

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**Desarrollo de biopelículas en un reactor de lecho fluidificado de  
flujo descendente a diferente relación DQO/sulfato y tiempo de  
residencia hidráulico**

Tesis que presenta

**Elda Zoraida Piña Salazar**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Aplicadas**

En la opción de

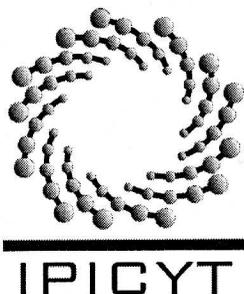
**Ciencias Ambientales**

**Codirectores de Tesis:**

**Dr. María de Lourdes Berenice Celis García**

**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

San Luis Potosí, S.L.P., 15 de octubre de 2010



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Desarrollo de biopelículas en un reactor de lecho fluidificado de flujo descendente a diferente relación DQO/sulfato y tiempo de residencia hidráulico**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Elda Zoraida Piña Salazar** y aprobada el **15 de octubre de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ma. Lourdes Berenice Celis García  
(Codirector de la tesis)

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo  
(Codirector de la tesis)

Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez  
(Asesor de la tesis)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García y del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo y la asesoría de la Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-221808). El trabajo de investigación de esta tesis fue financiado por el Proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT-62028, otorgado a la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

El posgrado en Ciencias Aplicadas con opción terminal en Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica se encuentra inscrito dentro del Programa Nacional de Posgrados del CONACYT.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 040 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de octubre del año 2010, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez</b>	<b>Presidente</b>	<b>UAM-Iztapalapa</b>
<b>Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCION DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Elda Zoraida Piña Salazar**

sobre la Tesis intitulada:

*Desarrollo de biopelículas en un reactor de lecho fluidificado de flujo descendente a diferente relación DQO/sulfato y tiempo de residencia hidráulico*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**  
**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 18:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de octubre de 2010.

**Mtra. Ivonne Malette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



A mi familia; a mi madre la Sra. Ma. Dolores Salazar Chávez, a mi padre el Sr. Ranulfo Piña Martínez, a mi hermano el Sr. Omar Alfredo Piña Salazar y especialmente a mi hermana la Srita. Perla Dinorah Piña Salazar, a mi novio el Dr. Aarón Morelos Gómez y a mis amigos por todo su cariño y apoyo en el transcurso de esta etapa de mi vida.

A mis amigos Diana Piña, Dalila Garay, Patricia Yañez, Mayra Rodríguez, Julián Carrillo y Adriana Mata por brindarme su amistad incondicional.

## **Agradecimientos**

A mis directores de tesis Dra. María de Lourdes Berenice Celis García y Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo por sus enseñanzas, paciencia, confianza, apoyo y valiosos comentarios durante la realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez de la UAM-Iztapalapa por su asesoría, disponibilidad y valiosos comentarios durante el desarrollo de la presente tesis.

A la Dra. Lilia Montoya Lorenzana, posdoctorante de la División de Biología Molecular de este Instituto y a la M. en C. Berenice Flores Aguilar por su apoyo y enseñanzas referentes al análisis microbiológico molecular que llevé a cabo, tanto en los experimentos de extracción de ADN, PCR y DGGE como en el análisis de las secuencias obtenidas.

A los técnicos de la División de Ciencias Ambientales, M. en C. Dulce Isela Fátima Partida Gutiérrez y M. en C. Guillermo Vidriales Escobar por su disponibilidad y apoyo técnico en la realización de los experimentos de la tesis.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís de la División de Biología Molecular del IPICYT por permitirme hacer uso de su laboratorio, y a la técnico académico M. en C. Rosalba Castillo Collazo por el apoyo y asesoría brindados.

A mis compañeros y amigos de la División de Ciencias Ambientales: Mayra, Julián, Adriana, Víctor, Rodrigo, Alejandra, Mariana, Daniel, Litza, Claudia, Luis y Emilia por su apoyo y tiempo compartidos.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xii
Índice de ecuaciones	xv
Anexos	xvii
Lista de abreviaturas	xviii
Resumen	xx
Abstract	xxi
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	
2.1 Digestión anaerobia	3
2.1.1 Proceso biológico de sulfato-reducción	5
2.1.2 Bacterias sulfato-reductoras	8
2.1.2.1 Factores que condicionan el crecimiento y función de las BSR	12
2.1.2.1.1 pH	12
2.1.2.1.2 Temperatura	12
2.1.2.1.3 Toxicidad por sulfuro	12
2.2 Biopelículas	14
2.3 Reactores en el estudio del proceso de sulfato-reducción	16
2.4 Factores involucrados en el desempeño de un reactor sulfato-reductor.	18
<b>3. Justificación</b>	<b>23</b>
<b>4. Hipótesis y Objetivos</b>	
4.1 Hipótesis	25

4.2 Objetivo general	25
4.3 Objetivos específicos	25
<b>5. Materiales y métodos</b>	
5.1 Materiales	26
5.1.1 Reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente (UASB)	26
5.1.2 Reactor de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD)	26
5.1.3 Medios de cultivo	27
5.1.3.1 Medio basal para la alimentación de los reactores	27
5.1.3.2 Medio basal para las actividades específicas	28
5.1.3.3 Solución de oligoelementos	29
5.1.4 Inóculo	29
5.2 Métodos	30
5.2.1 Operación del reactor UASB	30
5.2.2 Operación de los reactores LFFD	30
5.2.3 Seguimiento del desempeño de los reactores LFFD	31
5.2.4 Actividad sulfato-reductora (ASR) del inóculo	31
5.2.5 Actividad sulfato-reductora de la biopelícula	32
5.2.6 Actividad metanogénica (AME) del inóculo	33
5.2.7 Actividad metanogénica de la biopelícula	33
5.2.8 Análisis molecular de la comunidad microbiana	34
5.2.8.1 Extracción de ADN genómico	34
5.2.8.2 Amplificación del ADN	36
5.2.8.3 Concentración y cuantificación de los productos de PCR	38
5.2.8.4 Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)	38
5.2.8.5 Análisis de las secuencias	40
5.3 Análisis químicos	40
5.3.1 Medición de DQO	40
5.3.2 Medición de pH	41
5.3.3 Medición de alcalinidad como carbonato de calcio	41
5.3.4 Medición de sulfato, acetato y lactato	42
5.3.5 Medición de sulfuro	43
5.3.6 Determinación de los sólidos suspendidos totales y volátiles del inóculo y sólidos inmovilizados en el soporte	43
5.4 Cálculos	44
5.4.1 Cálculo de la eficiencia de remoción de DQO	44
5.4.2 Cálculo de la concentración de DQO removida por BSR	45
5.4.3 Cálculo de la concentración de DQO removida por bacterias no sulfato-reductoras	45

5.4.4	Cálculo de la eficiencia de remoción de sulfato	46
5.4.5	Cálculo de la concentración teórica de acetato en los reactores	46
5.4.6	Cálculo de la concentración de acetato consumido	47
5.4.7	Cálculo de las actividades específicas ASR y AME del lodo inóculo y de las biopelículas	47
5.4.8	Balance másico total de compuestos azufrados	48
5.4.9	Balance porcentual de remoción de sustratos alimentados	48
<b>6.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	
6.1	Determinación de la actividad específica del inóculo de los reactores LFFD	52
6.2	Desempeño de los reactores LFFD	53
6.2.1	Desempeño del reactor RA	55
6.2.2	Desempeño del reactor RB	57
6.2.3	Desempeño del reactor RC	59
6.2.4	Desempeño del reactor RD	60
6.2.5	Consumo de sustratos y balance másico total de azufre en los reactores LFFD	63
6.2.6	Comparación y discusión del desempeño de los reactores LFFD en fase de arranque	67
6.3	Desarrollo y desempeño de las biopelículas de los reactores LFFD	74
6.3.1	Perfiles de velocidad de producción de sulfuro por las biopelículas	75
6.3.2	Perfiles de biomasa adherida al soporte en los reactores LFFD	77
6.3.3	Actividades específicas de las biopelículas	79
6.4	Sólidos volátiles inmovilizados al final de la operación de los reactores LFFD	81
6.5	Discusión integrante del comportamiento de los reactores LFFD operados y sus respectivas biopelículas	84
6.6	Análisis de la comunidad microbiana	86
6.6.1	Concentración de ADN de los inóculos, de las biopelículas y de los líquidos de reactor	86
6.6.2	Perfiles de DGGE	89
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y Perspectivas</b>	
7.1	Conclusiones	107
7.2	Perspectivas	108
<b>8.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	111
<b>9.</b>	<b>Anexos</b>	123

## Índice de tablas

Tabla 2.1	Reacciones involucradas en la degradación anaerobia de materia orgánica.	4
Tabla 2.2	Propiedades de algunas BSR identificadas que crecen a temperatura ambiente	11
Tabla 2.3	Influencia de la relación DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> en el proceso de sulfato-reducción.	20
Tabla 5.1	Composición del medio basal de alimentación de los reactores UASB y LFFD.	28
Tabla 5.2	Composición del medio basal para determinar la AME.	28
Tabla 5.3	Composición del medio basal para determinar la ASR.	28
Tabla 5.4	Composición de la solución de oligoelementos.	29
Tabla 5.5	Condiciones de operación de los reactores LFFD para evaluar la influencia de la relación DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> y del TRH durante el arranque.	30
Tabla 5.6	Mezcla de reacción para la PCR.	36
Tabla 6.1	Balance másico total de compuestos azufrados en los reactores LFDD.	66
Tabla 6.2	Desempeño promedio de los reactores LFFD en el periodo pseudo-estable de su fase de arranque.	67
Tabla 6.3	Actividades sulfato-reductoras específicas (g DQO-H <sub>2</sub> S/g SSV-d) del inóculo y de las biopelículas al final de la operación de los reactores LFFD.	80
Tabla 6.4	Actividades metanogénicas específicas (g DQO-CH <sub>4</sub> /g SSV-d) del inóculo y de las biopelículas al inicio y al final de la operación de los reactores LFFD con acetato como substrato.	80

Tabla 6.5	Concentración de ADN de los productos de PCR.	88
Tabla 6.6	Afiliación taxonómica de las secuencias del gen bacteriano ARNr 16S de las bandas cortadas del gel de DGGE de los reactores RA y RB.	93
Tabla 6.7	Afiliación taxonómica de las secuencias del gen bacteriano ARNr 16S de las bandas cortadas del gel de DGGE del reactor RC.	94
Tabla 6.8	Afiliación taxonómica de las secuencias del gen bacteriano ARNr 16S de las bandas cortadas del gel de DGGE del reactor RD.	95

## Índice de figuras

Figura 2.1	Diagrama general de digestión anaerobia de la materia orgánica.	3
Figura 2.2	Etapas del ciclo biológico del azufre.	6
Figura 2.3	Distribución de especies de sulfuro en función del pH.	13
Figura 5.1	Diagrama del reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB).	26
Figura 5.2	Diagrama del reactor de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD).	27
Figura 6.1	Caracterización del inóculo. ASR (g DQO-H <sub>2</sub> S / g SSV-d) y AME (g DQO-CH <sub>4</sub> / g SSV-d) antes de inocular el reactor UASB; y al día 50: inóculo para los reactores LFFD.	52
Figura 6.2	Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente (■) de los reactores LFFD; a) RA, b) RB, c) RC y d) RD.	54
Figura 6.3	Desempeño del reactor RA. a) Perfil de concentración de sulfuro disuelto (◇), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato (Δ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO (□); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total (●), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).	55
Figura 6.4	Desempeño del reactor RB. a) Perfil de concentración de sulfuro disuelto (◇), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato (Δ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO (□); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total (●), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).	57
Figura 6.5	Desempeño del reactor RC. a) Perfil de concentración de	

	sulfuro disuelto ( $\diamond$ ), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato ( $\Delta$ ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO ( $\square$ ); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total ( $\bullet$ ), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).	59
Figura 6.6	Desempeño del reactor RD. a) Perfil de concentración de sulfuro disuelto ( $\diamond$ ), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato ( $\Delta$ ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO ( $\square$ ); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total ( $\bullet$ ), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).	61
Figura 6.7	Porcentaje de DQO consumida y fracción de DQO consumida vía sulfato-reducción (SR) u otros procesos metabólicos en cada uno de los reactores LFFD.	63
Figura 6.8	Velocidad de producción de sulfuro (mg $H_2S/L$ -d) cuantificada en el inóculo (tiempo 0) y en las biopelículas formadas a diferentes días de operación de los reactores, y la concentración de sólidos inmovilizados (SVI/Ls) ( $\blacksquare$ ) en los reactores RA (a), RB (b), RC (c), RD (d).	75
Figura 6.9	Cantidad de sólidos volátiles inmovilizados sobre el soporte (g SVI/Ls) por los cuatro reactores LFFD al día final de su operación.	82
Figura 6.10	Geles de agarosa de los productos de PCR de las muestras de inóculos, biopelículas y líquidos de reactor. La identificación de las muestras es la siguiente: C+: control positivo de PCR; C-: control negativo de PCR; I1: inóculo de RA y RB; I2: inóculo de RC y RD. L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después la letra indica el reactor (1=RA, 2=RB, etc.), el segundo número indica el día en que se tomó la muestra a partir de la inoculación: 0 = 0	

días, 1 = 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5 = 35 días.

87

Figura 6.11 Perfil de DGGE del gen ARNr 16s de los reactores LFFD RA y RB. La identificación de las muestras es la siguiente: I1: inóculo de RA y RB; L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después de la letra indica el reactor (1=RA, 2=RB); el segundo indica el día en que se tomó la muestra: 0 = 0 días, 1 = 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5 = 35 días. Los códigos en las bandas indican las bandas que se cortaron. El asterisco indica las bandas que se lograron secuenciar.

90

Figura 6.12 Perfil de DGGE del gen ARNr 16s del reactor LFFD RC. La identificación de las muestras es la siguiente: I1: inóculo de RA y RB; L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después de la letra indica el reactor (1=RA, 2=RB); el segundo indica el día en que se tomó la muestra: 0 = 0 días, 1 = 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5 = 35 días. Los códigos en las bandas indican las bandas que se cortaron. El asterisco indica las bandas que se lograron secuenciar.

91

Figura 6.13 Perfil de DGGE del gen ARNr 16s del reactor LFFD RC. La identificación de las muestras es la siguiente: I1: inóculo de RA y RB; L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después de la letra indica el reactor (1=RA, 2=RB); el segundo indica el día en que se tomó la muestra: 0 = 0 días, 1 = 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5 = 35 días. Los códigos en las bandas indican las bandas que se cortaron. El asterisco indica las bandas que se lograron secuenciar.

