en el reactor (mg  $O_2$  L<sup>-1</sup>)

$C$  = concentración de oxígeno disuelto residual (mg  $O_2$  L<sup>-1</sup>)

$k_L a$  = coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h<sup>-1</sup>)

### 6.3.6 Cálculos de oxidación-reducción

El balance redox se realizó a partir de los miliequivalentes de electrones ( $\text{meq e}^-$ ) de las reacciones parciales involucradas en el proceso multiplicado por las concentraciones molares de los reactivos.

$$\text{meq e}^- \text{ L}^{-1} = [\text{mM}] \times \left[ \frac{\text{meq} \times \text{L}^{-1}}{\text{mM}} \right] \dots\dots\dots (\text{Ec. 6.9})$$

Donde:

$[\text{mM}]$  = concentración del sustrato

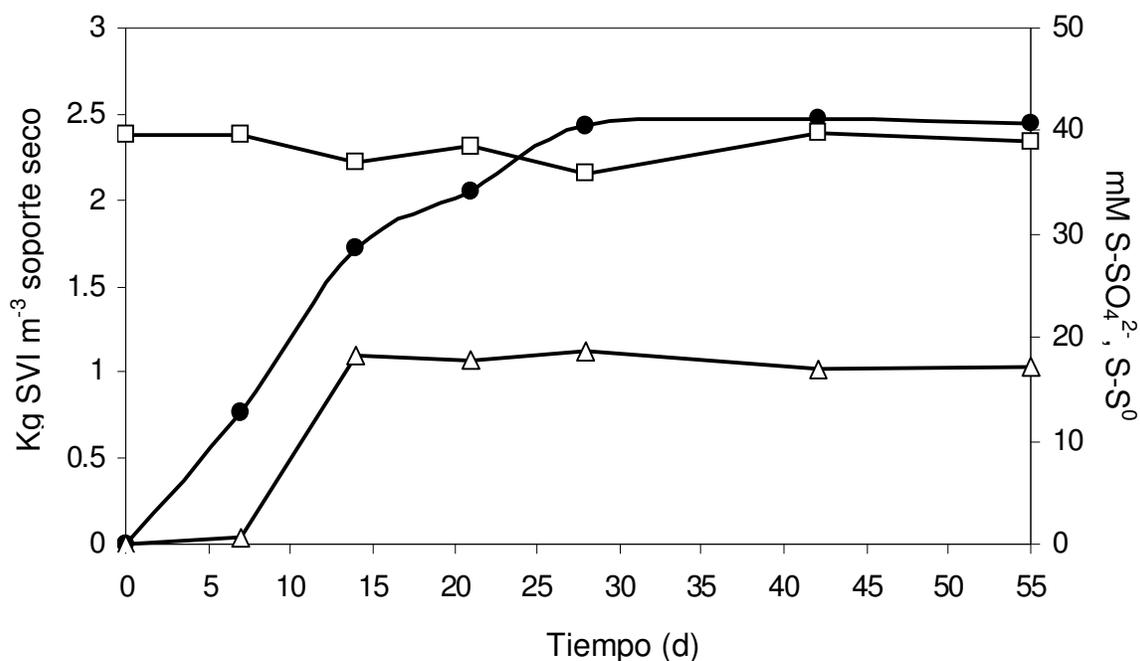
$\left[ \frac{\text{meq} \times \text{L}^{-1}}{\text{mM}} \right]$  = número de  $\text{meq e}^-$  donados o aceptados por mM de sustrato

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Inmovilización del consorcio bacteriano en el RLF

Con la finalidad de obtener una biopelícula mixta sulfato reductora-sulfuro oxidante el reactor se operó en lote durante 55 días, se alimentó un flujo de aire de  $3.5 \text{ L min}^{-1}$  alcanzando una concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida de  $0.05 \text{ mmol L}^{-1}$ . Se utilizó ácido láctico como donador de electrones y sulfato de sodio como aceptor, a una relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 0.76.

Después de un periodo de 7 días de operación en lote se encontró que los microorganismos ya estaban adheridos ( $0.75 \text{ kg SVI m}^{-3}$ ), y para el día 28 se alcanzó la mayor concentración de biomasa adherida, siendo de  $2.4 \text{ kg SVI m}^{-3}$  de soporte seco, con una velocidad de formación de biomasa de  $0.059 \text{ g SVI d}^{-1}$  (Figura 7.1). A partir del día 28, el perfil de inmovilización alcanzó el estado estacionario. Durante la inmovilización se observaron depósitos color amarillo-blanquecino, una característica del azufre elemental de origen biológico (Lens y Hulshoff Pol, 2000). Los análisis de azufre elemental sobre dichos depósitos confirmaron la producción de este compuesto. La velocidad de producción de azufre elemental fue de  $2.49 \text{ mM S}^0 \text{ d}^{-1}$ . Para el día 14 la producción de  $\text{S}^0$  fue de  $18.2 \text{ mM}$ , que correspondió a una transformación de 50% del  $\text{SO}_4^{2-}$  alimentado, a partir de este día la producción de  $\text{S}^0$  alcanzó el estado estacionario. Sin embargo, la producción de azufre elemental aparentemente no estaba asociada al crecimiento microbiano inmovilizado, como se observa en la Figura 7.1.



**Figura 7.1.** Concentración de azufre de sulfato  $S-SO_4^{2-}$  alimentado (□), perfiles de concentración de biomasa (●) y producción de azufre elemental (Δ).

El perfil del rendimiento de  $S^0$  podría explicarse a partir de los tiempos de duplicación de las poblaciones microbianas, ya que se conoce que algunas BSR presentan tiempos de duplicación entre 3 a 4 horas (Widdel, 1988) que son relativamente cortos comparados con los tiempos de duplicación de las BSO que fluctúan entre 18-19 horas (González, 2002). Esto indicaría que las BSR predominaron con respecto a las BSO en la biopelícula. Sin embargo, este estudio no nos permitió conocer si la producción de  $S^0$  estuvo asociada o no al crecimiento, ya que en el perfil de crecimiento están incluidas ambas poblaciones microbianas.

El porcentaje de recuperación de  $S^0$  obtenido en este trabajo fue significativamente mayor al reportado por van den Ende *et al.* (1997), quienes obtuvieron 15% del  $S-SO_4^{2-}$  alimentado en forma de  $S^0$  en un proceso donde acoplaron la sulfato reducción y la sulfuro oxidación bajo condiciones axénicas y óxicas utilizando células libres de *Desulfovibrio desulfuricans* y *Thiobacillus thioparius*. Por otro lado hay procesos puramente sulfuro oxidantes con porcentajes

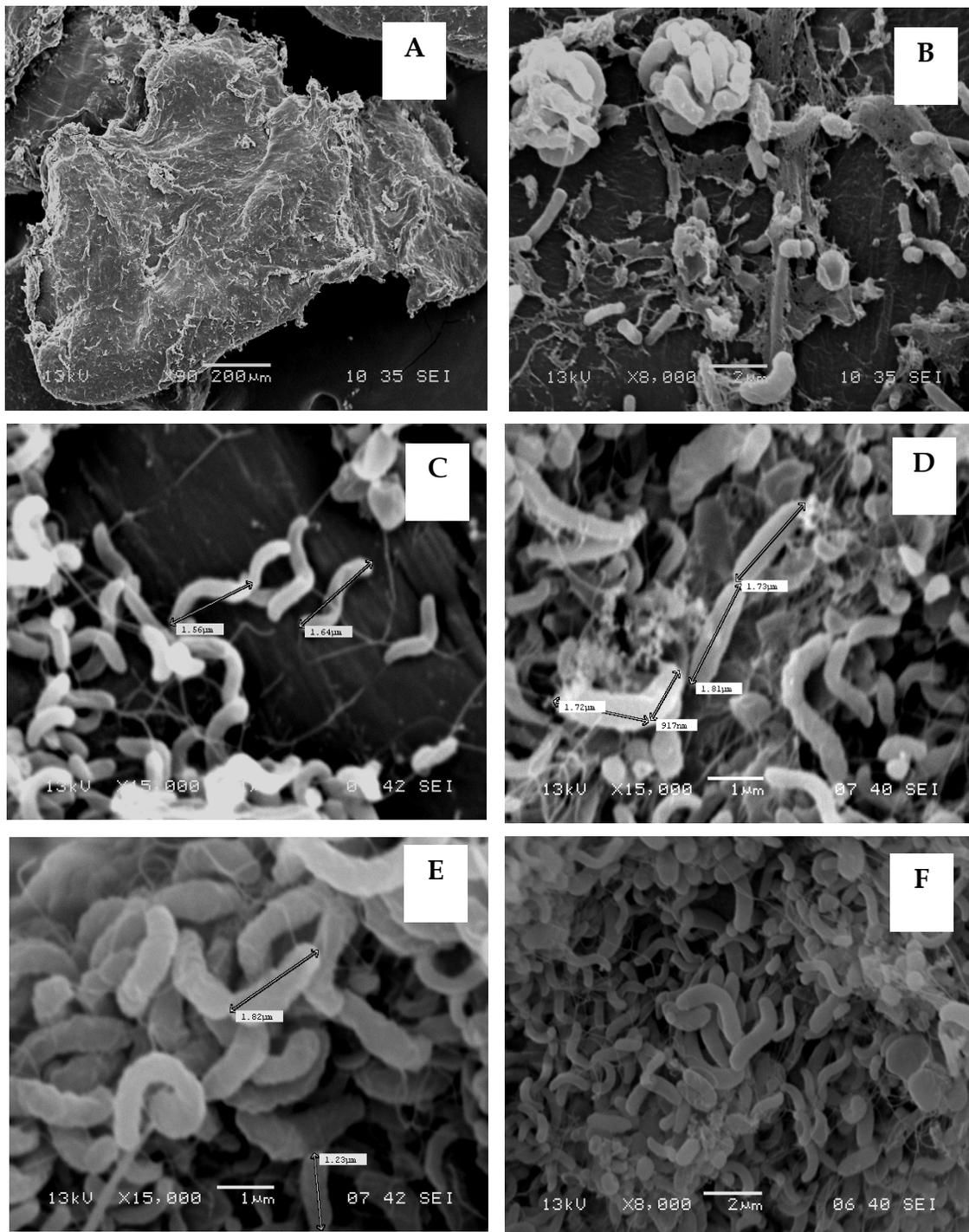
de recuperación de  $S^0$  similares al presente trabajo, como fue reportado por Stefess *et al.* (1996) y Visser *et al.* (1997a) quienes obtuvieron entre 47% y 50% de recuperación respectivamente, utilizando sulfuro como donador de electrones y un cultivo puro de *Thiobacillus neapolitanus*.

### 7.1.1 Seguimiento de la inmovilización por microscopía electrónica de barrido

La evolución de la biopelícula fue observada también a través de microscopía electrónica de barrido. En la Figura 7.2 podemos observar el soporte de polietileno libre de biomasa, así como la microflora adherida a diferentes tiempos de operación del reactor. En la Figura 7.2 A se presenta la micrografía del soporte limpio donde se aprecia una superficie irregular con intersticios, surcos y cavidades. La superficie irregular permitió la adhesión y desarrollo de los microorganismos los cuales colonizaron la mayor parte del área superficial del soporte a los 55 días (7.2 F). La biopelícula presentó células en forma de bacilos curvos de 1.6-3.0  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 7.2 C y D), las cuales se encontraron adheridas tanto individualmente como en forma de agregados, esta morfología es característica de las BSR (Holt *et al.*, 1994).

Por otro lado se observaron también bacilos con una longitud de 1-2  $\mu\text{m}$  (Figura 7.2 D y E) que es una morfología característica de algunas BSO (Holt *et al.*, 1994), así como también se puede apreciar la presencia de los exopolímeros extracelulares (Figura 7.2B).

Esta morfología, así como la formación de azufre elemental sugieren la presencia de ambas poblaciones microbianas. Sin embargo, una caracterización microbiana de la biopelícula a partir del análisis molecular del 16S ADNr nos permitiría conocer los géneros que participaron en el proceso sulfato reductor-sulfuro oxidante.



**Figura 7.2** Micrografías de la biopelícula formada. (A) Soporte limpio (90X), (B) biomasa inmovilizada en 14 días (8000X), (C) bacilos curvos (15000X), (D) bacilos (15000X), (E) bacilos inmovilizados (15000X) y (F) biomasa inmovilizada en 55 días (8000X).

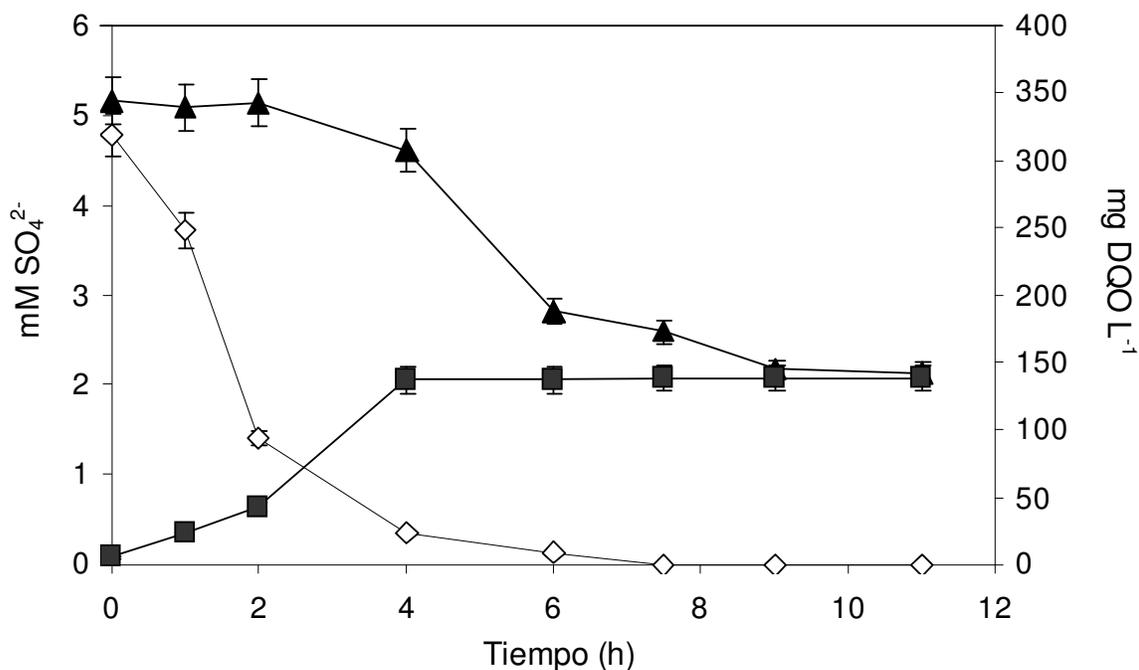
### **7.1.2 Actividades específicas durante la inmovilización**

Para confirmar la presencia de las BSR y BSO en el soporte plástico se evaluaron sus respectivas actividades específicas, después de operar el reactor en lote aproximadamente por 55 días.

El lodo con el que se inoculó el reactor provino de un reactor anaerobio en donde los metanógenos podrían estar presentes, por lo que se determinó la actividad metanogénica de la biopelícula con la finalidad de descartar o confirmar la presencia de esta población en el sistema.

Al analizar los resultados del experimento diseñado para la actividad metanogénica, no se presentó producción de metano, lo que nos permitió descartar la participación de esta población microbiana. Respecto a la actividad sulfato reductora se observó una rápida disminución del sulfato, la cual no estuvo completamente acoplada a la oxidación del lactato a acetato, como se observa en la Figura 7.3. La actividad sulfato reductora calculada a partir del sulfato consumido fue de  $79.50 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

El consumo total del sulfato adicionado en la prueba indicaría que en el medio pudo haber un donador alternativo de electrones, pues no se observó la oxidación del sustrato correspondiente al sulfato reducido. Los donadores alternos bien pudieron ser: sustratos residuales (AGVs),  $\text{S}^0$  presente en la biopelícula, polímeros endógenos o exopolímeros.



**Figura 7.3** Perfiles de consumo de sulfato (◇), lactato (▲); y producción acetato (■).

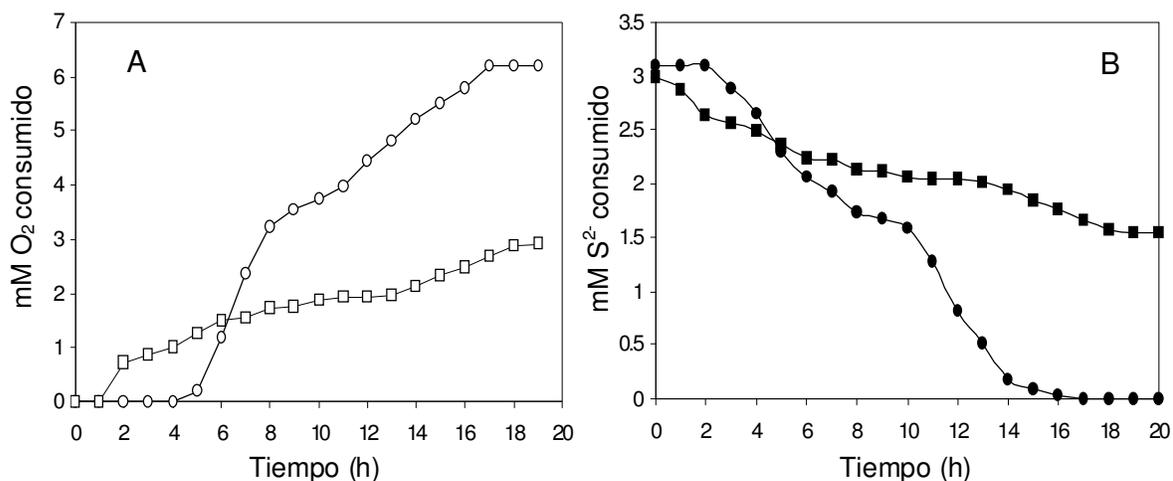
La comparación de la actividad específica sulfato reductora (AESR) con otros trabajos resulta un poco complicada, ya que normalmente se reporta en función del consumo de la DQO, en este trabajo no se calculó en función del donador de electrones, ya que la oxidación del lactato no estuvo completamente acoplada a la reducción del sulfato. Sin embargo la AESR ( $79.50 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) obtenida en este trabajo se encuentra muy próxima a las actividades sulfato reductoras de 84 a  $161 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ g biomasa d}^{-1}$ , observadas por Basu y Baldwin (2000) en diferentes soportes bajo condiciones autotróficas. A pesar de que las condiciones de cultivo fueron diferentes, el orden de magnitud de la AESR obtenida en este trabajo se encontró dentro de lo reportado para los sistemas de biopelícula.

Los experimentos de respirometría se llevaron a cabo para evaluar la velocidad específica de oxidación de los microorganismos sulfuro oxidantes adheridos a la biopelícula, así como para conocer el aporte de la oxidación química en el proceso.

En la figura 7.4 se muestra la disminución de concentración de sulfuro, la cual se calculó a partir del consumo del oxígeno y la siguiente reacción estequiométrica:



La oxidación biológica de sulfuro presentó una fase de retardo de dos horas seguida de una rápida disminución del mismo, con una velocidad de oxidación de  $0.22 \text{ mmol HS}^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y una actividad específica de  $30.76 \text{ mmol HS}^- \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $62 \text{ mmol HS}^- \text{ g proteína}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) (Figura 7.4 B). La actividad encontrada en este estudio está dentro del intervalo reportado por Celis-García (2004), que va desde 48 hasta  $2692.8 \text{ mmol HS}^- \text{ g proteína}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para cultivos axénicos y para consorcios de microorganismos sulfuro oxidantes.



**Figura 7.4** A) Consumo de oxígeno cuantificado por respirometría con biopelícula activa ( $\circ$ ) y biopelícula esterilizada ( $\square$ ). B) Perfil de consumo de sulfuro obtenido teóricamente a partir de la ecuación estequiométrica con biopelícula activa ( $\bullet$ ) y con biopelícula esterilizada ( $\blacksquare$ ).

La oxidación química del sulfuro alcanzó una velocidad de  $0.06 \text{ mmol HS}^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , que representó el 27% de la velocidad de oxidación biológica. Sin embargo, no se sabe si al estar presente la biomasa, el porcentaje de oxidación química será reproducible, ya que habrá una competencia entre el proceso biológico y el proceso

puramente químico y por lo tanto es difícil conocer el aporte de cada uno en el proceso global. Pero es posible estimar por estos resultados que el proceso biológico sería el predominante.