92

## Índice de ecuaciones

Ecuación 2.1	Ecuación general del proceso de sulfato-reducción.	5
Ecuación 2.2	Ecuación media de reducción de sulfato.	5
Ecuación 2.3	Formación del sulfuro de hidrógeno.	5
Ecuación 2.4	Precipitación de sulfuros metálicos.	5
Ecuación 2.5	Formación de dióxido de carbono.	6
Ecuación 2.6	Disolución de dióxido de carbono en medio acuoso.	6
Ecuación 2.7	Producción de ácido carbónico.	6
Ecuación 2.8	Primera disociación del ácido carbónico.	6
Ecuación 2.9	Segunda disociación del ácido carbónico.	6
Ecuación 2.10	Relación DQO/sulfato.	7
Ecuación 2.11	Primera disociación del sulfuro de hidrógeno.	13
Ecuación 2.12	Segunda disociación del sulfuro de hidrógeno.	13
Ecuación 5.1	Cuantificación de la alcalinidad total.	42
Ecuación 5.2	Cuantificación de la alcalinidad por bicarbonato.	42
Ecuación 5.3	Eficiencia de remoción de DQO.	45
Ecuación 5.4	Concentración de DQO removida por BSR.	45
Ecuación 5.5	Concentración de DQO removida por bacterias no sulfato-reductoras.	45
Ecuación 5.6	Eficiencia de remoción de sulfato.	46
Ecuación 5.7	Concentración teórica de acetato en los reactores.	46
Ecuación 5.8	Concentración de acetato producido en los reactores de la oxidación incompleta de lactato.	46
Ecuación 5.9	Concentración de acetato consumido.	47
Ecuación 5.10	Actividad sulfato-reductora específica.	47
Ecuación 5.11	Actividad metanogénica específica.	47
Ecuación 5.12	Mili-equivalentes electrónicos donados por la oxidación incompleta de lactato.	49

Ecuación 5.13	Mili-equivalentes electrónicos aceptados por el sulfato reducido.	50
Ecuación 5.14	Mili-equivalentes electrónicos donados por acetato.	50
Ecuación 5.15	Mili-equivalentes electrónicos donados por la DQO consumida	50
Ecuación 5.16	Mili-equivalentes electrónicos aceptados por otros procesos metabólicos.	50
Ecuación 5.17	Porcentaje de DQO consumida vía sulfato-reducción.	51
Ecuación 5.18	Porcentaje de DQO consumida vía otros procesos metabólicos.	51
Ecuación 5.19	Porcentaje de DQO como lactato consumida vía sulfato-reducción.	51
Ecuación 5.20	Porcentaje de DQO como acetato consumida vía sulfato-reducción.	51

## **Anexos**

Anexo 1. Soluciones empleadas en el análisis molecular	123
Anexo 2. Fundamento de la determinación de alcalinidad	125
Anexo 3. Concentración de sulfuro en fase gaseosa	127
Anexo 4. Análisis estadístico del desempeño de los reactores LFFD	128
Anexo 5. Imágenes de los reactores UASB y LFDD empleados	131
Anexo 6. Productos científicos	132

## Lista de abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribunucleico
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato)
<b>AME</b>	Actividad metanogénica
<b>ARNr 16s</b>	Subunidad 16s del ácido ribonucleico ribosomal
<b>ASR</b>	Actividad sulfato-reductora
<b>ATE</b>	Aceptores terminales de electrones
<b>BESA</b>	Ácido 2-bromoetanosulfónico.
<b>BSR</b>	Bacterias sulfato-reductoras
<b>CH<sub>4</sub></b>	Metano
<b>CH<sub>2</sub>O</b>	Materia orgánica
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CSTR</b>	Continuos stirred tank reactor (Reactor completamente mezclado)
<b>DAM</b>	Drenaje ácido de mina
<b>DGGE</b>	Denaturing gradient gel electrophoresis (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante)
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Relación demanda química de oxígeno/sulfato (g/g)
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>ER</b>	Eficiencia de remoción
<b>fs</b>	Fracción de electrones a síntesis de biomasa
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro
<b>Ka</b>	Constante de disociación ácida
<b>Ks</b>	Constante de afinidad al sustrato
<b>LFFD</b>	Lecho fluidificado de flujo descendente
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline (Buffer de fosfatos salino)
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

<b>pKa</b>	Logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido.
<b>PVP-CTAB</b>	Polyvinylpyrrolidone - Cetyltrimethyl-ammonium bromide (Poli vinil pirrolidona-bromuro de cetiltrimetil amonio)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	Sulfito
<b>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	Tiosulfato
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Sulfato
<b>SR</b>	Sulfato-reducción
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles
<b>SST</b>	Sólidos suspendidos totales
<b>STI</b>	Sólidos totales inmovilizados
<b>SVI</b>	Sólidos volátiles inmovilizados
<b>TRH</b>	Tiempo de residencia hidráulico
<b>UASB</b>	Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente)
<b>Y<sub>x</sub></b>	Rendimiento celular; masa celular seca por mol de substrato disponible.

**Piña Salazar Elda Zoraida (2010). Desarrollo de biopelículas en un reactor de lecho fluidificado de flujo descendente a diferente relación DQO/sulfato y tiempo de residencia hidráulico. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, México.**

Palabras clave: acetato, biomasa inmovilizada, actividad sulfato-reductora, sulfuro.

**Resumen**

Un contaminante potencial en agua es el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), el cual se descarga principalmente al ambiente en efluentes industriales. El  $\text{SO}_4^{2-}$  puede ser reducido a sulfuro mediante sulfato-reducción (SR) biológica. El sulfuro es un marcador de contaminación del agua. El principal metabolito producido de la SR es el acetato, lo que implica presencia de materia orgánica en el efluente de los reactores de tratamiento por lo que se traduce en baja eficiencia de remoción de materia orgánica (DQO). La eficiencia de remoción de  $\text{SO}_4^{2-}$  incrementa al aumentar la relación DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$ ; la operación del reactor a tiempos de residencia hidráulica (TRH) altos mejora la remoción de DQO al permitir el desarrollo de microorganismos con tiempos de duplicación mayores que consumen la DQO remanente. Los reactores de biopelícula como el reactor de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD) son una alternativa eficaz para la SR; sin embargo, su fase de arranque constituye un paso crucial en el desarrollo de la biopelícula, al seleccionar y aclimatar la biomasa que formará la comunidad microbiana capaz de sobrevivir bajo las condiciones operacionales del reactor para lograr la remoción completa de DQO y  $\text{SO}_4^{2-}$ . El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la relación DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  y del TRH en el desarrollo de una biopelícula en la fase de arranque (35 días) de un reactor LFFD sin operarlo en lote por periodos prolongados (>40 d). Cada reactor fue inoculado con 1.6 g SSV/L de lodo granular; se utilizó polietileno de baja densidad como material de soporte; la alimentación consistió en medio mineral a pH 5.5 con 1 g DQO/L de acetato-lactato (70%:30%) y sulfato de sodio. Se llevaron a cabo 4 experimentos en continuo a temperatura ambiente bajo diferentes valores de TRH y DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$ : 1 día y 0.67 (RA), 1 día y 2.5 (RB), 2 días y 0.67 (RC), ó 2 días y 2.5 (RD). El inóculo se mantuvo activo bajo condiciones de SR en un reactor UASB, las actividades sulfato-reductora (ASR) y metanogénica (AME) fueron de 0.02 a 0.30 g DQO- $\text{H}_2\text{S}$ /g SSV-d y 0.08 g DQO- $\text{CH}_4$ /g SSV-d, respectivamente. En el periodo pseudo-estable (últimos 7 días) de operación de los reactores RA, RB, RC y RD, la producción de sulfuro fue de 47.9, 55.2, 72.8 y 83.2 mg  $\text{H}_2\text{S}$ /L; las eficiencias de remoción de  $\text{SO}_4^{2-}$  fueron de 9.8, 43.1, 22.4 y 66.1% y las eficiencias de remoción de DQO fueron 33.4, 35.6, 71.6 y 69.8%, respectivamente. En los cuatro experimentos hubo consumo de lactato y acetato por bacterias sulfato-reductoras (BSR), sin embargo, en los reactores operados a TRH de 2 días (RC y RD) fue mayor el consumo de substratos por BSR y por otros microorganismos. La cantidad de biomasa inmovilizada fue mayor en RA (1.9 g SSV/Ls) y menor en RD (0.9 g SSV/Ls) y las ASR fueron mayores en RA y RB. La comunidad microbiana en las biopelículas fue diferente a la del inóculo; los microorganismos identificados en RA y RB fueron BSR principalmente, entre ellos *Desulfovibrio*, mientras que en RC y RD se formó una comunidad microbiana más heterogénea compuesta por BSR y géneros como *Clostridium* y *Chloroflexi*. Este trabajo mostró la formación de una biopelícula en un LFFD en 35 días y la influencia de la relación TRH y DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  en el desempeño del reactor, composición microbiana y actividad de la biopelícula. La producción de sulfuro y remoción de  $\text{SO}_4^{2-}$  aumentó al incrementar la relación DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  y la remoción de DQO mejoró al aumentar el TRH. Además se demostró que la biomasa planctónica tiene una contribución importante en el desempeño del reactor.

**Piña Salazar Elda Zoraida (2010). Biofilm development in a down-flow fluidized bed reactor at different COD/sulfate ratio and hydraulic residence time. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica. San Luis Potosí, México.**

Key words: acetate, immobilized biomass, sulfate-reducing activity, sulfide.

### **Abstract**

Sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) is a potential pollutant of water; it is discharged to the environment in several industrial effluents. Sulfate can be reduced to sulfide through the biological sulfate reduction (SR) process. Sulfide is a marker of pollution in water. The main metabolite produced of SR is acetate, which implies the presence of organic matter in the effluent treatment reactors which produces low organic matter removal efficiency expressed as chemical oxygen demand (COD). Sulfate removal efficiency increases when the COD/ $\text{SO}_4^{2-}$  ratio is increased; the high hydraulic residence time (HRT) increases COD removal efficiency allowing the development of microorganisms with higher duplication time which consume remaining COD. Biofilm reactors as the down-flow fluidized bed reactor (DFFBR) are an effective alternative to carry out SR. However its start-up phase constitutes a crucial step in the biofilm development, selecting and acclimatizing the biomass that will compose the microbial community and will be able to survive under the operational conditions of the reactor, to achieve complete COD and sulfate removal. The aim of this work was to study the influence of DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  ratio and HRT in the development of a biofilm during the start-up (35 days) of a DFFBR without being operated in batch for a long period (> 40 d). Each reactor was inoculated with 1.6 g VSS/L of granular sludge, grinded low density polyethylene was used as support material. The feed consisted of mineral medium at pH 5.5 with 1g COD/L (acetate-lactate, 70:30) and sodium sulfate. Four experiments were conducted in continuous regime at room temperature under different HRT and COD/ $\text{SO}_4^{2-}$ : 1 day and 0.67 (RA), 1 day and 2.5 (RB), 2 days and 0.67 (RC) or 2 days and 2.5 (RD). Before inoculation, the inoculum was maintained under sulfate-reducing conditions in a UASB reactor, the sulfate-reducing activity (SRA) was between 0.02 and 0.30 g COD- $\text{H}_2\text{S}$ /g VSS-d and the methanogenic activity (MA) was 0.08 g COD- $\text{CH}_4$ /g VSS-d. In the pseudo-stable period (last 7 days) of the start-up of reactors sulfide production was 47.9, 55.2, 72.8 and 83.2 mg  $\text{H}_2\text{S}$ /L; sulfate removal efficiencies were 9.8, 43.1, 22.4 and 66.1%, and COD removal efficiencies were 33.4, 35.6, 71.6 and 69.8% in RA, RB, RC y RD, respectively. Lactate and acetate were consumed in the four reactors by sulfate-reducing bacteria (SRB). However, substrate consumption by SRB and other microorganisms was higher in the reactors operated at 2 days (RC and RD). The immobilized biomass was higher in RA (1.9 g VSS/Ls) and lower in RD (0.9 g VSS/Ls) and SRA was higher in RA and RB. Microbial community established in the reactors was different than the inoculum microbial community; SRB from the genera *Desulfovibrio* were identified mainly in RA and RB, while a more heterogeneous microbial community composed by SRB, *Clostridium* and *Chloroflexi* was established in RC and RD. This work demonstrated biofilm formation in a DFFBR in 35 days and the influence of HRT and COD/ $\text{SO}_4^{2-}$  ratio in the reactor performance, microbial composition and biofilm activity. Sulfide production and sulfate removal increased when COD/ $\text{SO}_4^{2-}$  ratio was increased, and COD removal efficiency increased when HRT was increased. Moreover it was demonstrated that planktonic biomass contributes in great extent to the performance of the reactor.

## 1 INTRODUCCIÓN

Un contaminante potencial es el sulfato, el cual puede ser reducido a sulfuro (marcador de la contaminación del agua) mediante el proceso de sulfato-reducción biológica (Lettinga, 1998). Las aguas residuales que contienen sulfato y materia orgánica son generadas por muchos procesos industriales tales como la agroindustria, la industria papelera, la industria de alimentos, la industria textil, la industria electrónica, la industria fotográfica, la tenería, la minería, entre otras (Hulshoff Pol *et al.*, 1998). Aunado a la presencia de sulfato, es posible encontrar en las aguas residuales otras formas menos oxidadas del azufre tales como tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) o sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), lo que condiciona la necesidad de tratamiento de estas aguas (Liamleam y Annachhatre, 2007). Se han encontrado concentraciones de sulfato de hasta 200 mg/L en efluentes agroindustriales o mayores a 1000 mg/L en efluentes de industrias papeleras o de fermentación (Hulshoff Pol *et al.*, 1998). La industria minera, por su parte, genera efluentes ácidos con alta cantidad de sulfato y baja cantidad de materia orgánica expresada como demanda química de oxígeno (DQO). A este tipo de efluente se le conoce como drenaje ácido de mina (DAM), el cual constituye un problema severo de contaminación. Al respecto, Maree y Strydon (1985) reportaron aguas residuales de minas con cerca de 1980 mg/L de sulfato, 100 mg/L de DQO y presencia de algunos metales, mientras que Neculita *et al.* (2007) encontraron concentraciones de DQO menores a 10 mg/L en este tipo de efluentes. Para los efluentes con bajo contenido de DQO y metales en solución, la sulfato-reducción se considera una alternativa viable de bio-tratamiento que permite la remoción de metales presentes en el agua, remoción de sulfato y producción de bajas cantidades de lodo residual (Kaksonen *et al.*, 2003a), sin embargo, este proceso requiere la adición externa de donadores de electrones ó materia orgánica (Hulshoff Pol *et al.*, 1998; Kolmert y Johnson, 2001; Liamleam y Annachhatre, 2007; Bayrakdar *et al.*, 2009).