Los resultados de las pruebas de actividad anaerobia y aerobia, mostraron que a partir de un lodo anaerobio bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto fue posible la inmovilización de un consorcio microbiano mixto capaz de llevar a cabo la sulfato reducción, así como la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental por BSO. Se sabe que las aguas residuales que se tratan por procesos anaerobios tienen cierta concentración de oxígeno disuelto lo que explicaría la presencia, desarrollo y actividad de las BSO en el sistema. Al trabajar con un lodo anaerobio bajo concentraciones limitadas de oxígeno van der Zee *et al.* (2006) también observaron el desarrollo y actividad de BSO.

Los experimentos de cultivo en lote mostraron que varios parámetros intervienen en el control del proceso respiratorio sulfato reductor-sulfuro oxidante. Por lo tanto, para entender el proceso respiratorio en el RLFI en continuo se deberán evaluar y tomar en cuenta aspectos como: velocidades específicas de consumo, concentración de los sustratos, inhibición por sulfuro y oxígeno, así como la estequiometría de la reacción.

## **7.2 Operación en continuo del reactor de lecho fluidicado inverso**

La operación en continuo del RLFI, comenzó después de obtener la biopelícula. El reactor fue alimentado con ácido láctico como fuente de carbono y energía y con sulfato de sodio como aceptor de electrones. Se evaluaron tres velocidades de carga, que fueron obtenidas al aumentar la concentración de los sustratos en la alimentación. Para las tres cargas se mantuvo la misma relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.66. Cada una de las cargas representa una etapa de operación en el reactor.

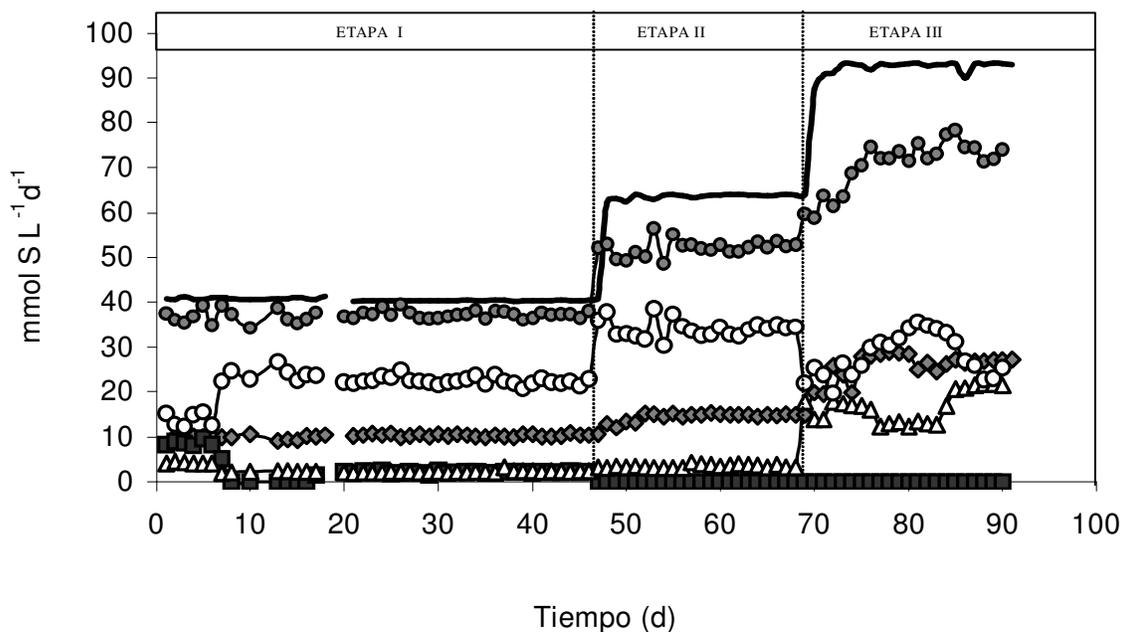
El reactor se operó en continuo por 91 días, el seguimiento del proceso sulfato reductor-sulfuro oxidante se realizó midiendo los compuestos carbonados y azufrados en el influente y efluente. Las condiciones de operación del RLFI se

resumen en el apartado 6.1.3. Los resultados obtenidos de la operación en continuo del RLFI se muestran en las Figuras 7.5 y 7.6.

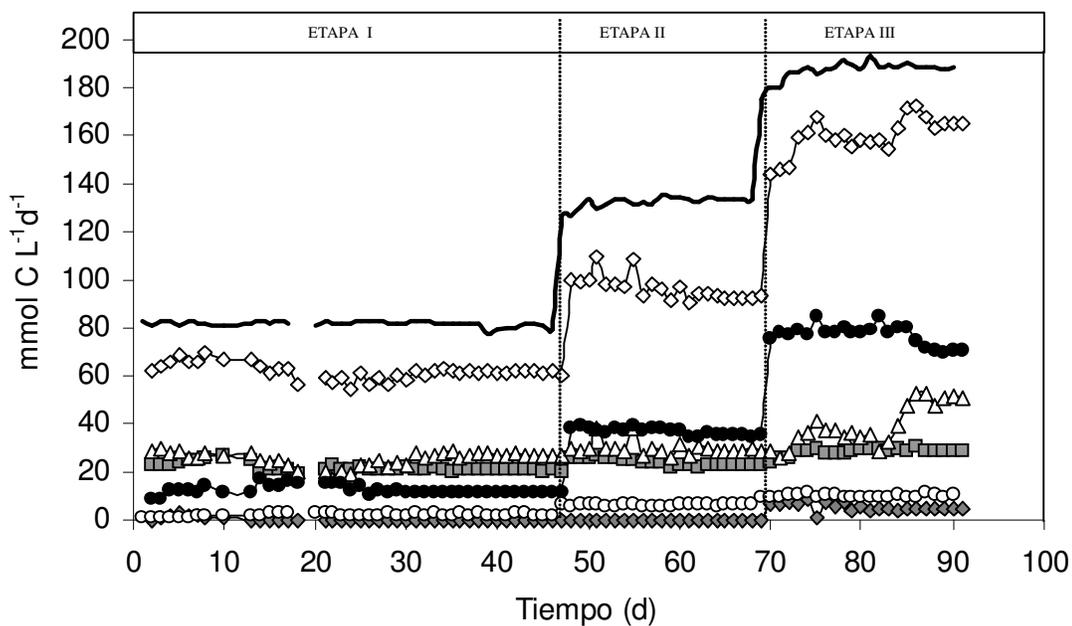
En la etapa I se observó producción de azufre elemental desde el inicio de la operación ( $15 \text{ mmol S}^0 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), alcanzando el estado pseudo-estacionario a partir del día 14, con una producción de  $23 \pm 3.28 \text{ mmol S}^0 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . La eficiencia de consumo de sulfato fue de 75% y la recuperación de  $\text{S}^0$  con respecto al  $\text{S-SO}_4^{2-}$  alimentado fue de 52% (Figura 7.5). El sulfuro en el efluente se mantuvo por debajo de  $2.6 \text{ mmol S-HS}^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y la concentración de oxígeno disuelto residual fue de  $0.12 \pm 0.015 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . El pH se mantuvo constante en un promedio de  $7.4 \pm 0.13$ . Con respecto a la fuente de carbono se obtuvo una eficiencia de transformación de lactato del 73.5% que fue recuperado como acetato y propionato principalmente (Figura 7.6).

En la etapa II podemos observar que del  $\text{SO}_4^{2-}$  alimentado se obtuvo una eficiencia de consumo de 77%, con una producción máxima de azufre elemental de  $38.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para el día 54 (Figura 7.5), que corresponde al 54% del  $\text{S-SO}_4^{2-}$  en el influente. La concentración de oxígeno disuelto residual fue de  $0.09 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$  y el pH se mantuvo cerca de la neutralidad en un promedio de  $7.2 \pm 0.1$ . De igual forma durante esta etapa se observó que el lactato nuevamente sufrió una oxidación incompleta; además de que se obtuvo un aumento en la concentración de acetato residual con respecto al propionato, contrario a lo observado en la primera etapa donde predominó el propionato.

En la última etapa la eficiencia de consumo de  $\text{SO}_4^{2-}$  fue de 72%, ligeramente por debajo de la eficiencia de la primera etapa (75%), sin embargo la producción de azufre elemental disminuyó, obteniéndose sólo 30% del  $\text{S-SO}_4^{2-}$  alimentado. En esta etapa no se observó un estado pseudo-estacionario con respecto a la velocidad de producción de  $\text{S}^0$  como se observó en las etapas anteriores. La transformación de lactato fue de 84%, recuperándose como acetato, propionato y butirato, principalmente. El sulfuro residual obtenido en esta etapa fue de  $16.6 \text{ mmol S-HS}^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , 6.4 veces mayor respecto a la etapa I.



**Figura 7.5** Velocidad de carga de S-sulfato (—), azufre total en el efluente (●), formación de azufre elemental (○), S-sulfuro residual (Δ), S-tiosulfato residual (■) y S-sulfato residual (◆)



**Figura 7.6.** Velocidad de carga de C-lactato (—), carbono total en el efluente (◇), C-lactato residual (■), y velocidades de formación de C-acetato (●), C-propionato (Δ), C-butirato (◆) y C-bicarbonato (○).

El balance de materiales de los compuestos azufrados y carbonados se llevó a cabo para las tres velocidades de carga evaluadas. En la Tabla 7.1, se presenta el balance de materia para el azufre, donde se muestra que hubo un faltante de 10, 18 y 24% para la etapa I, II y III respectivamente, el faltante de azufre para las tres etapas puede estar relacionado con la presencia de otros compuestos azufrados no cuantificados como sulfito,  $H_2S_{(gas)}$ , polisulfuros, politionatos y/o azufre utilizado para la formación de biomasa.

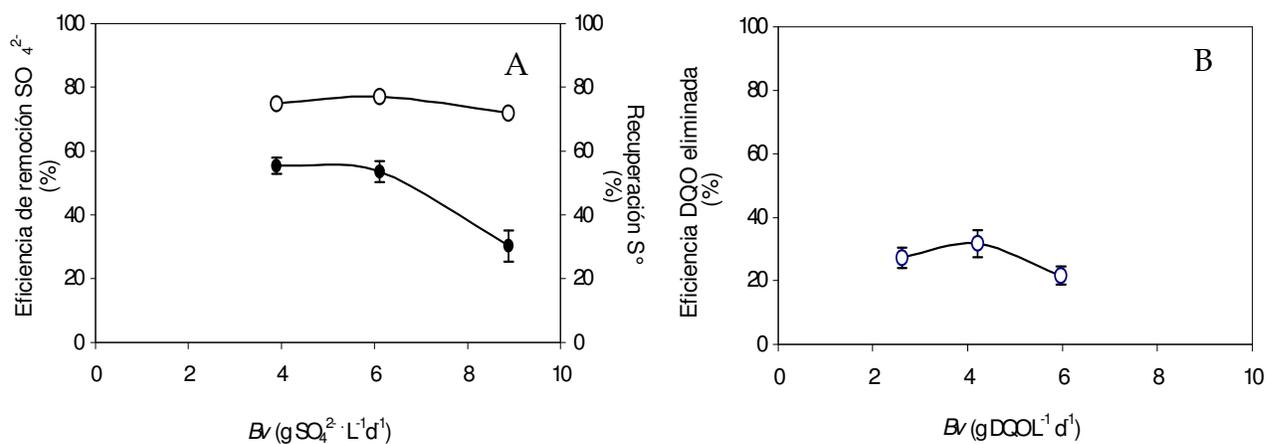
**Tabla 7.1** Balance de azufre para las diferentes velocidades de carga de sulfato en el RLFI.

Etapa	Influyente (mM d <sup>-1</sup> )	Efluente (mM d <sup>-1</sup> )				Remoción (%)	Recuperado (%)	
	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	S-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	S-S <sup>2-</sup>	S-S <sup>0</sup>	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	S <sup>0</sup>	S-Total
I	40.61 ± 0.30	10.18 ± 0.31	2.88 ± 2.6	2.61 ± 0.70	21.20 ± 3.28	75	52	90
II	63.64 ± 0.53	14.60 ± 0.87	0	3.47 ± 0.31	34.10 ± 2.01	77	54	82
III	92.47 ± 1.42	25.90 ± 2.8	0	16.59 ± 3.48	28.01 ± 4.72	72	30	76

Al incrementarse las velocidades de carga las eficiencias de remoción tanto de DQO como de sulfato no presentaron un cambio significativo (Figura 7.7A y B). Sin embargo, en términos de producción de azufre elemental, se observó que las dos primeras etapas no se vieron afectadas significativamente, mientras que la tercera etapa mostró una disminución en la recuperación del S<sup>0</sup> (Figura 7.7A). Posiblemente esto se debió a una inhibición por sulfuro de las BSO o al flujo de aire de 5.4 L d<sup>-1</sup> que generó espuma en el sistema causando una fricción dinámica entre las partículas, así como una compactación del lecho, que afectó la transferencia de oxígeno y la posterior oxidación del sulfuro, teniendo un residual cuya concentración alcanzó 16.6 mM. La concentración de sulfuro residual fue 4 veces mayor que la concentración máxima reportada como inhibitoria para el género *Thiobacillus*, que se encuentra entre 1.87 y 3.75 mM (Buisman *et al.*, 1990), por lo que en la etapa III la población sulfuro oxidante posiblemente se inhibió. Aunque debemos considerar que la concentración inhibitoria es muy variable, ya que está en función de diversos factores como pH, concentración de biomasa inicial, tipo de biomasa, etc. En el caso

de la población sulfato reductora la inhibición por sulfuro es menos probable, ya que Celis-García *et al.* (2004), observaron que la concentración de sulfuro que reduce a la mitad la tasa crecimiento ( $CI_{50}$ ) para la actividad sulfato reductora en un sistema similar fue de 34 mM de  $S^{2-}$ , el doble de la concentración observada en este estudio.

En la última etapa también es importante considerar que hubo formación de polisulfuro (no cuantificado), que pudo ser apreciado por la coloración verde-amarrillo que adquirió el sistema, característica que presenta este compuesto cuando se encuentra en soluciones acuosas. Se sabe que el polisulfuro es más tóxico que el propio sulfuro, aunque todavía se desconoce la concentración que causa una inhibición significativa (Lens y Hulshoff Pol, 2000).



**Figura 7.7** (A) Eficiencia de remoción de sulfato ( $\circ$ ) y recuperación de  $S^0$  ( $\bullet$ ) y (B) eficiencia de remoción de DQO en las tres etapas.

Respecto al balance de materiales de los compuestos carbonados, en la Tabla 7.2 se puede observar que los principales productos de la transformación del lactato consumido fueron acetato y propionato, los cuales representaron 64, 61 y 77% del carbono recuperado en las etapas I, II y III respectivamente. En el balance de carbono también se observó un faltante de 25, 27 y 15% conforme se aumentó la velocidad de carga. El faltante posiblemente pudo haber sido  $C-CO_2$  formado que se perdió del sistema por la aireación, otra parte del carbono pudo haberse utilizado para la síntesis de masa celular y exopolímeros.

**Tabla 7.2** Balance de carbono a las diferentes velocidades de carga de lactato en el RLFi.

Etapa	Influyente (mM d <sup>-1</sup> )	Efluente (mM d <sup>-1</sup> )					Eficiencia (%)	Recuperado (%)
		C-LA	C-LA	C-AC	C-PA	C-BA	C-HCO <sub>3</sub>	Conversión C-LA
I	81.7 ± 1.2	21.6 ± 1.7	12.3 ± 1.8	25.2 ± 3.0	0.27 ± 0.64	2.1 ± 0.48	73.5 ± 0.02	75
II	132.3 ± 2.3	23.7 ± 1.5	36.6 ± 1.5	29.8 ± 3.0	0.10 ± 0.08	6.2 ± 0.31	82 ± 0.07	73
III	187.1 ± 1.8	28.3 ± 2.6	76.8 ± 4.3	39.1 ± 8.7	5.38 ± 1.6	0.06 ± 0.52	84 ± 0.01	85

LA-Lactato, AC-Acetato, PA-Propionato, BA-Butirato

En el proceso de sulfato reducción la ruta metabólica oxidativa del lactato cambia en función de su concentración, como fue observado por Zellner *et al.* (1994), en un reactor de lecho fluidizado de flujo ascendente en condiciones anaerobias, alimentado con sulfato y lactato; a concentraciones menores de 120 mM de C-lactato, el producto de la oxidación fue acetato, mientras que a concentraciones mayores que 120 mM la oxidación produjo propionato y acetato principalmente. En el presente trabajo, a una concentración de C-lactato entre 81.7 y 187 mM, los principales productos de la transformación del lactato fueron acetato y propionato principalmente (Tabla 7.2). En la etapa I la concentración de lactato fue menor que 120 mM, sin embargo los productos fueron acetato y propionato, resultado contrario a lo obtenido por Zellner *et al.* (1994). Esta discrepancia en los productos de la oxidación incompleta de lactato pudo estar relacionada con el acoplamiento de la sulfato reducción y la sulfuro oxidación, más que con la concentración del sustrato.

En todo el estudio se observó que la oxidación del lactato fue incompleta principalmente, por lo que se puede suponer que la mayoría de las BSR adheridas al soporte pertenecían al grupo que no oxida completamente los sustratos carbonados hasta CO<sub>2</sub>. Existen estudios que muestran que algunos géneros de BSR (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*) pueden llevar a cabo la fermentación de lactato pero sólo en ausencia de sulfato y bajo condiciones estrictamente anaerobias (Cypionka, 1995; Widdel, 1988; Bryant *et al.*, 1977). Lo que

indicaría que la presencia de oxígeno en este estudio pudo limitar que el lactato se fermentara por bacterias fermentativas.

Una forma de explicar la presencia de acetato y propionato es a través de las reacciones propuestas en la tabla 7.3, donde se considera que el lactato primero fue oxidado hasta acetato, posteriormente una fracción del acetato fue oxidado hasta CO<sub>2</sub> y otra fracción del acetato sufrió una fermentación a propionato tal como fue observado por Laanbroek *et al.* (1982).

**Tabla 7.3** Reacciones metabólicas propuestas para este trabajo

Reactivos	Productos	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)	Referencia
$2 \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow$	$2 \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + 2 \text{H}^+$	-189	Thauer <i>et al.</i> 1977
$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + \text{HCO}_3^- + 7 \text{H}^+ \rightarrow$	$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2^- + 3 \text{H}_2\text{O}$	239	Laanbroek <i>et al.</i> 1982
$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow$	$2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-60	Widdel & Pfennig 1977

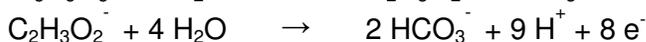
Widdel (1988) reporta que las BSR que oxidan incompletamente los sustratos a acetato presentan tiempos de duplicación cortos comparados con las que los oxidan completamente, por lo que el tiempo de retención hidráulico aplicado al sistema pudo ser un factor limitante en la selección de este tipo de bacterias y la completa oxidación del lactato.

Analizando la oxidación de los compuestos carbonados, así como la reducción de los compuestos azufrados (incluyendo la etapa de inmovilización), es evidente que la oxidación del lactato no coincide con la reducción del sulfato, lo que indica que en el medio pudo haber un donador alternativo de electrones. Un posible donador de electrones podría ser el mismo S<sup>0</sup> producido, ya que se ha reportado que en procesos biológicos con producción de azufre elemental, este puede actuar como donador o aceptor de electrones (Reyes-Ávila *et al.*, 2004; Beristain-Cardoso, 2004; van de Ende *et al.*, 1997; Janssen, 1996; Cypionka *et al.*, 1996). Estas investigaciones muestran claramente que hay una probabilidad muy alta de que el S<sup>0</sup> formado reaccione nuevamente.

Una forma de estimar si el  $S^0$  fue utilizado como donador de electrones es a través de un balance de oxidación-reducción. La estimación se basó en las ecuaciones estequiométricas parciales (Tabla 7.4) por molécula oxidada de lactato a acetato y la subsiguiente mineralización del acetato, así como la intervención del azufre elemental en el proceso acoplado a la reducción del sulfato.

**Tabla 7.4** Reacciones parciales de oxidación-reducción

**Reacciones de los donadores de electrones**



**Reacciones de los aceptores de electrones**



En la Tabla 7.5 se muestran los datos para el balance de las reacciones redox, considerando los electrones potencialmente donados y aceptados por mol de compuesto.