La sulfato-reducción forma parte de la digestión anaerobia y es llevada a cabo por los microorganismos conocidos como bacterias sulfato-reductoras

(BSR). Este proceso se ha estudiado a nivel laboratorio en diferentes configuraciones de reactores como los reactores de tanque agitado (CSTR), reactores de lecho de lodo (UASB) y reactores de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD).

El reactor LFFD es un reactor de biopelícula, es decir, la remoción de contaminantes es llevada a cabo por la comunidad microbiana establecida sobre un material de soporte inerte, lo que permite retener durante largos periodos de tiempo la biomasa en el reactor y por consecuencia una biopelícula estable y activa, y eficiencias altas de remoción de contaminantes (Celis-García *et al.*, 2004).

De acuerdo con investigaciones recientes, aunque el sulfato sea removido con altas eficiencias en un reactor LFFD sulfato-reductor, la baja remoción de materia orgánica constituye un problema que debe resolverse, debido a que la oxidación incompleta de sustrato genera acetato en el efluente y éste al estar presente a altas concentraciones y pH bajo puede llegar a ser inhibitorio de la actividad metabólica de la biopelícula formada (Reis *et al.*, 1990; Nagpal *et al.*, 2000; Kaksonen *et al.*, 2003a,b; Celis-García *et al.*, 2007; Sahinkaya *et al.*, 2007). La presente investigación aborda esta problemática en busca de las condiciones de arranque que pueden favorecer una biopelícula que sea capaz de llevar a cabo con eficiencia el proceso de sulfato-reducción a pH ácido con remoción eficiente de materia orgánica. Dicho proceso sería potencialmente aplicado al tratamiento de DAM. Para ello, la estrategia utilizada fue la aplicación de condiciones para la selección de BSR en la biopelícula con base en los parámetros operacionales del reactor, como son la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  y el tiempo de residencia hidráulico (TRH), de tal manera que se logre el desarrollo y actividad eficiente de la biopelícula en la remoción de sulfato y DQO.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia consiste en la transformación de la materia orgánica en biogás mediante la acción de varios grupos de microorganismos. Las etapas de la digestión anaerobia son: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. El proceso de sulfato-reducción forma parte del esquema general de la digestión anaerobia en presencia de sulfato (Fig. 2.1), por lo que es un proceso inherente a otras etapas de la digestión anaerobia (Visser, 1995), las cuales se describen brevemente a continuación:

a. Hidrólisis: Conversión de moléculas complejas (proteínas, polisacáridos y lípidos) a compuestos más simples (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena corta) por la acción de bacterias hidrolíticas.

b. Acidogénesis o fermentación: Degradación de los productos de hidrólisis a compuestos como alcoholes, ácidos grasos volátiles (AGV) como lactato, butirato, propionato y acetato, así como hidrógeno y dióxido de carbono.

c. Acetogénesis: Generación de acetato e hidrógeno a partir de AGV.

d. Metanogénesis: Generación de metano, ya sea a partir de acetato o a partir de hidrógeno y dióxido de carbono.

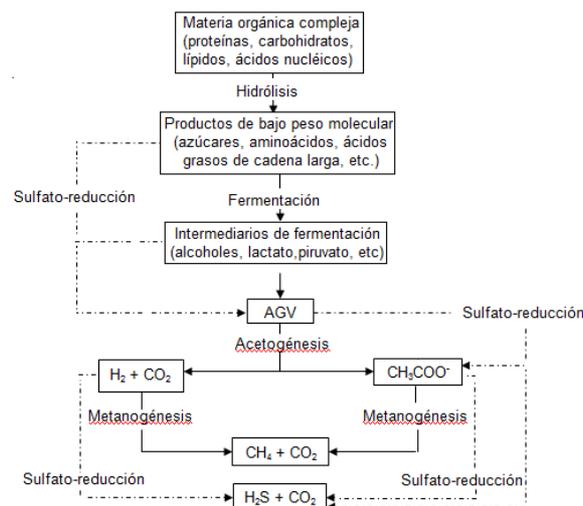


Figura 2.1 Diagrama general de digestión anaerobia de la materia orgánica (Gibson 1990; Lens *et al.*, 2000). Las líneas punteadas indican que el proceso sólo se lleva a cabo en presencia de sulfato.

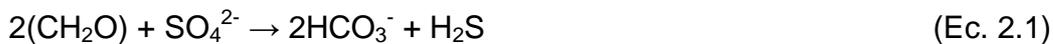
La tabla 2.1 muestra las principales reacciones involucradas en la digestión anaerobia, las cuales son llevadas a cabo por microorganismos fermentativos, acetogénicos, metanogénicos y en ocasiones sulfato-reductores.

Tabla 2.1 Reacciones involucradas en la degradación anaerobia de materia orgánica en sistemas anaerobios (Tahuer *et al.*, 1977; Gibson 1990; Oude Elferink *et al.*, 1994).

Reacciones	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)
Reacciones fermentativas	
$3\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-124.99
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	-66.84
$3\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2\text{O}$	+276.93
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CH}_3\text{COO}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$	-38.6
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O}$	-116.35
Reacciones acetogénicas	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	-4.2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9.6
Reacciones metanogénicas	
$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6
$\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
Reacciones sulfato-reductoras	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3/4\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3/4\text{HS}^- + 1/4\text{H}^+$	-37.7
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 1/2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 1/2\text{HS}^- + 1/2\text{H}^+$	-27.8
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 1/2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 1/2\text{HS}^- + \text{H}^+$	-80.0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 1/2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 1/2\text{HS}^- + 1/2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-66.4
$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-151.1
$\text{CH}_3\text{COO}^-$ : acetato; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ : propionato; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ : butirato $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ : lactato; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ : etanol; $\text{H}_2$ : hidrógeno	

### 2.1.1 Proceso biológico de sulfato-reducción

La sulfato-reducción biológica es el proceso por el cual el sulfato se reduce a sulfuro mediante la disminución del estado de oxidación del azufre desde  $S^{6+}$  hasta  $S^{2-}$ , lo que se logra al transferir 8 electrones por átomo de azufre. Mientras que el sulfato se reduce a sulfuro, la materia orgánica ( $CH_2O$ ) dona electrones para oxidarse a compuestos como acetato ( $CH_3COO^-$ ) ó dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (Ec. 2.1).



Según Liamlean y Annachhatre (2007) el sulfuro puede encontrarse como sulfuro ( $S^{2-}$ ) o como sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) en el caso de que se combine con hidrógeno del medio (Ec. 2.2 y 2.3, respectivamente), lo cual está condicionado por el valor de pH del medio en el que se encuentre, tal como se expresara más adelante.



El sulfuro de hidrógeno formado puede utilizarse para la precipitación de metales (Ec. 2.4). Los sulfuros metálicos insolubles producto de la precipitación de metales deben separarse de las corrientes acuosas para procesarlos posteriormente recuperando los metales removidos (Lens y Kuenen, 2001).



donde:



La sulfato-reducción forma parte del ciclo biológico del azufre (Figura 2.2) y se lleva a cabo en la zona reductiva no asimilativa del mismo. Las principales etapas de este ciclo son: 1) reducción asimilativa de sulfato, 2) mineralización, 3) oxidación de sulfuro, 4) reducción no asimilativa de azufre, y 5) reducción no asimilativa de sulfato o sulfato-reducción. Esta última es llevada a cabo por las bacterias sulfato-reductoras (Visser, 1995).

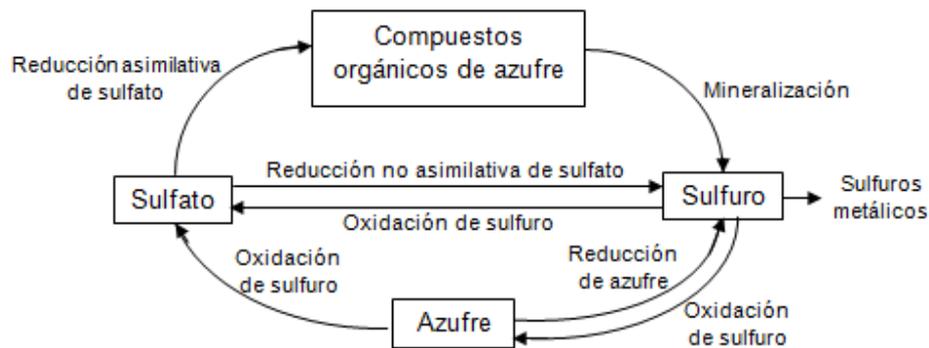


Figura 2.2 Etapas del ciclo biológico del azufre (Visser, 1995).

La oxidación microbiana de la materia orgánica o mineralización produce alcalinidad (bicarbonato) (Ec. 2.1) a partir de dióxido de carbono que en medio acuoso genera ácido carbónico. A partir del ácido carbónico se genera el bicarbonato (Ec. 2.5 a Ec. 2.9).



Si la materia orgánica ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) es oxidada mediante sulfato-reducción, la eficiencia del proceso estará influenciada por la proporción de sulfato y materia orgánica en el agua a tratar, es decir, la relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ . La reducción de

sulfato, entonces, está condicionada a la presencia de una mínima cantidad teórica de materia orgánica expresada como DQO. Como se presentó en la ecuación 2.2, para que se reduzca un mol de sulfato (96 g) se necesitan 8 equivalentes de electrones (e-); de acuerdo con Rittmann y McCarty (2001) 8 g de DQO pueden donar 1 equivalente de electrones (e-). De lo anterior se puede calcular que por cada 64 g de DQO se pueden reducir 96 g de  $SO_4^{2-}$  y la relación DQO/ $SO_4^{2-}$  teórica sería 0.67 (Ec. 2.10), o expresado de otra manera, 1 mg de sulfato puede oxidar 0.66 mg DQO (Speece, 1996).

$$\frac{DQO}{SO_4^{2-}} = \frac{64g}{96g} = 0.67 \quad (\text{Ec. 2.10})$$

En el proceso de sulfato-reducción se pueden usar como donadores de electrones el acetato y el hidrógeno molecular (acetato mediante BSR acetotróficas e hidrógeno por BSR autotróficas), mismos que son consumidos por microorganismos metanogénicos, lo cual propicia la competencia entre las BSR y los metanógenos por estos substratos. De igual manera, las BSR compiten con las bacterias acetogénicas por propionato en presencia de sulfato como aceptor de electrones. Lo anterior da lugar a una competencia entre los grupos bacterianos involucrados en la digestión anaerobia (Widdel, 1988; Visser, 1995; Omil *et al.*, 1998). Sin embargo, en ausencia de sulfato las BSR pueden obtener energía de la fermentación de materia orgánica (Lens y Kuenen, 2001).

De acuerdo con Maillacheruvu y Parkin (1996), existen dos puntos clave a considerar en la subsistencia de una población microbiana en sistemas con materia orgánica compleja: la competencia entre las BSR, microorganismos metanogénicos y microorganismos fermentadores por el donador de electrones, y la inhibición bacteriana por el sulfuro generado como producto de la sulfato-reducción. La presencia de sulfato en las aguas residuales aumenta considerablemente la complejidad de las rutas de degradación de materia orgánica (Widdel, 1998), al generar competencia entre las bacterias

acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas con las BSR por los substratos disponibles (Lens y Kuenen, 2001). Al considerar las rutas metabólicas desde el punto de vista cinético; afinidad a substrato y tasa de crecimiento específica bacteriana ( $K_s$  y  $\mu_{m\acute{a}x}$ , respectivamente), y termodinámico, las BSR pueden competir por los mismos substratos con los microorganismos metanogénicos (Lettinga *et al.*, 1998); por ejemplo, para el caso del acetato, la  $K_s$  de los microorganismos metanogénicos es alrededor de 32.8 mg acetato/L mientras que la de las BSR es de 9.3 mg acetato/L (Rittmann y McCarty, 2001), por lo cual, la sulfato-reducción será el proceso dominante en reactores anaerobios que tratan aguas residuales con cantidades altas (entre 1000 y 5000 mg/L) o no limitantes de sulfato (Ward y Winfrey, 1985; Widdel, 1988; Lens *et al.*, 2000; Velasco *et al.*, 2008). Al respecto, Velasco *et al.* (2008) logró 98% de remoción de sulfato al operar un reactor UASB a una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 2.5 con una concentración de sulfato de 1.5 g/L, mientras que Hidalgo y García-Encina (2001) mencionan que el operar un reactor UASB a concentraciones de sulfato entre 2.0 y 4.0 g/L permite el desarrollo satisfactorio de la sulfato-reducción. Por su parte, la metanogénesis predomina en ambientes con baja concentración de sulfato, menos de 25 mg/L (Stams, 1994; Hidalgo y García-Encina, 2001).

### **2.1.2 Bacterias sulfato-reductoras**

Las bacterias sulfato-reductoras son microorganismos que requieren condiciones anaerobias y potencial redox de -200 mV para realizar sus funciones metabólicas (Church *et al.*, 2007). Algunas pueden tolerar concentraciones de O<sub>2</sub> (de aproximadamente 15  $\mu$ M) y reducirlo por un periodo de tiempo limitado (Lens y Kuenen, 2001; Dolla *et al.*, 2006) u ocasionalmente crecer con SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> o S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> como aceptores de electrones. Otros aceptores de electrones utilizados por las BSR, aunque en menor medida son azufre elemental (S<sup>0</sup>) o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para producir H<sub>2</sub>S o NH<sub>3</sub>, fumarato, dimetilsulfóxido (DMSO), Mn (IV) y Fe (III) (Lens y Kuenen, 2001; Tahuer *et al.*, 2007). Pueden crecer en presencia o ausencia de sulfato (agente oxidante o

aceptor de electrones) utilizando vías metabólicas diferentes, una fermentativa y otra oxidativa, ya sea de manera heterótrofa o autótrofa.

Se ha identificado amplia biodiversidad microbiana de BSR en sedimentos marinos y ecosistemas acuáticos (Conell *et al.*, 1984; Church *et al.*, 2007), en plantas de tratamiento de agua residual, en DAM o en lagunas carbonatadas (Muyzer y Stams, 2008). Estas bacterias presentan morfología variada: estafilococos, vibriones, agregados similares a sarcinas y filamentos multicelulares.