Como se observa en los resultados de la primera etapa de operación (Tabla 7.5 C), el total de electrones donados por el lactato son 123.75 meq  $e^-$ . Con esta cantidad de electrones solamente se pueden reducir 15.46 mM de  $SO_4^{2-}$  (123.75 meq  $e^-$ /8 meq  $e^- \times$  mM  $SO_4^{2-}$ ). Experimentalmente se redujeron 30.43 mM de  $SO_4^{2-}$ , lo que significa que otro donador de electrones redujo los 15 mM de  $SO_4^{2-}$  restantes. El azufre elemental producido es capaz de donar 128 meq  $e^-$ , suficientes para reducir los 15 mM de  $SO_4^{2-}$ . Lo que significaría que el azufre elemental se estaría reciclando dentro del sistema.

**Tabla 7.5** Datos obtenidos durante el estado estacionario en el RLF1 alimentado con sulfato y lactato.

## a. Compuestos Carbonados

O <sub>2</sub> alimentado* (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> residual** (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	D (h <sup>-1</sup> )	Lactato Influente (mM d <sup>-1</sup> )	Lactato Efluente (mM d <sup>-1</sup> )	Lactato Consumido (mM d <sup>-1</sup> )	Acetato Efluente (mM d <sup>-1</sup> )	Propionato Efluente (mM d <sup>-1</sup> )
0.86	3.7x10 <sup>-3</sup>	0.041	27.2 ± 0.42	7.2 ± 0.56	20.0	6.2 ± 0.93	8.2 ± 1.0
1.32	2.8x10 <sup>-3</sup>	0.041	43.9 ± 0.65	7.9 ± 0.48	36.0	18.3 ± 0.76	9.9 ± 1.0
1.94	8.7x10 <sup>-3</sup>	0.041	62.1 ± 1.2	9.4 ± 0.48	52.7	38.4 ± 2.13	13.0 ± 2.9

\* Oxígeno alimentado mediante una bomba peristáltica

\*\* Oxígeno disuelto medido mediante un electrodo Applisens sensor dissolved oxygen.

## b. Compuestos Azufrados

SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Alimentado (mMd <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Efluente (mMd <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Consumido (mMd <sup>-1</sup> )	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> Efluente (mMd <sup>-1</sup> )	S <sup>0</sup> Efluente (mMd <sup>-1</sup> )	S <sup>2-</sup> Efluente (mMd <sup>-1</sup> )
40.61 ± 0.30	10.2 ± 0.31	30.43	1.44 ± 1.3	21.2 ± 3.28	2.6 ± 0.70
63.64 ± 0.53	14.6 ± 0.87	49.04	0.0	34.1 ± 2.00	3.5 ± 0.31
92.47 ± 1.42	25.90 ± 2.80	66.57	0.0	28.0 ± 4.72	16.6 ± 3.47

## c. Balance Redox

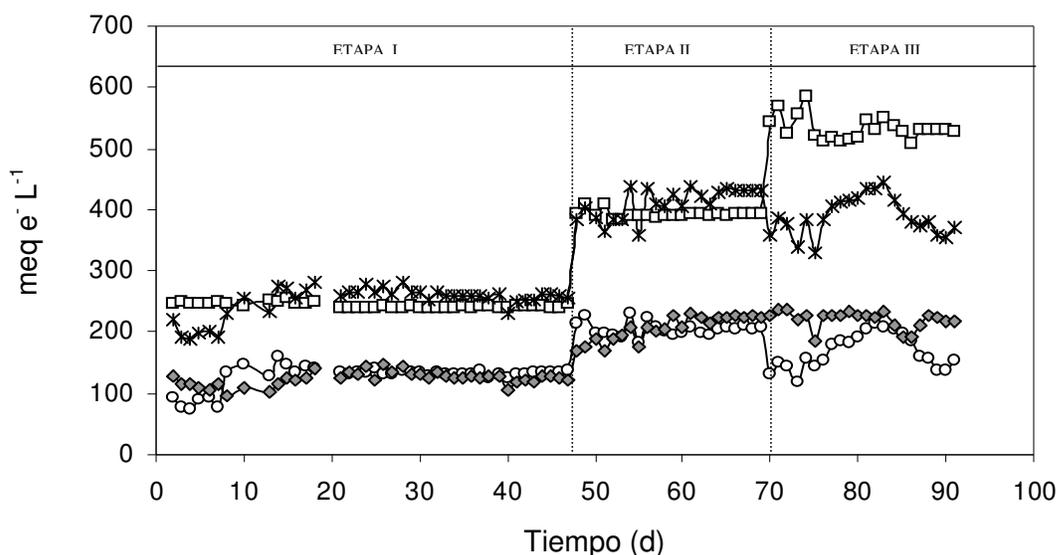
[e <sup>-</sup> ] Requeridos en la reducción total de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	[e <sup>-</sup> ] Donados de la oxidación de lactato a acetato	[e <sup>-</sup> ] Donados de la oxidación de acetato a HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[e <sup>-</sup> ] Totales donados por lactato	[e <sup>-</sup> ] Donados de la oxidación de S <sup>0</sup> formado	[e <sup>-</sup> ] Totales donados	Balance redox (%)
243.44	80.13	43.62	123.75	127.25	251	103
392.34	144.02	62.07	206.10	204.61	410.71	104
532.54	210.80	10.01	220.80	168.09	388.91	73

e<sup>-</sup> miliequivalentes (meq) de electrones (mmol-L<sup>-1</sup>)

En la Figura 7.8 se muestran los meq e<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> transferidos en el proceso acoplado de oxidación-reducción de las tres etapas, donde se observa que para la etapa I y II el total de meq e<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> donados por la oxidación incompleta del lactato a acetato y por el ciclaje del S<sup>0</sup> corresponden aproximadamente a los meq e<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> necesarios para la reducción del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

En un cultivo axénico mixto de *Desulfovibrio* y *Thiobacillus* en un quimiostato van den Ende *et al.* (1997) observaron un fenómeno similar, donde el azufre elemental formado por *Thiobacillus* fue reciclado nuevamente, así como también el lactato sólo sufrió una transformación a acetato. Janssen (1996) también observó el reciclado del azufre elemental producido en un reactor sulfuro oxidante al ser alimentado con ácidos grasos volátiles (600 mg DQO L<sup>-1</sup>). El autor asume que en el sistema se acumularon bacterias sulfato reductoras, provocando un deterioro del proceso sulfuro oxidante, ya que el azufre elemental formado fue reducido a sulfuro, disminuyéndose así la producción de azufre elemental. El reciclado del azufre elemental y del tiosulfato en un sistema óxico también fue observado por Cypionka *et al.* (1996), quienes encontraron que el S<sup>0</sup> formado sufre una desproporción a sulfato y sulfuro.

Es muy probable que en reactores con biomasa suspendida el S<sup>0</sup> se pueda utilizar nuevamente por las poblaciones microbianas, ya que al ser un sólido de muy baja solubilidad y tener una gravedad específica (1.96 g cm<sup>-3</sup>) mayor que la del agua es retenido y acumulado dentro del sistema lo que promueve la formación de biogránulos pues el S<sup>0</sup> actúa como un soporte para las bacterias (Reyes-Ávila *et al.*, 2004; Annachatre *et al.*, 2001).



**Figura 7.8.** Balance de electrones sobre el RLFI: electrones aceptados (□); electrones donados totales (\*); electrones donados por la oxidación de la fuente de carbono (♦); electrones donados por el S<sup>0</sup> producido (○).

En cambio en la etapa III, se puede observar que el total de meq e<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> donados tanto como por la oxidación del lactato como por el reciclaje del S<sup>0</sup> no corresponde con los meq e<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> necesarios para la reducción del sulfato consumido, lo que nos indicaría que posiblemente otro donador de e<sup>-</sup> participó en la reducción de sulfato. Probablemente el polisulfuro que se observó en la tercera etapa pudo actuar como donador de electrones ya que su estado de oxidación es de -1 y es un intermediario de la oxidación del azufre.

En cuanto a la oxidación parcial de sulfuro a azufre elemental los meq e<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> no se calcularon, porque sólo se observó la reacción global de sulfato a azufre elemental, sin poder distinguir cuanto del sulfuro producido se oxidó parcialmente a azufre elemental debido a la complejidad del proceso. Sin embargo, se puede inferir que los meq e<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> necesarios para la reducción del O<sub>2</sub> provinieron de la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental.

### 7.2.1 Determinación del $k_La$ en el RLFI

El reactor RLFI pertenece a la clase de reactores neumáticos, ya que no posee dispositivos de agitación mecánica. La agitación es provista por el movimiento ascendente de las burbujas y el flujo descendente a través de la columna.

El consumo específico ( $q_{O_2X}$ ) y la velocidad volumétrica de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ) en el reactor se determinaron como se describe en el apartado 6.1.8. Los flujos de aire con los que se hicieron las determinaciones fueron de 2.28, 3.42 y 5.42 L min<sup>-1</sup> correspondientes a cada etapa de la operación en continuo del RLFI. Los resultados obtenidos de  $q_{O_2X}$ ,  $k_La$  y la concentración máxima de oxígeno disuelto y residual, se muestran en la Tabla 7.6.

**Tabla 7.6** Valores de  $k_La$  obtenidos con los diferentes flujos de aire aplicados al reactor.

<b>Etapas</b>	<b>Flujo de aire</b> (L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	<b><math>q_{O_2X}</math></b> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	<b>O<sub>2</sub> Disuelto</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b>O<sub>2</sub> Disuelto residual</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b><math>K_La</math></b> (h <sup>-1</sup> )
I	2.28	6.66	3.51	0.12	2.78
II	3.42	5.22	3.38	0.09	2.67
III	5.42	4.38	3.22	0.28	2.16

Al analizar los valores de  $k_La$  obtenidos para cada etapa, podemos observar que las dos primeras etapas no cambiaron de manera significativa, mientras que la etapa III presentó una disminución del 22% con respecto a la primera etapa. Al aumentar el flujo de aire se esperaba un aumento en el  $k_La$ , debido a que el flujo de aire es un parámetro que tiene una influencia directa sobre la velocidad volumétrica de transferencia de oxígeno y el tiempo de contacto entre la interfase gas-líquido (González, 2002). Y también se esperaba que el flujo de aire disminuyera la densidad del lecho de partículas y pudiera fluidificarse con una velocidad de líquido menor. Sin embargo se observó el efecto contrario, posiblemente debido a la falta de fluidización del lecho (compactación) que limitó la transferencia de O<sub>2</sub>. Esto explicaría el incremento de S<sup>2-</sup> residual y el decremento de S<sup>0</sup>, al no haber el O<sub>2</sub> necesario para la oxidación parcial del sulfuro.