Existen dos procesos que soportan el crecimiento de las BSR. Éstos son la oxidación de materia orgánica (fosforilación a nivel sustrato) y la reducción de sulfato (fosforilación de transporte de electrones) (Widdel, 1988).

En general, los donadores de electrones para las BSR son los productos finales de la fermentación, tales como compuestos de bajo peso molecular o ácidos alifáticos dicarboxílicos, así como alcoholes y compuestos aromáticos polares e hidrocarburos. Las fuentes de carbono preferidas por las BSR son los compuestos de bajo peso molecular derivados de la degradación anaerobia de carbohidratos, proteínas y lípidos (Kaksonen *et al.*, 2004b), aunque también pueden crecer en presencia de glucosa, fructosa, etanol e hidrógeno como sustrato (Liamleam y Annachatre, 2007).

Las BSR se clasifican en dos grupos de acuerdo a su capacidad para oxidar sustratos:

a) BSR que generan acetato como producto final a partir de la oxidación incompleta de sustrato (BSR-OI), muchas veces con la formación simultánea de CO<sub>2</sub> (Rabus *et al.*, 2006). Estos microorganismos carecen de un mecanismo enzimático para la utilización de acetato por lo que éste es el producto principal de la oxidación incompleta. Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium* (Madigan *et al.*, 1997).

b) BSR que oxidan completamente el sustrato (BSR-OC) hasta CO<sub>2</sub>. Este tipo de microorganismos obtiene su energía directamente del acetato

mediante el ciclo del ácido cítrico modificado o por medio de la ruta de la Acetil CoA (Muyzer y Stams, 2008). A este grupo de bacterias pertenecen los géneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium* (Madigan *et al.*, 1997).

Se ha observado que las BSR-OI crecen sobre un número limitado de sustratos tales como lactato, etanol, piruvato, propionato y malato. Por su parte, las BSR-OC se especializan en la oxidación de los AGV, en especial del acetato, aunque crecen también con etanol o piruvato como sustratos, y sólo algunas pueden crecer autotróficamente en presencia de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Hao *et al.*, 1996). La tabla 2.2 muestra algunas propiedades de varios géneros de BSR que pueden encontrarse en el intervalo de temperatura mesofílica.

De acuerdo con Kaksonen *et al.* (2003b) y Celis *et al.* (2009), la oxidación de materia orgánica dentro del proceso de sulfato-reducción se lleva a cabo de manera incompleta mayoritariamente. Las BSR-OI se duplican más rápido que las BSR-OC; los tiempos de duplicación de las BSR-OI son de 3 a 10 horas y los de las BSR-OC son 16 a 20 horas (Oude Elferink *et al.*, 1994).

Las BSR-OC utilizan la mayor parte de la energía que obtienen para mantenimiento celular, y tan solo el 10% para síntesis celular, por lo que se observa bajo rendimiento celular (Y<sub>x</sub>). Por ejemplo, de acuerdo con Rittmann y McCarty (2001) el valor del rendimiento celular para las BSR con H<sub>2</sub> como donador de electrones y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono es de 0.28 g SSV/g H<sub>2</sub>, mientras que el rendimiento celular de las BSR con acetato como donador de electrones y fuente de carbono es de 0.057 g SSV/g DQO; sin embargo, estos no son valores absolutos de rendimiento celular debido a que dependen de la especie bacteriana y del sustrato disponible (Rabus *et al.*, 2006). De manera general, los donadores de electrones que permiten cambios altos de energía libre y con mecanismos enzimáticos simples y comunes (H<sub>2</sub>, formato, etanol, lactato y malato) permiten crecimiento más rápido en comparación con los sustratos complejos como los compuestos aromáticos o hidrocarburos (Rabus *et al.*, 2006).

Tabla 2.2 Propiedades de algunas BSR identificadas que crecen a temperatura ambiente (Rabus *et al.*, 2006; Tahuer *et al.*, 2007).

Género	Especie	Temperatura óptima de crecimiento °C	Donadores de electrones				
			Oxidación	Hidrógeno	Lactato	Etanol	Acetato
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>orientis</i>	37	i	+	+	+	-
	<i>ruminis</i>	37	i	+	+	+	-
	<i>antarticum</i>	20 – 30	i	nr	+	nr	-
	<i>acetooxidans</i>	35	c	-	-	+	+
	<i>guttoideum</i>	31	i	+	+	-	-
	<i>sapomandens</i>	38	c	nr	-	+ <sup>-</sup>	(+)
<i>Desulfovibrio</i>	<i>desulfuricans</i>	30 – 36	i	+	+	+	-
	<i>vulgaris</i>	30 – 36	i	+	+	(+)	-
	<i>gigas</i>	30 – 36	i	+	+	<sup>a</sup>	-
	<i>africanus</i>	30 – 36	i	+	+	(+)	-
	<i>saalexigens</i>	30 – 36	i	+	+	<sup>a</sup>	-
	<i>baculatus</i>	28 – 37	i	(+)	+	+ <sup>a</sup>	-
	<i>sulfodismutans</i>	30 – 35	i	(+)	+	+ <sup>a</sup>	-
<i>sapovorans</i>	34	i	-	+	-	-	
<i>Desulfomonas</i>	<i>pigra</i>	37	i	+ <sup>a</sup>	+	+	-
<i>Desulfobulbus</i>	<i>propionicus</i>	28 – 39	i	+	+	+	-
	<i>elongatus</i>	35	i	+	+	+	-
<i>Desulfobacter</i>	<i>postgatei</i>	28 – 32	c	-	-	-	+
	<i>hydrogenophilus</i>	28 – 32	c	+	-	(+)	+
	<i>latus</i>	28 – 32	c	-	-	-	+
	<i>curvatus</i>	28 – 30	c	(+)	-	+	+
<i>Desulfococcus</i>	<i>multivorans</i>	35	c	-	+	+	(+)
	<i>niacini</i>	29	c	+	-	+	(+)
<i>Desulfosarcina</i>	<i>variabilis</i>	33	c	+	+	+	(+)
<i>Desulfobacterium</i>	<i>autotrophicum</i>	20 – 26	c	+	+	+	(+)
	<i>vacuolatum</i>	25 – 30	c	+	+	(+)	(+)
	<i>phenolicum</i>	28	c	-	-	(+)	(+)
	<i>indolicum</i>	28	c	-	-	(+)	(+)
	<i>cathecolicum</i>	28	c	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Desulfonema</i>	<i>limicola</i>	30	c	+	+	-	(+)
	<i>magnum</i>	32	c	-	-	-	(+)

c = completa, i = incompleta, + = utilizado, +\* = crecimiento autotrófico, ( ) = pobremente utilizado, - = no utilizado, +<sup>a</sup> = datos no reportados.

### **2.1.2.1 Factores que condicionan el crecimiento y función de las BSR**

A continuación se presentan los factores fisicoquímicos involucrados en el crecimiento y actividad metabólica de las BSR.

#### **2.1.2.1.1 pH**

La mayoría de las BSR prefieren un ambiente de pH entre 7.5 y 8.0, su crecimiento es inhibido a valores de pH menores de 5.5 o mayores de 9.0 (Widdel y Hansen, 1992). Sin embargo, se ha reportado el proceso de sulfato-reducción a pH menores a 5.0 (Koschorreck, 2008), pH alrededor de 3.0 en sedimentos (Koschorreck *et al.*, 2003), así como la operación de reactores sulfato-reductores a pH alrededor de 3.0 (Kaksonen *et al.*, 2003a; Kimura *et al.*, 2006; Jong y Parry, 2006), aunque la velocidad de reducción de sulfato se reduce conforme disminuye el pH.

#### **2.1.2.1.2 Temperatura**

La temperatura óptima para la mayoría de los cultivos puros de BSR es entre 28°C y 38°C y una temperatura límite más alta de 45 °C (Widdel y Hansen, 1992). La mayoría de las BSR termófilas presentan crecimiento óptimo entre 54°C y 70°C, su temperatura máxima de crecimiento es de 56°C a 85°C, por ejemplo en los géneros *Desulfotomaculum* y *Thermodesulfobacterium*. Las *Archaea* sulfato-reductoras del género *Archaeoglobus* tienen un crecimiento óptimo a 83°C y un máximo a 92°C (Rabus *et al.*, 2006).

#### **2.1.2.1.3 Toxicidad por sulfuro**

El producto metabólico del proceso de sulfato-reducción (sulfuro) inhibe el crecimiento y actividad de las BSR, así como de otras bacterias (Rinzema y Lettinga, 1988; González-Silva, 2007).

El sulfuro es un ácido diprótico que se disocia en solución dependiendo del equilibrio químico (Ec. 2.11 y 2.12) (Hulshoff Pol *et al.*, 1995). La especiación en solución de dicho ácido se presenta en la figura 2.3.

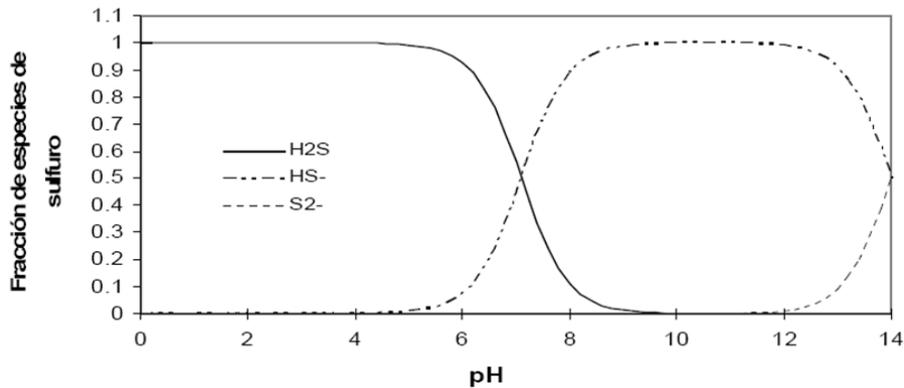
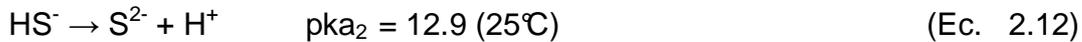
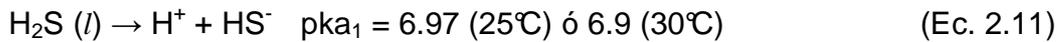


Figura 2.3 Distribución de especies de sulfuro en función del pH.

Según el valor de pKa de la primera disociación, el sulfuro en solución está presente principalmente como sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y bisulfuro (HS<sup>-</sup>). Se reconoce la existencia de permeabilidad de membrana sólo a H<sub>2</sub>S, por lo que el mecanismo de toxicidad por sulfuro más aceptado es que el H<sub>2</sub>S no disociado es el agente que genera toxicidad celular, debido a que dentro de las células este compuesto reacciona con los componentes celulares formando puentes sulfuro o bisulfuro de las cadenas polipeptídicas, lo que inhibe la actividad bacteriana (Oude Elferinck *et al.*, 1994). Otro mecanismo propuesto es la combinación de algunas de las especies de sulfuro (H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup> y S<sup>2-</sup>) con sitios activos de las enzimas como el ion Fe<sup>2+</sup> de la ferredoxina, citocromos y de otros componentes esenciales en la célula, lo que causa que los sistemas de transporte de electrones cesen su actividad (Okabe *et al.*, 1992). El sulfuro puede también afectar el pH intracelular (Hulshoff Pol *et al.*, 1998) o precipitar metales esenciales para el crecimiento bacteriano que se encuentren presentes en el medio, de tal modo que reduce su biodisponibilidad (Isa *et al.*, 1986). De acuerdo con la distribución de especies de sulfuro en función del pH, así como la toxicidad de éstas, el intervalo de pH óptimo para la sulfato-reducción es

alrededor de 7.0, debido a que existe un equilibrio entre la forma disociada y no disociada del sulfuro (especie tóxica) que permite la presencia y actividad de BSR, y no estaría favorecido el predominio de la especie tóxica en el medio (Visser *et al.*, 1996).

La inhibición del crecimiento de las BSR puede producirse por sulfuro, pH y metales (Visser *et al.*, 1996). Sin embargo, tanto el sulfuro como los metales pueden removerse al formar un precipitado insoluble de sulfuro metálico tal como se indicó en la Ec. 1.4, disminuyendo la toxicidad del sulfuro (Karri *et al.*, 2006). Por ello, las BSR están involucradas en el tratamiento de aguas contaminadas por metales (Nagpal *et al.*, 2000).

Según Kaksonen *et al.* (2003a) y Celis-García *et al.* (2004), la toxicidad del sulfuro se ve atenuada en asociaciones de BSR en biopelícula, por lo que las propiedades de inmovilización de los microorganismos toman gran relevancia mayoritariamente al tratar efluentes con alto contenido de sulfato.

## **2.2 Biopelículas**

Una biopelícula es el producto de la asociación de microorganismos que conviven en sintrofia, unidos por interacciones electrostáticas y exopolímeros a una superficie inerte o viva. Se desarrolla principalmente en situaciones de estrés ambiental sobre las poblaciones que la conforman, por ejemplo alta fuerza cortante. Su desarrollo involucra los procesos de adhesión, crecimiento y desprendimiento celular de manera natural o debido a las fuerzas de corte (Nikolaev y Plakunov, 2007). Al estar formada de diversos microorganismos, se comporta como una comunidad microbiana integral en la que puede existir competencia entre las especies que la forman por los substratos disponibles que aseguren su subsistencia, tal es el caso de la competencia por acetato entre las BSR y los microorganismos metanogénos (Lens *et al.*, 1998; Stoodley *et al.*, 2002; Tahuer *et al.*, 2007).

La formación de una biopelícula está influenciada por el tipo de microorganismos presentes y sus actividades *in situ*, por lo que es importante

considerar su estructura, capacidad de transferencia de masa y actividad microbiana. Algunas características de este tipo de asociaciones bacterianas son la heterogeneidad, distribución de microorganismos de manera no uniforme, presencia de cavidades, poros y filamentos, así como su espesor; característica dependiente de las condiciones de crecimiento, edad de la biopelícula y de las condiciones hidrodinámicas presentes en donde se desarrolle. El espesor de las biopelículas implicadas en tratamiento de agua residual es del orden de micrómetros. Las cavidades de las biopelículas permiten el intercambio de nutrientes y productos metabólicos del interior al exterior de la misma, y viceversa (Beer y Stoodley, 2006).

Los exopolímeros constituidos por 50 a 80% de materia orgánica, principalmente carbohidratos y proteínas, son el principal componente estructural de una biopelícula, los cuales la protegen de deshidratación, de agentes tóxicos o de las fuerzas de corte. Éstos determinan las propiedades físicas de la biopelícula, mientras que las propiedades fisiológicas dependen de las células bacterianas presentes. La viscosidad e hidrofobicidad son parámetros clave en una biopelícula, la primera debe ser tal que no entorpezca significativamente la difusión de substrato, mientras que la segunda favorece la formación de agregados esféricos o películas planas por disminución de la superficie de contacto entre la película y el líquido (Stoodley *et al.*, 2002; Beer y Stoodley, 2006; Nikolaev y Plakunov, 2007). En una biopelícula, las capas externas protegen a las internas de las condiciones de estrés a que esté sometida (presencia de metales o sulfuro, por ejemplo), debido a que los componentes de dichas capas, entre ellos los exopolisacáridos secretados por los microorganismos que conforman la biopelícula, oponen resistencia a la transferencia de masa del exterior al interior de la biopelícula como el sulfuro presente (Gantzer, 1989).

Las biopelículas se constituyen de comunidades de microorganismos metabólicamente estructuradas que provienen de una especie única microbiana o de una comunidad de múltiples especies microbianas, en las que se

desarrollan asociaciones sintróficas entre los microorganismos presentes, o bien, competencia entre éstos (Tahuer *et al.*, 2007) por substratos. Las biopelículas formadas en procesos anaerobios, como la sulfato-reducción, se forman gracias a la adhesión de las células planctónicas (células suspendidas) sobre el material de soporte. Las células planctónicas provienen de un consorcio microbiano que se utiliza como inóculo o de un cultivo puro de BSR. Diversos estudios han reportado la formación de biopelículas sulfato-reductoras en diferentes tipos de reactores, en los que la mayoría de las BSR que se adhieren sobre el soporte son las BSR-OI, debido muy probablemente a los tiempos de duplicación mayores de las BSR-OC en comparación con los de las BSR-OI (Nagpal *et al.*, 2000; Kaksonen *et al.*, 2003a,b; Celis *et al.*, 2009).

### **2.3 Reactores en el estudio del proceso de sulfato-reducción**

En los últimos 25 años, el proceso de sulfato-reducción se ha estudiado en diferentes configuraciones de reactores como los reactores continuos de tanque agitado (CSTR), reactores de lecho de lodo de flujo ascendente (UASB), y reactores de biopelícula como los reactores de lecho fluidificado, entre otros (Celis-García *et al.*, 2007; Alvarado Lassman *et al.*, 2008).

Los reactores biológicos operados bajo condiciones de sulfato-reducción presentan varias ventajas en comparación con algunos tratamientos químicos que buscan la remoción de sulfato. El proceso de sulfato-reducción genera menores cantidades de lodo biológico reutilizable o producción de lodo más espeso en comparación con el método de precipitación química con hidróxidos (Kaksonen *et al.*, 2004a; Bayrakdar *et al.*, 2009).

Los reactores de lecho fluidificado tienen la característica de que una biopelícula se desarrolla sobre un soporte inerte (partículas de silicato, polietileno, esferas de vidrio poroso, gránulos de polímero sintético, polvo de carbón activado, partículas de piedra pómez, etc.) lo que mejora la transferencia másica al proveer gran área superficial de biomasa expuesta a substrato (Kaksonen y Puhakka, 2007). Las principales ventajas de este tipo de reactores

son el patrón hidrodinámico que provee un buen mezclado haciendo más eficiente el transporte de substrato a la biopelícula, el bajo tiempo de residencia hidráulico y la degradación de la materia orgánica con alta eficiencia (Celis *et al.*, 2009). De acuerdo con Buffière *et al.* (1995) y Kaksonen *et al.* (2003b), los reactores fluidificados son más estables y eficientes en el tratamiento anaerobio de aguas residuales.

Estudios previos como los de Nagpal *et al.* (2000), Kaksonen *et al.* (2003a,b) y Celis *et al.* (2009), han reportado la formación de una biopelícula sulfato-reductora con predominio de BSR-OI, atendiendo a sus tiempos de duplicación menores que los de las BSR-OC; alrededor de 3 y 15 horas, respectivamente. La oxidación incompleta de substrato es un problema frecuente en los reactores de biopelícula que impide la remoción eficiente de DQO al favorecer la acumulación de acetato en el efluente. Altas concentraciones de acetato pueden inhibir la actividad metabólica bacteriana de la biopelícula bajando el pH, así como la acidificación del sistema al no producirse la alcalinidad suficiente para neutralizarlo (Kaksonen *et al.*, 2003a,b; Weijma *et al.*, 2000).

Un tipo de reactor de lecho fluidificado es el reactor LFFD; el cual por su configuración permite el desarrollo de una biopelícula sobre partículas de un material inerte denominado soporte, formando un lecho que flota y que se fluidifica con un flujo descendente, lo que genera la expansión del lecho y permite la salida de partículas que tienden a precipitar (Celis *et al.*, 2004).

Los reactores LFFD presentan varias ventajas sobre otro tipo de reactores, tales como la posibilidad de recuperación de precipitados metálicos o de otros sólidos del líquido del reactor mediante su fondo cónico, alto tiempo de retención de biomasa (Nicolella *et al.*, 2000) y formación de una biopelícula delgada pero activa debido a la buena difusión de substrato hacia la biopelícula y de productos desde la biopelícula (Buffière y Moletta, 2000).

Se ha reportado que en muchos reactores de biopelícula, la formación de una biopelícula madura y estable toma varios meses debido a que su desarrollo

implica un balance entre la adhesión, crecimiento y desprendimiento celular (Cresson *et al.*, 2006). Al respecto, la fase de arranque de un reactor LFFD es la fase más crítica para su desempeño óptimo, debido a que durante esta etapa ocurre la selección de los microorganismos que formarán la biopelícula (Villa-Gómez, 2006). La importancia de lograr una corta y eficiente fase de arranque del reactor radica en lograr establecer la comunidad microbiana con una estructura adecuada que sea capaz de sobrevivir a las condiciones operacionales y nutricionales del reactor, aunada a su efectividad en la remoción del sulfato y la DQO presentes (Cresson *et al.* 2008; Zhao *et al.*, 2010).

#### **2.4 Factores involucrados en el desempeño de un reactor sulfato-reductor**

El buen funcionamiento de un reactor y la eficiencia en su desempeño está determinado por las variables de operación utilizadas y las características del inóculo a utilizar. Para llevar a cabo la sulfato-reducción de manera eficiente, además de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , es necesario regular otros factores, tales como la composición del afluente (tipo de DQO), las características del inóculo (tipo de lodo, composición bacteriana, propiedades de fijación de los microorganismos, tiempo experimental e inoculación con especies nuevas), la disponibilidad de substrato y nutrientes, pH, temperatura, condiciones operacionales (Celis-García *et al.*, 2007) y diseño del reactor (Huslhoff Pol *et al.*, 1998). Por esta razón, el tratamiento de agua residual con sulfato a nivel industrial depende en gran medida de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , del caudal a tratar, así como de la concentración de DQO presente.

En cuanto a la relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , Rinzema y Lettinga (1988) describieron que al disminuir dicha relación del valor estequiométrico, aumenta la importancia de la competencia por los substratos entre las BSR y los microorganismos metanogénicos. En presencia de relaciones  $DQO/SO_4^{2-}$  mayores a la estequiométrica, en teoría existe la suficiente cantidad de materia orgánica disponible para reducir el sulfato presente de manera completa, y el excedente de materia orgánica presente puede ser removida al acoplarse el proceso de metanogénesis al proceso de sulfato-reducción (Fernández-Polanco

y García Encina, 2006). De acuerdo con Isa *et al.* (1986) una alta concentración de sulfato ( $5 \text{ g SO}_4^{2-}/\text{L}$ ) y baja concentración de DQO ( $0.1 \text{ g DQO/L}$ ) en forma de acetato o acetato más etanol no inhibió la coexistencia de los microorganismos metanogénicos y BSR en un reactor de biopelícula fija. Por su parte, Fernández-Polanco y García Encina (2006) reportaron que para relaciones  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  menores que la estequiométrica, las BSR son capaces de predominar sobre los microorganismos metanogénicos en presencia de condiciones de sulfato no limitantes debido a que compiten mejor por los substratos según su cinética; sin embargo, se necesita la adición de substrato para completar la reducción del sulfato. En la tabla 2.3 se presentan algunos trabajos en reactores sulfato-reductores con diferente relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ , lo que permite elucidar que una relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  mayor a la estequiométrica permite mayor remoción de sulfato que la relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  estequiométrica o menor.

De acuerdo con Zhao *et al.* (2010), el tipo de substrato o materia orgánica que se encuentre disponible para las BSR determinará el grado de la actividad sulfato-reductora, al involucrar la afinidad de las bacterias al substrato. Entre los substratos que pueden utilizar las BSR se encuentran el lactato y el acetato. El primero, pese a su costo, es un excelente substrato debido a la gran preferencia y energía que obtienen las BSR al utilizarlo, mientras que el segundo sólo puede oxidarse por algunas BSR y también por microorganismos metanogénicos lo que genera competencia entre ambos, además de permitir producir baja cantidad de biomasa (Kaksonen y Puhakka, 2007).

En cuanto al inóculo, es necesario que presente las características o naturaleza necesaria para el proceso que se desee llevar a cabo. Existen métodos químicos y microbiológicos para disminuir la competencia entre las BSR y los metanógenos que permiten obtener un lodo con las características deseadas. Para obtener un consorcio primordialmente de BSR, se puede manipular la relación metanógenos/BSR del lodo al añadir cultivo puro de BSR o crear condiciones desfavorables para las poblaciones no deseadas (Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

Tabla 2.3 Influencia de la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en el proceso de sulfato-reducción.

Tipo de reactor	Biomasa	Fuente de carbono	DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	F/M	Hallazgo o aportación	Referencia
UASB	Lodo de un digestor anaerobio municipal	Glucosa	nr	1.2	72 – 89% de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> removido y 20% de DQO degradada.	Erdirencelebri <i>et al.</i> , 2007
Lote		Acetato	nr	nr	2 % de DQO degradada.	
CSTR	Lodo activado residual	Melazas	2.7	0.56	Asociación microbiana. 96% de DQO degradada.	Wang <i>et al.</i> , 2008.
			1.6	nr	Enriquecimiento de BSR acetogénicas.	
CSTR	Lodo anaerobio acidogénico.	Melazas	5.0 – 2.0	0.37	Al disminuir la DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> de 3.0 a 2.0 aumentaron las BSR, BA y APHs.	Ren <i>et al.</i> , 2007
CSTR	Lodo metanogénico acondicionado con lactato.	Lactato	0.34 – 20.9	nr	Presencia de acetato y propionato a alta DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (SR y metanogénesis).	Shabir <i>et al.</i> , 2008
UASB	Lodo granular (planta piloto UAM)	Etanol	0.67 – 2.5	nr	Máxima concentración de sulfuro disuelto a DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> de 2.5. Conversiones de sulfato y etanol de 94 y 87 %, respectivamente.	Velasco <i>et al.</i> , 2008
Lecho empacado	Lodo enriquecido de un efluente de bebida	Lactato	nr	0.96	63 % de remoción de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .	Álvarez <i>et al.</i> , 2006
LFFD	Lodo granular de UASB a escala	Acetato o lactato, propionato y butirato.	1.67 – 0.67	0.09	A DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> de 1.75 (día 187), la SR fue el proceso principal. A DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> de 0.67 (día 369) el consumo de DQO y sulfato fueron 75 y 93 %, respectivamente.	Celis-García <i>et al.</i> , 2007
LFFD	Biopelícula de un LFFD con etanol-lactato a DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> = 0-6.	Etanol-lactato o etanol	0.67	1.78	El consumo máximo de DQO y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> fueron 80 y 42 %, respectivamente.	Gallegos-García <i>et al.</i> , 2009

CSTR= Reactor completamente mezclado, UASB = Reactor anaerobio de lecho granular de flujo ascendente, LFFD = reactor de lecho fluidificado de flujo descendente, BA = bacterias acetogénicas, APHs = acetogénicas productoras de hidrógeno, nr = no reportado. SR= Sulfato-reducción.

Para mejorar el desarrollo de las BSR, después de su selección por inhibición de los microorganismos metanogénicos, se pueden utilizar estrategias como presencia de sulfato en el sistema que se esté trabajando o temperaturas altas (65°C) (Omil *et al.*, 1996; Visser *et al.*, 1993); o el manejo del pH en el medio debido a que, aunque el pH óptimo para el crecimiento de las BSR es alrededor de 7.0, muchos microorganismos de este tipo pueden crecer en pH menores, mientras que los microorganismos metanogénicos requieren pH neutro para sobrevivir (entre 6.5 y 7.6) (Rittmann y McCarty, 2001). En algunas ocasiones se ha recurrido al uso de cultivos puros de microorganismos para llevar a cabo el proceso de sulfato-reducción; Kosinska y Miskiewicz (1999) reportaron el uso de un cultivo puro de *Desulfovibrio desulfuricans* para tratar efluentes de una granja industrial de cerdos, de procesos de producción de levadura y de colorantes orgánicos en reactores en lote a diferentes relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, en donde encontraron que valores mayores al estequiométrico favorecieron el proceso de sulfato-reducción con los efluentes de granja de cerdos y de producción de levadura. Estos autores reportaron que un cultivo en lote de *D. desulfuricans* con un efluente de una granja de cerdo alcanzó una eficiencia de remoción de sulfato del 98% y 20% de remoción de la DQO a las 96 horas, por lo que para remover la DQO remanente se adicionaron nuevas concentraciones de sulfato. Por otro lado, un cultivo similar en cuanto a microorganismo y efluente, pero con una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.65, necesitó la adición de materia orgánica extra para reducir el sulfato remanente después de 96 horas de cultivo. En el caso del efluente de procesos de producción de levadura, una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 4.7 provocó casi la reducción completa del sulfato (99%) con un 25% de degradación de la DQO, pero posteriormente, al ajustar la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a 2.3, mejoró la eficiencia de remoción de DQO (59%) aunque disminuyó la eficiencia de remoción de sulfato (85%). El proceso de sulfato-reducción con el efluente de la industria de manufactura de colorantes presentó un patrón diferente a los anteriores debido a la presencia de compuestos nitro tóxicos para las BSR, debido a que en este caso una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> menor a la estequiométrica (0.46) no permitió que *Desulfovibrio* removiera sulfato aún después de 340 horas de cultivo en lote con

una degradación de DQO insignificante, mientras que a una relación mayor a la estequiométrica (1.6) la degradación de DQO fue de 36% y la remoción de sulfato mejoró a 88%.