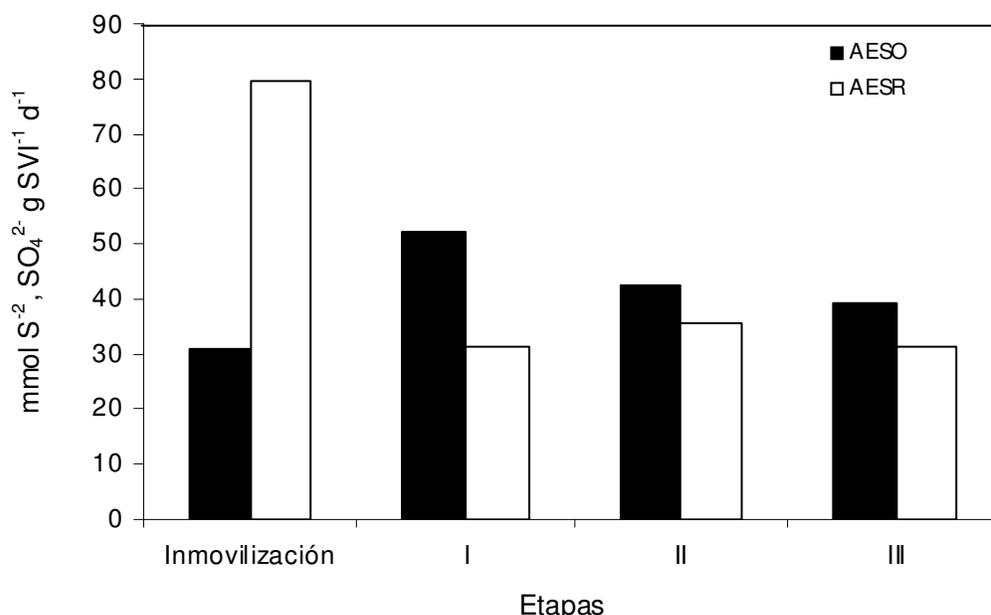
Los valores de  $k_La$  reportados en la literatura para columnas con burbujeo sin limitación de oxígeno son de 213, 224 y 386  $\text{h}^{-1}$  para volúmenes de 0.8, 1.2 y 1.6 L respectivamente (van't Riet, 1983). Mientras que para columnas de burbujeo con limitación de oxígeno los valores de  $k_La$  están por debajo de 20.6  $\text{h}^{-1}$  en reactores de 2.5 L, operando el reactor a un 80% de saturación del oxígeno (Medina-Moreno *et al.*, 2005). Los valores de  $k_La$  obtenidos en este estudio fueron mucho menores a lo reportado por Medina-Moreno *et al.* (2005), esto puede entenderse debido a que el RLFI fue operado con una fracción de saturación del oxígeno, aproximadamente del 40%.

### 7.2.2 Actividades específicas durante la operación en continuo del RLFI

Las actividades específicas sulfato reductora y sulfuro oxidante fueron evaluadas en cada una de las etapas del proceso, con la finalidad de observar el efecto del oxígeno, las velocidades de carga de sulfato y lactato, así como los productos formados. Las AESR no presentaron cambios significativos durante las tres etapas en continuo, las cuales fueron de 31, 36 y 31.5  $\text{mmol SO}_4^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$  respectivamente, aproximadamente la mitad de la AESR observada durante la inmovilización (79.5  $\text{mmol SO}_4^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Las AESO para las etapas I, II y III fueron de 52, 42 y 39  $\text{mmol S}^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$  respectivamente (Figura 7.9). Contrario a lo observado en las AESR, la actividad sulfuro oxidante en la inmovilización fue menor (30.75  $\text{mmol S}^{2-} \text{ g SVI}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) a las AESO observadas en continuo.

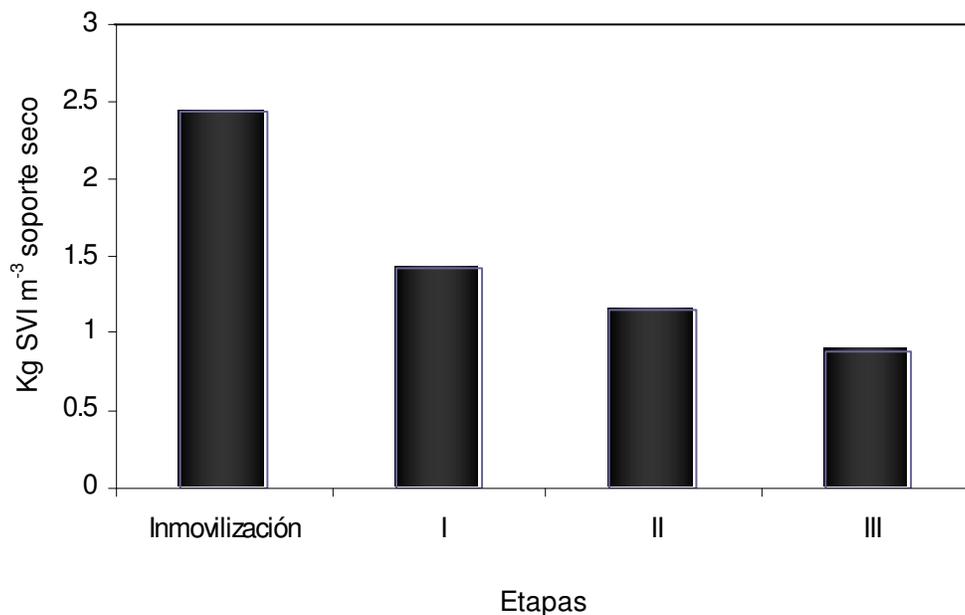
La alta AESR presentada en la etapa de inmovilización pudo deberse a un predominio de BSR en la biopelícula (Fig. 7.9 y 7.10) puesto que la AESR se determinó con la misma relación DQO/biomasa en todas las etapas. Aunque en las etapas en continuo se observó que la biomasa inmovilizada disminuyó (Fig. 7.10), las AESR se mantuvieron constantes (Fig. 7.9) contrario a lo que se observó en las AESO. En la etapa de inmovilización la AESO fue menor que en las etapas en continuo, esto podría atribuirse a que la población sulfuro oxidante en la biopelícula fue menor con respecto a las etapas en continuo. Podría considerarse que durante la

inmovilización la alimentación de oxígeno en el reactor se hizo a través del separador de partículas, lo que posiblemente redujo aun más el oxígeno disuelto en el RLFI, lo que limitó el crecimiento de la población sulfuro oxidante y favoreció el desarrollo de la población sulfato reductora y la producción de azufre elemental.



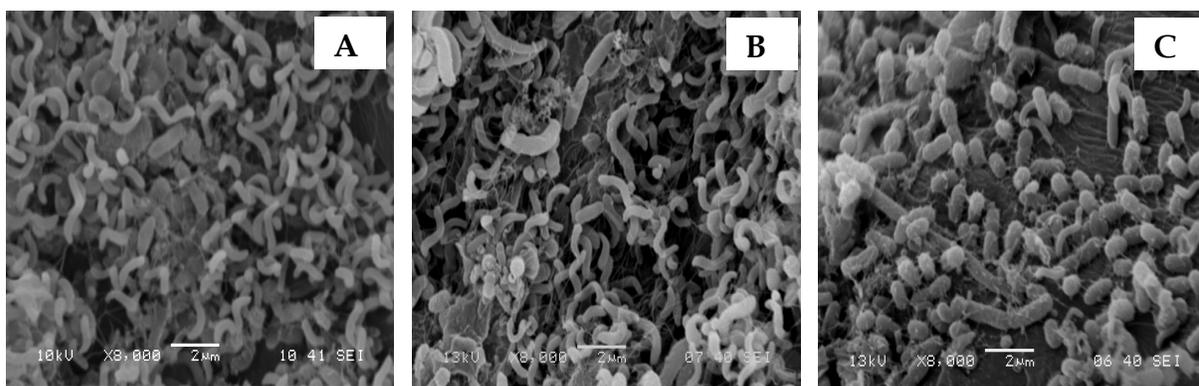
**Figura 7.9** Actividades máximas específicas en las diferentes etapas de operación. AESO: actividad específica sulfuro oxidante; AESR: actividad específica sulfato reductora.

El incremento de las velocidades de carga, así como el incremento del flujo de aire, tuvieron un efecto en la cantidad de biomasa inmovilizada. En la Figura 7.10 se muestra la biomasa inmovilizada conservada al final de cada etapa, donde se observa la pérdida de la biopelícula al ir aumentando la carga y el gasto de aireación. Este decremento, también fue observado por microscopía electrónica de barrido, donde se puede apreciar una menor densidad poblacional e inclusive pequeñas secciones descubiertas de soporte (Figura 7.11). Posiblemente los esfuerzos de corte generados por los incrementos en los flujos de aire contribuyeron en mayor parte a la pérdida de densidad poblacional.



**Figura 7.10.** Sólidos volátiles inmovilizados en las diferentes etapas de operación del RLF1.

Las actividades específicas, eficiencias de consumo de sulfato y lactato, y los productos finales, sugieren que la población microbiana sulfuro oxidante fue la que presentó una mayor sensibilidad en el proceso. Sin embargo, las actividades sulfuro oxidantes en continuo siempre fueron mayores con respecto a las actividades sulfato reductoras, esto podría entenderse a partir de las propiedades fisicoquímicas de cada donador de electrones, por ejemplo; el lactato es una molécula orgánica de mayor peso molecular con respecto al sulfuro, por lo que hablando desde el punto de vista de transferencia, es más fácil el transporte y asimilación de una molécula pequeña como el sulfuro comparada con el lactato.



**Figura 7.11** Micrografías al final de cada etapa de operación en continuo del RLF. (A) soporte inmovilizado al final de la Etapa I (8000 X), (B) al final de la Etapa II (8000X) y (C) en etapa III (8000X).