Por otro lado, Cresson *et al.* (2006) estudiaron el impacto de la presencia de nutrientes en el crecimiento de una biopelícula con el objetivo de reducir el tiempo de colonización durante la fase de arranque en un reactor de biopelícula metanogénico. Al respecto, encontraron que la limitación de nutrientes no afectó el crecimiento de la biopelícula y la degradación de DQO a bajas velocidades de carga orgánica (0.5 g DQO/L-d) durante la fase inicial de la operación del reactor (fase de aclimatación); sin embargo, concluyeron que es importante la presencia de nutrientes para el desarrollo adecuado de la biopelícula.

En cuanto a la influencia de los factores de operación del reactor, como el TRH y carga orgánica en la formación de una biopelícula, Cresson *et al.* (2006, 2007) encontraron que un incremento en la velocidad de carga orgánica durante la fase inicial de operación de reactores de biopelícula metanogénicos, a un TRH corto (24 h) y con bajas restricciones hidrodinámicas, permitió favorecer el crecimiento de la biopelícula y acortar el periodo inicial de la operación, dado que cuantificaron 2 g SVI/L sobre un soporte a los 35 días de operación de un reactor metanogénico de lecho fluidificado inverso turbulento a un TRH de 1 día. Esto fue atribuido al rápido lavado de la biomasa suspendida en el reactor que podría competir con los microorganismos fijados sobre el soporte.

Por otro lado, se ha reportado que la velocidad de flujo influye en la estructura y propiedades de una biopelícula sulfato-reductora. Al respecto, se han encontrado que biopelículas crecidas a velocidad superficial alta (0.1 m/s) lograron desarrollarse más compactas pero activas que las crecidas a flujos más bajos de este valor (Dunsmore *et al.*, 2002).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento se ha logrado la precipitación de metales en un reactor LFFD sulfato-reductor de manera eficiente (Gallegos-García, 2009), aunque el proceso no ha permitido la remoción de DQO y sulfato con eficiencia, lo cual constituye una problemática a resolver. Uno de los problemas en el funcionamiento de la biopelícula formada en este tipo de reactor, es la presencia de microorganismos que oxidan incompletamente el sustrato (medido como DQO) por lo que se acumula acetato en el efluente, sin lograr alta remoción de DQO.

Además, en este tipo de reactores se ha visto que la formación de una biopelícula estable suele darse en un periodo de tiempo largo (más de 200 días). El arranque del reactor solía hacerse operando el reactor primero en lote y después en continuo.

El desempeño estable de un reactor está condicionado por una exitosa fase de arranque en la que se logre establecer la comunidad microbiana apropiada (Fernández *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010). Por lo anterior, para que la operación del reactor LFFD sea eficiente en remover DQO y sulfato, es necesario estudiar si diferentes relaciones  $DQO/SO_4^{2-}$  a pH ácido, podrán promover durante el arranque del reactor el desarrollo de una biopelícula que sea más eficiente, al seleccionar desde esta primera etapa especies de BSR que sobrevivan a pH ácido y a las demás condiciones operacionales y nutricionales del reactor. La operación del reactor a pH ácido en la alimentación (pH 5.5) se fundamenta en la potencial aplicación de los reactores LFFD sulfato-reductores en la precipitación de metales en solución (proceso eficiente a pH ácido). Se pretende que la biopelícula formada sea capaz de oxidar completamente acetato y remover sulfato de manera eficiente en un reactor LFFD operado en continuo, en un periodo de tiempo corto (menos de 40 días), logrando producir alcalinidad, y disminuir las concentraciones de DQO y acetato en el efluente, así como la formación de sulfuro.

Adicionalmente, para entender y evaluar la dinámica poblacional dentro del reactor LFFD es necesario identificar las especies microbianas involucradas en el desempeño del reactor, biopelícula y líquido del reactor con el objetivo de comprender la influencia de los factores operacionales del reactor en la capacidad

metabólica de la biopelícula y la diversidad de los microorganismos adheridos y no adheridos al soporte.

Este trabajo está inmerso en un proyecto general que trata de elucidar la dinámica poblacional de los microorganismos anaerobios en el establecimiento de una biopelícula sulfato-reductora en un reactor LFFD, que eventualmente podría utilizarse en el proceso de remoción de metales de drenajes ácido de mina mediante su precipitación acoplada a la remoción de sulfato y DQO.

Las preguntas de investigación que pretende responder esta tesis son las siguientes:

¿Es posible desarrollar una biopelícula sulfato-reductora alimentando el reactor a pH 5.5?

¿De qué manera afecta la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  y el TRH el desempeño del reactor LFFD en cuanto a la producción de sulfuro y remoción de acetato en el efluente?

¿Será diferente la comunidad microbiana que se desarrolle dentro del reactor a las diferentes condiciones en que sea operado el reactor ( $DQO/SO_4^{2-}$  y TRH)?

¿Es posible lograr una biopelícula más eficiente en remoción de DQO y sulfato desde el arranque del reactor, al modificar la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  a una diferente a la estequiométrica?

## **4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 Hipótesis**

Las variaciones en los factores operacionales del reactor ( $DQO/SO_4^{2-}$  y TRH) modificarán su desempeño, así como el desarrollo de la biopelícula y la composición y actividad de la comunidad microbiana que se establezca sobre el soporte del reactor LFFD.

Al operar el reactor con diferente  $DQO/SO_4^{2-}$  y TRH en el arranque se obtendrá una biopelícula compleja y estable conformada de diferentes grupos tróficos (entre ellos las BSR-OC) que permitan remover eficientemente el sulfato y la DQO presentes, lo que ayudará en la problemática de oxidación incompleta de substrato muy frecuente en el establecimiento de una biopelícula, así como en la disminución del periodo para la formación de una biopelícula estable.

### **4.2 Objetivo general**

Estudiar la influencia en la fase de arranque de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  y TRH en el desarrollo y actividad de una biopelícula en un reactor anaerobio de lecho fluidificado de flujo descendente que permita obtener eficiente reducción de sulfato acoplada a la remoción de DQO a pH ácido (5.5).

#### **4.2.1 Objetivos particulares**

Comparar la eficiencia de remoción de DQO y sulfato al operar el reactor con un exceso de donador de electrones ( $DQO/SO_4^{2-} = 2.5$ ) y bajo condiciones óptimas para el desarrollo de BSR ( $DQO/SO_4^{2-} = 0.67$ ) a TRH de uno y 2 días.

Evaluar el desarrollo y desempeño de la biopelícula formada mediante la determinación de la cantidad de sólidos inmovilizados y su actividad metabólica y compararlos con la actividad del inóculo.

Identificar mediante análisis molecular la población microbiana presente en el inóculo de los reactores y aquella que se desarrolle en la biopelícula.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente (UASB)

El reactor UASB empleado fue un reactor de vidrio de fondo cónico de 0.81 L de volumen. La figura 5.1 muestra el diagrama del reactor UASB. Este reactor se utilizó como un reactor semilla en el cual el lodo anaerobio se mantenía activo bajo condiciones de sulfato-reducción.

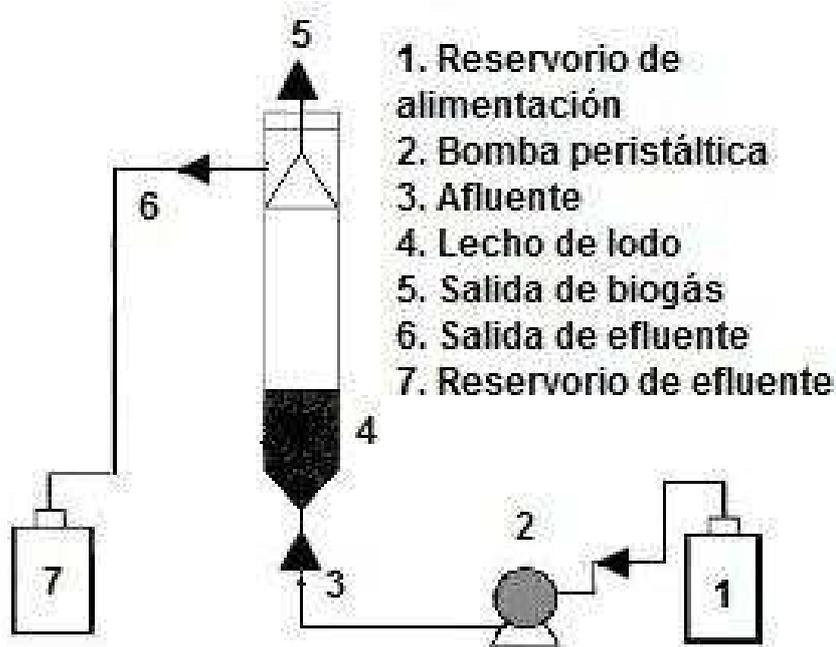


Figura 5.1 Diagrama del reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB).

#### 5.1.2 Reactor de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD)

El reactor LFFD en el que se realizaron los experimentos, consistió en una columna de acrílico de fondo cónico de 4.4 cm de diámetro interno y 84 cm de altura con un volumen de trabajo de 1.4 L. La figura 5.2 muestra el diagrama del reactor LFFD.

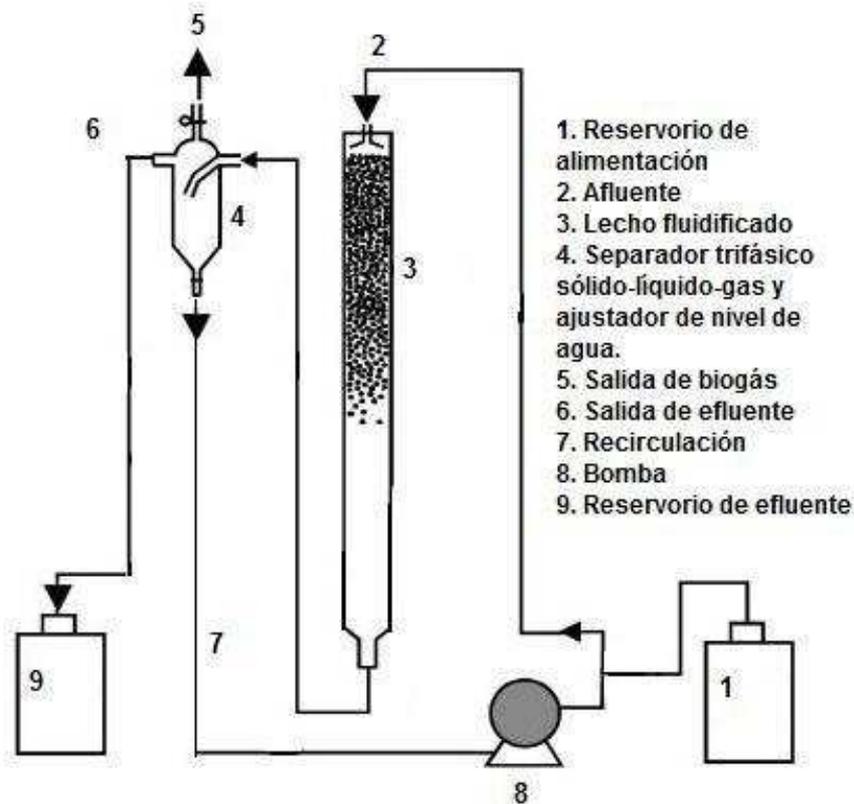


Figura 5.2 Diagrama del reactor de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD).

Como material de soporte se utilizaron partículas de polietileno de baja densidad de un tamaño promedio de partícula de  $500 \mu\text{m}$  y densidad aparente de  $400 \text{ kg/m}^3$ . El reactor LFFD se operó con una cantidad de soporte tal que ocupó alrededor de 27% del volumen de la columna. Previamente, el soporte se acondicionó manteniéndose en agitación en un matraz con 0.5 L de agua destilada, 0.2 g de extracto de levadura y 0.2 g de peptona de caseína durante 48 horas con el objetivo de acondicionar el soporte.

### 5.1.3 Medios de cultivo

#### 5.1.3.1 Medio basal para la alimentación de los reactores

En la tabla 5.1 se presenta la composición del medio basal utilizado para alimentar a los reactores UASB y LFFD. El pH del medio se ajustó a 5.5 con bicarbonato de sodio.

Tabla 5.1 Composición del medio basal de alimentación de los reactores UASB y LFFD.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	0.30
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.15
extracto de levadura	0.01
solución de oligoelementos	1.00 mL

### 5.1.3.2 Medio basal para las actividades específicas

A continuación se presenta la composición de los medios basales para determinar la actividad específica metanogénica (AME) y actividad específica sulfato-reductora (ASR). Tablas 5.2 y 5.3, respectivamente.

Tabla 5.2 Composición del medio basal para determinar la AME.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	0.28
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.83
NaHCO <sub>3</sub>	2.50
extracto de levadura	0.10
solución de oligoelementos	1.00 mL

Tabla 5.3 Composición del medio basal para determinar la ASR.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	0.280
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.006
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.600
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.110
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.703
NaHCO <sub>3</sub>	1.000
extracto de levadura	0.020

Tanto al medio basal para determinar la AME como al utilizado para determinar la ASR, se les adicionó 1 mL de resazurina (0.5 g/L) por cada litro de medio mineral como indicador redox.

### 5.1.3.3 Solución de oligoelementos

La tabla 5.4 muestra la composición de la solución de oligoelementos.

Tabla 5.4 Composición de la solución de oligoelementos.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.500
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.100
EDTA	0.500
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.062
ZnCl <sub>2</sub>	0.070
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.036
AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.040
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.024
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.070
CuCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.020
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.100
HCl 36%	1.000 mL
resazurina	0.5 mL

### 5.1.4 Inóculo

Se utilizó lodo granular metanogénico adquirido en la planta confitera Ricolino de la ciudad de San Luis Potosí como fuente de biomasa. El lodo se mantuvo en un reactor UASB a escala laboratorio antes de inocularlo a los reactores LFFD.

Cada reactor LFFD se inoculó con 2.2 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de lodo granular, recién retirado del reactor semilla (UASB). El lodo granular se disgregó antes de inocularlo a los reactores LFFD haciéndolo pasar por una jeringa.

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Operación del reactor UASB

El reactor UASB se usó para mantener el lodo granular activo bajo condiciones de sulfato-reducción. Este reactor se inoculó con 20 g SSV/L de lodo granular metanogénico proveniente de la industria Ricolino con un contenido de 6.6% de SSV. A partir de este reactor se obtuvo el inóculo para los reactores LFFD. El reactor UASB se mantuvo en lote durante 48 horas, y posteriormente se operó bajo un régimen en continuo a un TRH entre 18 y 24 horas, alimentado con medio mineral a pH 5.5 (Tabla 6.1) suplementado con una mezcla de etanol-lactato-acetato (50:25:25%) en base a DQO, y sulfato de sodio como aceptor de electrones para obtener una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.67. La carga orgánica volumétrica se aumentó gradualmente desde 1 g DQO/L-d hasta 2.5 g DQO/L-d, en incrementos de 0.5 g DQO/L-d. A los 75 días de operación en continuo de este reactor UASB, se extrajo el inóculo para realizar el primer experimento en el reactor LFFD, al día 116 se extrajo el inóculo para el segundo experimento en el reactor LFFD y finalmente al día 163 se extrajo el lodo granular necesario para realizar el tercer y cuarto experimento en los reactores LFFD. El reactor UASB se mantuvo a temperatura ambiente (18-24°C) durante su operación.

### 5.2.2 Operación de los reactores LFFD

Para llevar a cabo los experimentos se operaron cuatro reactores LFFD con diferentes relaciones de  $DQO/SO_4^{2-}$  y TRH, estos reactores se denominaron RA, RB, RC y RD (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Condiciones de operación de los reactores LFFD para evaluar la influencia de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  y del TRH durante el arranque.

	RA	RB	RC	RD
TRH (día)	1	1	2	2
DQO (g/L)	1	1	1	1
$SO_4^{2-}$ (g/L)	1.5	0.4	1.5	0.4
$DQO/SO_4^{2-}$	0.67	2.5	0.67	2.5

Cada reactor LFFD se inoculó con 1.6 g SSV/L de lodo granular obtenido del reactor UASB como fuente de biomasa, previo a la inoculación del reactor el lodo granular se disgregó finamente. A cada reactor se le adicionaron 300 mL de soporte limpio y medio basal suplementado con 1 g DQO/L en forma de acetato-lactato (70:30%) como substratos, y la cantidad necesaria de sulfato de sodio (como fuente de sulfato) para obtener la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> deseada para cada reactor en particular, el pH en la alimentación fue de 5.5. Después de inocular, los reactores se mantuvieron en lote con recirculación durante 12 horas. A partir de las 12 horas se inició la operación en continuo manteniendo un TRH de 1 ó 2 días según cada experimento (Tabla 5.5), los reactores se operaron en continuo durante 35 días. La velocidad de recirculación empleada (200 mL/min) permitió que el soporte fluidificara entre 40 y 50% del volumen de la columna del reactor. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (18 – 24 °C).

### **5.2.3 Seguimiento del desempeño de los reactores LFFD**

El desempeño de los reactores LFFD operados se evaluó a lo largo de los 35 días de operación. Para ello, cada tercer día se tomaron muestras del efluente del reactor para determinar las concentraciones de DQO, lactato y acetato, sulfato, sulfuro, pH, alcalinidad y SSV. Cada 7 días se tomó una muestra de biopelícula para determinar los sólidos volátiles inmovilizados (SVI) en el soporte y las actividades específicas sulfato-reductora y metanogénica. Adicionalmente se tomó otra muestra de biopelícula en un tubo estéril para la posterior extracción de ADN. Las determinaciones de pH, alcalinidad y sulfuro se realizaron inmediatamente después a la toma de muestra. Las muestras para determinar sulfato y AGV se congelaron a -20 °C, al igual que las muestras de biopelícula para el posterior análisis molecular.

### **5.2.4 Actividad sulfato-reductora (ASR) del inóculo**

La ASR del lodo granular se define como la capacidad máxima del lodo granular de producir sulfuro a partir de sulfato. Esta determinación se realizó al lodo granular antes de inocularse al reactor UASB (reactor semilla) y a las muestras

que se tomaron como inóculo para los reactores RA y RB, y RC y RD, respectivamente. Se realizó por duplicado en botellas serológicas de 160 mL con lodo granular a una concentración de 2 g SSV/L, 150 mL de medio basal (Tabla 5.3), 1 g DQO/L de diferentes substratos por separado (acetato, lactato, o la mezcla acetato-lactato 70:30%) y el sulfato necesario para obtener la  $DQO/SO_4^{2-}$  teórica de 0.67. El pH de las botellas se ajustó a 7.0, y éstas se incubaron a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  en agitación a 150 rpm. De igual manera se procesó un control sin substrato ni sulfato para dar seguimiento al metabolismo endógeno. Tanto para la ASR del lodo granular como para la ASR de la biopelícula se utilizó BESA (ácido 2-bromoetanosulfónico) a una concentración de 3.2 g/L como inhibidor de la actividad metanogénica. Las botellas serológicas fueron selladas con tapones de hule y anillos metálicos. Se cuantificó la concentración de sulfuro disuelto por el método de Cord-Ruwisch en un lapso de 3 días en intervalos de 2 horas. La velocidad de producción de sulfuro se obtuvo de la pendiente máxima de la gráfica de concentración de sulfuro disuelto contra tiempo. La actividad sulfato-reductora se calculó a partir de la pendiente anterior y del contenido de SSV en la botella serológica del experimento.

### **5.2.5 Actividad sulfato-reductora de la biopelícula**

La ASR de la biopelícula es la capacidad máxima de la biopelícula para reducir el sulfato. Para este ensayo, cada 7 días se extrajo soporte con biopelícula del reactor para determinar la velocidad de producción de sulfuro y la cantidad de biomasa adherida al soporte. Se realizó en botellas serológicas de 160 mL que contenían 5 mL de soporte recién retirado de los reactores LFFD, 150 mL de medio mineral basal (Tabla 5.3), 1 g DQO/L como acetato, lactato ó acetato-lactato (70:30), e incluso  $H_2-CO_2$  (80:20%) en el caso de los reactores RC y RD. Se adicionó sulfato de sodio como aceptor de electrones para tener una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.67. El pH de las botellas se ajustó a 7.0. Posteriormente, éstas fueron selladas con tapones de hule y anillos metálicos. Se incubaron a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  a 150 rpm durante 72 horas. La ASR con cada uno de los substratos se determinó por duplicado. De manera paralela se ensayó un control endógeno, el cual

consistió en incubar una botella serológica con medio mineral, 5 mL de soporte del reactor pero sin adicionar aceptor ni donador de electrones. La concentración de sulfuro y la actividad específica se determinaron como se describió anteriormente, con la diferencia de que se usó la cantidad de sólidos inmovilizados en el soporte para calcular la actividad.

### **6.2.6 Actividad metanogénica (AME) del inóculo**

La AME del lodo granular es definida como la capacidad máxima de producir metano del lodo granular. Dicha capacidad es la pendiente máxima de graficar el volumen de metano producido contra el tiempo. La AME se obtiene al dividir esta pendiente entre la cantidad de SSV en el experimento. Para determinar la AME se utilizaron botellas serológicas de 120 mL que contenían 60 mL de medio basal (Tabla 5.2), 1 g DQO/L en forma de acetato como sustrato y 2 g SSV/L del lodo granular. El pH se ajustó a 7.0 con bicarbonato de sodio. Se realizó un control endógeno en una botella serológica con el mismo contenido de lodo y medio pero sin la adición de sustrato. Las botellas se taparon y sellaron, se les intercambiaron la atmósfera con una mezcla CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> (80:20) para obtener condiciones de anaerobiosis, se purgó el exceso de gas mediante desplazamiento de agua y posteriormente se incubaron a 30 ± 2°C a 150 rpm durante 72 horas. Al término de este tiempo se recambió el medio mineral con sustrato y se incubaron nuevamente durante 72 horas, tiempo durante el cual se cuantificó el volumen de metano producido mediante el desplazamiento de una solución de NaOH al 3%.

### **6.2.7 Actividad metanogénica de la biopelícula**

La AME de la biopelícula es definida como la capacidad máxima de producir metano por la biopelícula. Se determinó de manera similar a la AME del lodo granular difiriendo en el inóculo utilizado; en lugar de lodo granular cada botella serológica se inoculó con 5 mL de soporte con biomasa adherida recién obtenido de los reactores LFFD a diferentes tiempos de operación (7, 14, 21, 28 y 35 días). A las 72 horas se concluyó la cinética y se determinaron los SVI en el soporte. La actividad metanogénica de la biopelícula se determinó al dividir la pendiente de la

curva de producción de metano entre la cantidad de SVI en el soporte de cada botella serológica.

### **6.2.8 Análisis molecular de la comunidad microbiana**

Este análisis permitió conocer la composición y modificación de la comunidad microbiana presente en cada uno de los reactores operados a partir de muestras de biopelícula y de líquido obtenidas a diferentes intervalos de tiempo, así como de sus respectivos inóculos. La metodología seguida para esta determinación fue la siguiente: extracción de ADN, amplificación del gen bacteriano ARNr 16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y separación de las diferentes secuencias contenidas en el producto de PCR mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés). La composición de las soluciones empleadas en el análisis molecular se encuentra en el Anexo 1.

#### **5.2.8.1 Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN del lodo inoculado y de las muestras de biopelícula se realizó de acuerdo a la siguiente metodología modificada de Celis *et al.* (2009).

Para las muestras de inóculo (lodo granular) se colocaron entre 300 a 400  $\mu\text{L}$  de lodo granular en un microtubo de 2 mL y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de buffer de fosfatos salino (PBS) y etanol en proporción 1:1 (v/v); se centrifugó a 6600 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL PBS 1X, se centrifugó nuevamente a 6600 rpm durante 15 minutos a 4°C obteniéndose una nueva pastilla. En el caso de las biopelículas, el proceso de extracción de ADN se realizó directamente a partir de 300 a 500  $\mu\text{L}$  de soporte contenidos en un tubo de 2 mL, mientras que en el caso de las muestras de líquido de reactor se procedió como sigue: se centrifugaron entre 3 y 5 mL de muestra en un tubo tipo falcon a 3200 rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante para tener únicamente como muestra el sedimento precipitado.

Tanto para el caso de las pastillas obtenidas a partir de los inóculos (lodo granular) y de las muestras líquidas, así como para el caso del soporte con biopelícula se procedió a extraer el ADN con la misma metodología. En primer término se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de Buffer-Lizosima a las pastillas y al soporte, las pastillas se resuspendieron y el soporte se mezcló muy bien con el buffer. Posteriormente se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de la enzima lizosima (10 mg/mL) y los microtubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación a 700 rpm en un termomixer. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, 200  $\mu\text{L}$  de la solución detergente PVP-CTAB (2-2%), 600  $\mu\text{L}$  de Buffer-Proteinasa y 20  $\mu\text{L}$  de la enzima proteinasa K (20 mg/mL), los microtubos se incubaron a 55°C durante 2 horas con agitación a 700 rpm en el termomixer. Después de este tiempo, se retiraron de la incubación, se agregaron 15  $\mu\text{L}$  de la enzima RNAsa (0.5 mg/mL) y se incubó a 35°C durante 30 minutos a 700 rpm en el termomixer. Posteriormente se adicionó a cada muestra 1 volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se sometió a agitación mediante un vórtex 30 segundos, las muestras se incubaron por 4 minutos a 4°C, se agitaron con vórtex por 30 segundos. A continuación, se centrifugó a 14000 rpm durante 6 minutos. La fase acuosa (superior) se transfirió a un microtubo limpio de 1.5 mL y se adicionó nuevamente un volumen de cloroformo-álcool isoamílico, se procedió a agitar, incubar y centrifugar como se describió anteriormente. A la fase acuosa recuperada se le adicionó un volumen de isopropanol y 0.3 volúmenes de acetato de amonio 5 M. Se agitó durante 30 segundos en un vórtex. Los tubos se incubaron durante la noche (alrededor de 18 horas) a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 40 minutos a 4°C y 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y a la pastilla restante se le adicionaron 700  $\mu\text{L}$  de etanol-agua al 70-30% (v/v). Se volvió a centrifugar 40 minutos a 4°C y 14000 rpm y se descartó el sobrenadante cuidadosamente por inversión y mediante succión con una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$ . Se observó la formación de una pastilla de ADN “gelatinosa”. Se dejaron secar estos tubos a temperatura ambiente durante 2 horas. La pastilla seca se

resuspendió en 15-50  $\mu\text{L}$  de agua inyectable estéril, según el tamaño de la pastilla, y se almacenó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.8.2 Amplificación del ADN

A partir de los extractos de ADN se amplificó la región de interés, que corresponde a aproximadamente 600 pares de bases (550 pb) que engloba fragmentos de genes bacterianos de ARNr 16S de bacteria. Para ello se utilizaron los cebadores u oligonucleótidos universales 357F-GC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3'). El primero contenía un fragmento de 40 pares de bases rico en GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') en el extremo 5' (Kaksonen *et al.*, 2004a). Para la amplificación se trabajaron experimentalmente volúmenes de reacción de 25  $\mu\text{L}$  por triplicado compuestos de 24  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción más 1  $\mu\text{L}$  de extracto de ADN molde. Se usó la enzima Taq DNA polimerasa-recombinante (Applied Biological Materials, Inc). La tabla 5.6 especifica la composición de la mezcla de reacción empleada.

Tabla 5.6 Mezcla de reacción para la PCR.

Sustancia	Volumen
Agua	17.9 $\mu\text{L}$
Buffer 10x	2.5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.0 $\mu\text{L}$
dNTP's 10 mM	0.5 $\mu\text{L}$
Oligo 1 (357F-GC) 10 pM	0.5 $\mu\text{L}$
Oligo 2 (907-R) 10 pM	0.5 $\mu\text{L}$
Taq ADN polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{L}$

dNTP's: mezcla de 10 mM de cada uno de los siguientes: dATP, dGTP, dCTP, dTTP.

La mezcla de reacción fue amplificada usando un termociclador modelo DNA Engine PTC dual (BioRad, Hércules, California, USA) mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial a  $96^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos, 10 ciclos que

comprenden desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 61°C por 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto, y otros 20 ciclos que incluyen desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 56°C por 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final de 7 minutos a 72°C. En todas las reacciones de PCR se realizó un control positivo utilizando ADN molde proveniente de un cultivo de *Escherichia coli* y uno o dos controles negativos en los que en lugar de ADN molde se colocó agua.