Los resultados obtenidos en la operación del RLF en presencia de oxígeno mostraron que puede ser un buen sistema para la eliminación de sulfato en forma de azufre elemental, debido a que este tipo de reactor permitió la inmovilización de una comunidad bacteriana que involucró a las BSR y BSO a través de una presión selectiva que se impuso desde el arranque del reactor. En este caso la velocidad descendente pudo haber contribuido a que sólo las bacterias capaces de adherirse y soportar las condiciones de cultivo permanecieran en el reactor.

La eliminación de compuestos azufrados en forma de azufre elemental documentada en la bibliografía por sistemas biológicos se presentan en la Tabla 7.7. Cabe mencionar que en estos estudios sólo eliminan el sulfuro en forma de  $S^0$  en un solo sistema bajo un proceso puramente sulfuro oxidante o anóxico.

Las concentraciones de sulfuro calculadas teóricamente en este trabajo fueron 4 veces mayores que las reportadas en los otros estudios, sin embargo la recuperación de azufre elemental se encuentra dentro del intervalo observado.

**Tabla 7.7** Diferentes sistemas biológicos quimiótrofos para la oxidación de sulfuro. Modificada de Krishnakumar *et al.* 2005.

Escala	Sulfuro	Tipo de biomasa	Sulfuro (mg L <sup>-1</sup> )	Qv S <sup>2-</sup> (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Sulfuro eliminado (%)	S <sup>0</sup> recuperado (%)	Referencia
Lab	ARS	Suspendido	240	6	99	nr	Buisman <i>et al.</i> (1990)
Lab	Efluente anaerobio	Lodo-azufre	240	14	90	80	Janssen <i>et al.</i> (1997)
Lab	ARS	Suspendido	nr	0.7 1.0 1.4	nr	32 72 74	Celis-García (2004)
Lab	Efluente anaerobio	Suspendido	nr	0.85 0.95	nr	16 44	Celis-García (2004)
Piloto	H <sub>2</sub> S de líquido cáustico	Biopelícula	nr	6	99	100	Buisman <i>et al.</i> (1993a)
Piloto	Efluente reciclado de papel	Biopelícula	60-240	nr	70	60-90	Buisman <i>et al.</i> (1993b)
Lab	ARS	Biopelícula	240	7.5-30	100-90	90-65	Krishnakumar <i>et al.</i> (2005)
Lab	ARS	Biopelícula	72.8	0.073	100	70	Beristain, (2004)
Lab	ARS	Biopelícula	974* 1580* 2155*	0.974 1.580 2.155	-	55 54 30	En este trabajo

ARS agua residual sintética, nr No refieren.

\*Calculado teóricamente a partir del sulfato reducido.

La recuperación de S<sup>0</sup> obtenida en el presente trabajo cobra relevancia en el ámbito biotecnológico ya que se obtuvo partiendo del azufre del sulfato y normalmente para obtener el S<sup>0</sup> a partir de este sustrato se utilizan dos reactores espacialmente separados, en uno se lleva a cabo la reducción de sulfato a sulfuro y en el otro la oxidación de sulfuro a azufre elemental.

Este estudio permitió observar dos aspectos interesantes, por un lado la posibilidad de eliminar el sulfato en forma de azufre elemental, acoplado los procesos de sulfato reducción y sulfuro oxidación, cerrándose el ciclo biológico del azufre, y por otro lado la posibilidad de realizar el tratamiento en un solo sistema, que a nivel industrial sería de gran interés económico.

## 8. CONCLUSIONES

La limitación de oxígeno en el cultivo, la velocidad descensional así como el tiempo de residencia hidráulico del RLF, permitieron la inmovilización de bacterias sulfato reductoras tolerantes al oxígeno y sulfuro oxidantes que secretan el azufre elemental. Durante la formación de la biopelícula se obtuvo la producción de azufre elemental a partir del sulfato alimentado.

A partir de las pruebas de respirometría se puede concluir que la velocidad de oxidación biológica del sulfuro fue 70% más rápida con respecto a la velocidad de oxidación química, lo que indica que la transformación de sulfuro producido por las bacterias sulfato reductoras se llevó a cabo principalmente por oxidación biológica.

Al operar el reactor en continuo la conversión máxima de sulfato a azufre elemental fue de 55%. La fuente carbonada sólo fue parcialmente oxidada a acetato por sulfato reducción debido probablemente a que se inmovilizaron bacterias sulfato reductoras que la oxidan incompletamente, además de que no actuó como el principal donador de electrones, lo que sugiere que el  $S^0$  pudo ser utilizado como donador alternativo. Por otra parte, una fracción del acetato producido fue fermentado a propionato.

El declive en la recuperación de azufre elemental debido a la generación de espuma, fricción entre las partículas y la compactación del lecho provocaron una acumulación de intermediarios no deseados como el polisulfuro.

Las bacterias sulfuro oxidantes en la biopelícula fueron más susceptibles a los cambios en las condiciones de cultivo en continuo que las bacterias sulfato reductoras.

Los resultados mostraron que se logró la transformación de compuestos oxidados de azufre, debido al acoplamiento metabólico de un consorcio microbiano especializado. De tal forma que el contenido total de azufre soluble en el agua

residual disminuyó, ya que se recuperó como azufre elemental. Además de que el proceso biotecnológico puede ser una alternativa factible para transformar el sulfato en un compuesto no tóxico como el azufre elemental en un solo sistema, que a nivel industrial sería de gran interés económico.

## 9. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de tener un mayor conocimiento y control del proceso, se recomienda realizar estudios de biología molecular que permitan conocer las poblaciones o géneros microbianos presentes en la biopelícula, así como realizar pruebas que permitan entender de qué forma el azufre elemental se está ciclando en el sistema.

El uso de aire en este estudio provocó que el sistema presentara problemas de operación, por lo que se sugiere sustituir el aire por oxígeno, ya que de esta forma los flujos de alimentación de gas disminuirían considerablemente en el reactor, evitando la compactación del lecho y generación de espuma, además de mejorar la producción de azufre elemental.

Operar el reactor a tiempos de residencia hidráulicos más largos podría favorecer la inmovilización y desarrollo de bacterias sulfato reductoras que tienen la capacidad metabólica de oxidar completamente los sustratos orgánicos a dióxido de carbono.

Se sugiere realizar ensayos sustituyendo el lactato por azufre elemental en presencia de sulfato para esclarecer el papel de oxidación-reducción de éste en el sistema.

Se recomienda el uso del potencial de oxidación-reducción (OPR), como un parámetro de control de dosificación del oxígeno para controlar la oxidación del sulfuro de forma más precisa (Janssen *et al.*, 1998; Krishnakumar *et al.*, 2005). Debido a que este parámetro permite medir el potencial electroquímico en línea manteniendo la concentración de oxígeno necesaria para la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara Pérez, S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfooxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Annachhatre, A., y Suktrakoolvait, S. (2001). Biological sulfide oxidation in a fluidized bed reactor. *Environ. Technol.* 22 (6): 661-672.
- 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.
- Arnaiz, C., Buffiere, P., Elmaleh, S., Lebrato, J., y Moletta, R. (2003). Anaerobic digestion of airy wastewater by inverse fluidization: The inverse fluidized bed and the inverse turbulent bed reactors. *Environ. Technol.* 24: 1431-1443.
- Arora, S., Mino, T., y Matsuo, T. (1995). Mechanism and favorable operating conditions of organic substrate removal in microaerophilic up flow sludge bed reactor (MUSB). *Wat. Res.* 29: 1895-1901.
- Barlett, J., y Scoog, D. (1954). Colorimetric determination of elemental sulphur in hydrocarbons. *Anal. Chem.* 26:1008-1011.
- Barrenstein, A., Kramer, U., y Obermann, P. (1986). Underground treatment of nitrate rich groundwater by infiltration with treated wastewater or methane rich natural gas. *DVGW-Schriftreihe, Wasser*. Frankfurt, Germany. 116: 99-116.
- Basu, O., y Baldwin, A. (2000). Attachment and Growth of sulphate-reducing bacteria on different support materials. *Environ. Technol.* 21: 1293-1300.

- Beristain-Cardoso, R. (2004). Eliminación anóxica de nitrógeno, carbono y azufre, por medio de un reactor de lecho fluidizado inverso. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Bozzola, J., y Russell, L. (1991). *Electron microscopy*. Jones and Bartlet Publishers. U.S.A.
- Bryant, M., Leon Campbell, L., Reddy, C., y Crabill, M. (1977). Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (5): 1162-1169.
- Buisman, C., Post, R., Ijspeert, P., Geraats, G., y Lettinga, G. (1989). Biotechnological process for sulphide removal with sulphur reclamation. *Acta. Biotechnol.* 9 (3): 255-267.
- Buisman, C., Ijspeert, P., Janssen, A., y Lettinga, G. (1990). Kinetic of chemical and biological sulphide oxidation in aqueous solutions. *Wat. Res.* 24 (5): 667-671.
- Buisman, C., Boer, J., Boonstra, J., Paaschens, C., y Sopjes, A. (1993a). A new biotechnology method for H<sub>2</sub>S removal from biogas. *TAAPI Proceedings*, p.773.
- Buisman, C., Bloembergen, J., y Paalvast, C. (1993b). Biological sulphur recovery from paper mill effluent, *TAAPI proceedings*, p. 841.
- Brüser, T., Lens, P., y Trüper, H. (2000). The biological sulfur cycle. In: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens P., y Hulshoff Pol L., (Eds.). International Water Association. Londres, pp. 47-85.
- Castilla-Hernández, P. (1997). Arranque y operación de un biorreactor anaerobio de lecho fluidizado inverso para el tratamiento de aguas residuales. Informe de servicio social. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Castilla, P., Meraz, M., Monroy, O., y Noyola, A. (2000). Anaerobic treatment of low concentration waste water in an inverse fluidized bed reactor. *Wat. Sci. Technol.* 41(4): 245-251.
- Castro, H., Williams, N., y Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Mini Rev. FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 1-9.

- Celis-García, B., Ramírez, F., Revah, S., Razo-Flores, E., y Monroy, O. (2004). Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: Influence of microbial immobilization type. *Environ. Technol.*, 25 (11): 1265-1275.
- Celis-García, B. (2004). Eliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Colleran, E., Finnegan, S., y O'Keffe, R. (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, J., Jerger, D., y Maka, A. (1986). Biocatalytic production of sulfur from process waste streams. *Biotechnol. Bioenerg. Symp. Ser.* 16: 149-162.
- Cypionka, H., Widdel, F., y Pfeng, N. (1985). Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 39-45.
- Cypionka, H. (1995). Solute transport and cell energetics. En: *Sulfate-Reducing Bacteria*. Larry L. Barton. Plenum Press. New York. pp 151-162.
- Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:827-848.
- Characklis, W. (1990). Biofilm processes. En: *Biofilms*. Characklis W.G., Marshall K.C. (Ed.). Wiley, New York.
- Darbi, A., Viraraghavan, T., Butler, R., y Corkal, D. (2003). Column studies on nitrate removal from potable water. *Wat. Air and Soil Pollution.* 150: 235-254
- Dolla, A., Fournier, M., y Dermoun, Z. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J. Biothechnol.* 126: 86-100.
- Fleming, C. (1995). Sorption sites in biofilms. *International IAWQ conference workshop biofilm structure, growth and dynamics need for new concepts.* 30 august-1 september. Noordwijkerhout, the Netherlands. pp: 13-20.

- Fujio, Y., Sambuichi, M., y Ueda, S. (1973). Numerical method of the determination of  $k_L a$  and respiration rate biological system. *J. Ferment. Technol.* 51: 154-158
- Fukui, M., y Takii, S. (1990). Survival of sulfate-reducing bacteria in oxic surface sediment of a seawater lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 317-322.
- 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. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 136-144.
- Gibson, G. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 769-797.
- Griesbeck, Ch., Hauska, G., y Schütz, M. (2000). Biological sulfide-oxidation: Sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction. In: *Research Developments in Microbiology*. Pandalai, S.G. (Ed). 4: 179-203. Research Signpost, Trivadrur, India.
- 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-Iztapalapa. México.
- Gottschalk, G. (1986). *Bacterial Metabolism*. Segunda edición. Springer-Verlag. New York. pp. 42-43, 260-265.
- Gorries, L., van Deursen, J., van der Drift, C., y Vogels, G. (1989). Biofilms development in laboratory metanogenic fluidized bed reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 687-693.
- Hao, J., Chen, M., Huang, L., y Buglass, L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26: 155-187.
- Hardy, J., y Hamilton, W. (1981). The oxygen tolerance of sulphate-reducing bacteria isolated from North Sea waters. *Curr. Microbiol.* 6: 259-262.
- Heijnen, J., Mulder, A., Enger, W., y Hoeks, F. (1989). Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in waste-water treatment. *Chem. Eng. J.* 41:B37-B50.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., y Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición. William & Hensyl. pp. 436, 451.

- Hulshoff Pol, L., Lens, P., Weijma, J., y Stams, A. (2001). New developments in reactor and process technology for sulphate reduction. *Wat. Sci. Technol.* 44(8): 67-76.
- Jensen, A., y Webb, C. (1995). Treatment of H<sub>2</sub>S-containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Technol.* 17: 2-10.
- Janssen, A., 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., Ma, C., Lens, P., y Lettinga, G. (1997). Performance of a sulphide oxidizing expanded bed reactor with a spatially separated aeration unit. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 32-40.
- Kalyuzhnyi, S., de León-Fragoso, C., y Rodríguez-Martínez, J. (1997). Biological sulfate reduction in an UASB reactor fed with ethanol as electron donor. *Mikrobiologiya.* 66 (5): 674-680.
- Kaksonen, A., Pluma, J., Franzmann, P., y Puhakka, J. (2004). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiol. Eco.* 47: 279-289.
- Kelly, D. (1999). Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch. Microbiol.* 171: 219-229.
- Kelly, D., y Wood, A. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 511–516.
- Kjeldsen, K., Joulian, C., e Ingvorsen, K. (2004). Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 38: 2038-2043.

- Krishnakumar, B., Majumdar, S., Manilal, V., y Haridas, A. (2005). Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLR). *Wat. Res.* 39: 639-647.
- Koster, W., Rinzema, A., de Vegt, L., y Lettinga, G. (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at different pH levels. *Wat. Res.* 12:1561-1567.
- Laanbroek, H., Abee, T., y Voogd, I. (1982). Alcohol conversions by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch Microbiol.* 133: 178-184
- Lee, M., Lu, C., y Chuang, M. (1994). Effect of immobilized cells on the biodegradation of chlorinate phenols. *Water Sci Technol.* 30: 87-90
- Lens, P., Visser, A., Janssen, A., Hulshoff Pol, L., y Lettinga, G. (1998a). Biotechnological treatment of sulfate rich wastewaters: *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 28(1): 41-88.
- Lens, P., van den Bosch, M., Hulshoff Pol, L., 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., y Hulshoff Pol, L. (2000). Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Published by IWA Publishing, Alliance House, London.*
- Lens, P., y Kuenen, J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Wat. Sci. Technol.* 44 (8): 57-66.
- Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L., y Randal, J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Liu, Y., y Tay, J. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Wat. Res.* 36:1653-1665.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (1999). Cap. 13. Diversidad metabólica de los microorganismos y Cap. 16. Diversidad procariótica: Dominio bacteria. En: *Brock Biología de los microorganismos*. Décima edición. Prentice Hall, Iberia. pp 473-531, 636-664.

- Massmann, G., Tichomirowa, M., Merz, C., y Pekdeger, A. (2003). Sulfide oxidation and sulfate reduction in a shallow groundwater system (Oderbruch Aquifer, Germany). *J. Hydrol.* 278: 231-243.
- Matias, P., Pereira, I., Soares, C., y Carrondo, A. (2005). Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Biophysics & Molecular Biology.* 89: 292-329
- McCartney, D., y Oleskiewicz, J. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Wat. Res.* 25: 203-209.
- McCartney, D., y Oleszkiewicz, J. (1993). Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD: sulfate ratio and acclimation. *Wat. Environ. Res.* 65: 655-644.
- Medina-Moreno, S., Huerta-Ochoa, S., y Gutiérrez-Rojas, M. (2005). Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 51:231-239.
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M., y Heijnen, J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J. Biotechnol.* 80: 1-33.
- O'Flaherty, V., Mahony, T., O'Kennedy, R., y Colleran, E. (1998). 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., y Colleran, E. (2000). Sulfur problems in anaerobic digestion. In: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering.* Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). International Water Association. Londres, pp. 467-489.
- Okabe, S., Nielson, P., y Characklis, W. (1992). Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: Limiting nutrients and sulfide concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 40:725-734.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L., y Lettinga, G. (1996). Effect of upward velocity and sulfide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* 31: 699-710.

- Omil, F., Lens, P., Visser, A., Hulshoff Pol, L., y Lettinga, G. (1998). Long 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., Visser, A., Hulsoff Pol, L., y Stams, A. (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.
- Razo-Flores, E., Donlon, 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., Almeida, J., Lemos, P., y Carrondo, M. (1992). Effect of hydrogen sulfide on the growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 593-600.
- Reyes-Ávila, J., Razo-Flores, E., y Gómez, J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Wat. Res.* 38: 3313-3321
- Robertson, L., y Kuenen, J. (1992). The colorless sulfur bacteria. In: *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.
- 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.
- Steffes, G. (1993). Oxidation of sulfide to elemental sulfur by aerobic *Thiobacilli*. Ph. D. thesis, Technical University Delft, The Netherlands.
- Steffes, 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
- Steudel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. In: *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.
- Sublette, K. (1987). Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 690-695.
- Sublette, K., Ravindra, K., Raterman, K. (1998). Technological aspects of the microbial treatment of sulfide-rich wastewaters: a case study. *Biodegradation.* 9: 259-271.
- Suzuki, I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45: 97-105.
- Tarvin, D., y Buswell, A. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 1751-1755.
- Thauer, R., Jungermann, K., y Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41: 100-180
- Uberoi, V., y Battacharya, S. (1995). Interactions among sulfate reducers, acetogens and methanogens in anaerobic propionate systems. *Water. Environ. Res.* 67: 330-339.
- Vallero, M. (2003). Sulfate reducing processes at extreme salinity and temperature: extending its application window. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- van den Ende, F., Meier, J., y van Gernerden, H. (1997). Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 65-80.
- van Houten, R. (1996). Biological sulfate reduction whit synthesis gas. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- van Loosdrecht, M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., y Tjihuis, L. (1995). Biofilm structures. *Wat. Sci. Technol.* 31:163-171.

- van der Zee, F., Villaverde, S., García, P., y Fdz.-Polanco, F. (2006) Sulfide removal by moderate oxygenation of anaerobic sludge environments. *Bioresour. Technol.* 98 (3): 518-524.
- van't Riet, (1983). Mass Transfer in Fermentation Equipment. *Trends En: Biotechnol.* 1(4): 113-118.
- Vincke, E., Monteny, J., Beeldens, A., De Belie, N., Taerwe, L., Van Gemert, D. y Verstraete, W.H. (2000). Pollution recent developments in research on biogenic sulfuric acid attack of concrete. In: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P., y Hulshoff Pol, L., (Eds.). International Water Association. Londres, pp. 515-541.
- Visser, A., Beeksma, I., van der Zee, F., Stams, A. y Lettinga, G. (1993) Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulfate concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 549-556.
- Visser, A., (1995). The anaerobic treatment of sulfate-containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- Visser, A., Hulshoff Pol, L., y Lettinga, G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Wat. Sci. Technol.* 33 (3): 99-110.
- Visser, J., Robertson, L., van Verseveld, H., y Kuenen, J., (1997a). Sulphur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2300-2305.
- Visser, J., Stefess, G., Robertson, L., y Kuenen, J. (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. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. A.J.B. Zehnder (Ed), John Wiley & Sons, New York. pp.469-586.
- Widdel, F., y Pfennig, N., (1982). Studies on the dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov. sp. nov. *Arch. Microbiol.* 131: 360-365

Yamaguchi, T., Harada, H., Hisano, T., Yamazaki, S., y Tseng I-Cheng (1999). Process behavior of UASB reactor treating a wastewater containing high strength sulfate. *Wat. Res.* 33 (14): 3182-3190.

Yang, Y., y Allen, E. (1994). Biofiltration control of hydrogen sulfide. Design and operational parameters. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 44:863-868.

Zellner, G., Neudörfer, F., y Diekmann, H. (1994). Degradation of lactate by an anaerobic mixed culture in a fluidized-bed reactor. *Wat. Res.* 28(6): 1337-1340.

<http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-ioc/sulfate.htm>