En los casos de las muestras en que no se logró obtener ADN amplificado, se recurrió a la PCR anidada como técnica de amplificación. Esta técnica se fundamenta en la selección y amplificación de un fragmento de ADN de un tamaño más grande a la región de interés por medio de un par de oligonucleótidos específicos 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3). Posteriormente se delimita la porción de ADN a amplificar mediante una segunda PCR con una dilución 1:10 v/v de los productos de PCR anteriores con los oligonucleótidos específicos para la región de interés (357F-GC y 907R). Los componentes y cantidades de la mezcla de reacción utilizada para el primer paso de la PCR anidada son los mismos que los de la Tabla 6.5, excepto que los oligonucleótidos fueron el 27F y 1492R. Se trabajaron volúmenes de reacción de 25 µL para cada muestra que se sometieron en el termociclador al siguiente programa de PCR: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos que comprenden desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento a 45°C por 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto, así como una extensión final posterior de primer de 10 minutos a 72°C. La segunda parte de la PCR anidada se llevó a cabo de la misma manera que la PCR descrita para los oligonucleótidos 357F-GC y 907R.

La presencia y tamaño de los productos de PCR obtenidos fueron determinados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 100 volts durante 20 a 30 minutos. En el gel también se colocaron un marcador de peso molecular de 1 kb, un control positivo y un control negativo de la PCR. El tamaño de los productos obtenidos con los primers 357F-GC y 907R es de 560 pares de bases.

El gel obtenido se tiñó con bromuro de etidio y se observó bajo luz UV en un fotodocumentador.

#### **5.2.8.3 Concentración y cuantificación de los productos de PCR**

Los productos de PCR obtenidos fueron concentrados por alguno de los dos métodos descritos a continuación. Un método consistió en la adición a los productos de PCR de 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.3 volúmenes de acetato de sodio 5 M pH 8.0, e incubación a -20°C durante 2-18 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 4°C durante 40 minutos. Al precipitado obtenido al descartar el sobrenadante se le adicionó un volumen de etanol-agua (70-30%), la pastilla se lavó por inversión suave del tubo (2-3 veces) y se centrifugó de nuevo durante 40 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar alrededor de 2 horas. Por último la pastilla se resuspendió en un volumen conocido de agua inyectable estéril (14 µL). Dichos productos de PCR concentrados se mantuvieron a -20°C hasta su posterior utilización. El otro método de concentración de los productos de PCR se fundamentó en la pérdida de volumen líquido del producto de PCR mediante centrifugación al vacío en el aparato Speed-Vac durante 30 minutos.

La cantidad de ADN en los productos de PCR concentrados se estimó por medio del aparato NanoDrop. Este aparato determina la absorbancia de la muestra a 280 y 260 nm para obtener la concentración del ácido nucleico y pureza del mismo. Específicamente para la determinación de la concentración de ADN es utilizada la ecuación de Beer-Lambert, en donde la concentración de ADN (µg/mL) es el resultado del producto del valor de la absorbancia a 260 nm multiplicado por el coeficiente de extinción modificado (ng.cm/mL) y dividido entre el valor de la longitud del paso de luz (cm). El valor de la absorbancia se normaliza en base a un blanco (agua en la que fue eluido el ADN).

#### **5.2.8.4 Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)**

A partir de los productos de PCR obtenidos de los extractos de ADN de los inóculos, biopelículas y líquido de los reactores se utilizó la técnica de huella

molecular DGGE, ya que ésta permite separar fragmentos de ADN de la misma longitud con diferentes secuencias de pares de bases dependiendo de su punto de desnaturalización. El DGGE se llevó a cabo de acuerdo a Muyzer *et al.* (1993).

Para realizar el DGGE se utilizó un sistema de detección de mutación universal Dcode™ (BioRad), con un gel de poliacrilamida al 8% de 1 mm de espesor con un gradiente lineal desnaturalizante de 30 a 60% a base de formamida y urea. En el gel se cargaron las muestras de PCR y se sumergió en buffer TAE 0.5 X (a pH 8.0 compuesto de 20 mM tris-acetato, 10 mM acetato de sodio, 0.5 mM EDTA) la electroforesis se llevó a cabo a 70 volts durante 20 horas a 60°C. Posteriormente el gel se tiñó con plata para visualizar los patrones de bandas.

El procedimiento de tinción consistió en primer lugar en fijar el gel con una solución de ácido acético al 10% durante 30 minutos en agitación lenta (40-50 rpm). Transcurrido este tiempo, el gel se lavó tres veces con agua desionizada y en agitación por 5 minutos, para proceder a teñirse. La tinción se realizó con una solución de AgNO<sub>3</sub> en agitación lenta por 30 minutos; durante este tiempo el gel se mantuvo protegido de la luz. Posteriormente se hizo un lavado rápido (20 segundos) con agua desionizada. Inmediatamente después se inició el revelado de la tinción con solución de revelado a base de carbonato de sodio anhidro durante el tiempo necesario para observar las diferentes bandas de las muestras (aproximadamente 15 minutos). El revelado se detuvo poniendo en contacto el gel con la solución de fijación nuevamente durante un tiempo de 5 minutos y con su posterior enjuague con agua desionizada.

El gel se observó con luz visible y fue fotografiado con una cámara digital para identificar las bandas de ADN. Cada banda seleccionada fue cortada cuidadosamente con una navaja de bisturí, se eluyó en un volumen de 20 µL de agua inyectable y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente para después amplificarse mediante PCR con los oligonucleótidos 357F (sin el fragmento de 40 bases de GC) y 907R. Esta reacción de PCR se realizó con 3 µL de una dilución 1:10 del agua de elución de la banda. De manera paralela, y en los

casos en los que el ADN eluído no dio producto de PCR, se llevó a cabo un procedimiento alternativo de amplificación del ADN contenido en las bandas de acrilamida. Para esto se realizó la reacción de PCR de manera similar a la anterior pero substituyendo el molde de ADN líquido por un fragmento de acrilamida con la banda de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>.

Los productos de PCR resultado de cada muestra se cuantificaron en el aparato NanoDrop para enviar a purificar y secuenciar aproximadamente 1300 ng de ADN de cada banda elegida.

#### **5.2.8.5 Análisis de las secuencias**

La identificación de los géneros, especies o grupos microbianos presentes en las muestras de inóculos, biopelículas y líquido de los reactores en sus diferentes etapas se obtuvo mediante la comparación o alineamiento de las secuencias obtenidas con las reportadas en la base de datos del centro nacional estadounidense de información biotecnológica (NCBI, por sus siglas en Inglés). Se buscó la similitud más cercana entre ambas secuencias utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Dicha herramienta reporta un análisis de similitud en porcentaje y una lista con las taxas más próximas o afines.

### **5.3 Análisis químicos**

#### **5.3.1 Medición de DQO**

La determinación de DQO se llevó a cabo por el método de refluo cerrado y espectrofotometría. Su objetivo es cuantificar el equivalente de oxígeno del contenido de materia orgánica de muestra al ser oxidada por dicromato de potasio en presencia de una solución catalizadora de ácido sulfúrico y sulfato de plata. El ensayo consistió en la digestión de 2 mL de muestra, ya sea de afluente o efluente del reactor (previamente aireada para evitar la interferencia por la presencia de sulfuro, y centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos) con dicromato de potasio (solución digestora) y la solución catalizadora de ácido sulfúrico-sulfato de plata durante 2 horas a 160°C. La cantidad de oxidante consumido fue determinada por colorimetría en un espectrofotómetro UV Thermo-Spectronic a 600 nm. La

concentración de DQO presente se obtuvo por interpolación en una curva de calibración de DQO de 0 a 1000 mg DQO/L.

### **5.3.2 Medición de pH**

El pH se determinó por duplicado en 10 mL de muestra de afluente y efluente de los reactores mediante potenciometría con el aparato Thermo Orion modelo 720 A y un electrodo marca Thermo Orion 8256. Previo a la determinación del pH el potenciómetro se calibró con soluciones de pH 4.0, 7.0 y 10.0.

### **5.3.3 Medición de alcalinidad como carbonato de calcio**

Posterior a la determinación potenciométrica del pH del efluente del reactor, se llevó a cabo una titulación potenciométrica con HCl para cuantificar la alcalinidad producida como bicarbonato, así como la alcalinidad total producida por la oxidación de los AGV acetato, propionato, butirato y lactato, en el caso de estar presentes. La alcalinidad del agua es una medida de su capacidad de neutralizar ácidos y se debe principalmente a sales de ácidos débiles. Es una medida de la capacidad de un sistema acuático de amortiguar el pH en la presencia de ácidos adicionales. Puede definirse como la cantidad de ácido necesaria para llevar una muestra a cierto pH. La alcalinidad comprende diferentes especies de sales y ácidos débiles, razón por la cual se expresa como su equivalencia en carbonato de calcio.

Para determinar la alcalinidad, se titularon los 10 mL de muestra con HCl 0.1N partiendo del pH inicial del efluente hasta pH 5.8 para obtener la alcalinidad como bicarbonato (reportada en mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ) y posteriormente se continuó con la titulación hasta pH 4.5 para poder determinar la alcalinidad total. Durante el proceso la muestra se mantuvo en agitación suave y constante. Esta determinación se realizó por duplicado.

La cuantificación de alcalinidad se obtuvo como resultado del siguiente cálculo:

$$Alc_{tot} = \frac{V_{4.3} * EQ * N}{V_m} \quad (\text{Ec. 5.1})$$

$$Alc_{bic} = \frac{V_{5.8} * EQ * N}{V_m} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

donde:

Alc tot = Alcalinidad total (mg CaCO<sub>3</sub>/L)

V<sub>4.3</sub> = Volumen de HCl gastado para llegar a pH 4.3 (mL)

EQ = Peso equivalente del CaCO<sub>3</sub> (50 000 eq)

N = Normalidad del HCl

V<sub>m</sub> = Volumen de la muestra (mL)

Alc bic = Alcalinidad de bicarbonato (mg CaCO<sub>3</sub>/L)

V<sub>5.8</sub> = Volumen de HCl gastado para llegar a pH 5.8 (mL)

### 5.3.4 Medición de las concentraciones de sulfato, acetato y lactato

La concentración de sulfato, acetato y lactato se determinó en un aparato de electroforesis capilar marca Agilent equipado con un detector de arreglo de diodos. La determinación se realizó a muestras de afluente y efluente de los reactores. La preparación de la muestra consistió en centrifugarla a 13000 rpm por 10 minutos y filtrarla con una membrana de 0.22 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro. En algunos casos fue necesario diluir la muestra con agua desionizada antes de filtrarla. Las muestras fueron inyectadas al aparato mediante un capilar de 50 μm de diámetro interno y 72 cm de longitud con una presión de 4 mbar durante 4 segundos. La migración de los aniones de interés fue mediante un electrolito de fondo a pH 12 y la aplicación de voltaje a -30 kV y 20°C. La señal fue detectada a 300 nm de longitud de onda con una referencia de 245 nm. El tiempo de análisis fue 11 minutos. Las concentraciones de los tres analitos se obtuvieron de acuerdo a sus correspondientes curvas de calibración preparadas con estándares de sulfato de sodio, acetato de sodio y lactato de sodio, diluidos con agua desionizada para evitar interferencia por los aniones presentes en el agua. El

programa utilizado para la adquisición y análisis de los electroferogramas fue el ChemStation B.01.03 (204).

### **5.3.5 Medición de sulfuro**

La determinación de sulfuro disuelto en los reactores UASB, LFFD y en los ensayos de actividad sulfato-reductora se realizó por duplicado mediante el método de Cord-Ruwisch. Este método se fundamenta en la formación de un precipitado de sulfuro de cobre coloidal  $\text{CuS}$  que es estable durante 20 a 40 segundos. El precipitado formado proviene de la reacción de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en medio ácido ( $\text{HCl}$  50 mM) con el  $\text{H}_2\text{S}$  presente en la muestra. Para la determinación se adicionó 0.1 mL de muestra a 4 mL de la solución de reactivo de cobre contenida en un tubo de vidrio HACH y se agitó vigorosamente en un vórtex durante unos segundos. El producto colorimétrico obtenido de esta reacción se midió en un espectrofotómetro UV Thermo-Spectronic a 480 nm de longitud de onda. La concentración de sulfuro presente se obtuvo a partir de la curva de calibración (absorbancia vs concentración de  $\text{H}_2\text{S}$  desde 0 hasta 20 mM) previamente elaborada a partir de una solución de sulfuro de sodio como estándar. El resultado se expresa en mmol  $\text{H}_2\text{S}/\text{L}$  o en mg  $\text{H}_2\text{S}/\text{L}$  al multiplicar el primero por 32.

### **5.3.6 Determinación de los sólidos suspendidos totales y volátiles del inóculo y los sólidos volátiles inmovilizados en el soporte**

La determinación de sólidos se realizó mediante un ensayo de gravimetría. Para los sólidos suspendidos totales (SST) se llevaron a peso constante cápsulas de porcelana a  $550^\circ\text{C}$  durante una hora. Se enfriaron en una estufa a  $105^\circ\text{C}$  y en un desecador, y se pesaron (peso CS). Se pesó en una balanza analítica entre 2 y 3 g de lodo granular en cada cápsula. Se secaron a  $105^\circ\text{C}$  en una estufa durante toda la noche. Se colocaron en un desecador para tener la temperatura ambiental y se pesaron (peso CE). Posteriormente, se llevó a incineración el residuo seco a  $550^\circ\text{C}$  en una mufla durante 15 minutos, se colocaron en la estufa a  $105^\circ\text{C}$  y después se pasaron a un desecador para que las capsulas alcanzaran la

temperatura ambiente. Se pesaron nuevamente las cápsulas (peso CM). La cantidad de SST se obtuvo mediante la diferencia entre el peso CE y peso CM. Los SSV se obtuvieron de la diferencia entre el peso CE y el peso CM.

Los sólidos volátiles inmovilizados (SVI) en el soporte se obtuvieron para evidenciar la formación de la biopelícula durante la operación de los reactores LFFD. Semanalmente, a dos botellas serológicas del respectivo experimento de cinética de producción de sulfuro o metano se les realizó este ensayo. Para ello, se tomó una alícuota del líquido (de un volumen entre 15 y 30 mL) de la botella previamente homogeneizada. Se filtraron con una bomba de vacío en crisoles Gooch con filtro de microfibra de vidrio de 1.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro previamente llevados a peso constante de manera similar a lo realizado con las cápsulas de porcelana. El resto del líquido de la botella se desechó, dejando solo el soporte dentro de la botella. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de agua desionizada a la botella y el soporte se sonicó por 10 minutos, los 10 mL de líquido se retiraron de la botella y se filtraron por un crisol Gooch con membrana a peso constante como se describió anteriormente. El proceso de lavado del soporte con sonicación se repitió varias veces hasta dejar el soporte limpio de biopelícula. Los lavados realizados fueron los necesarios para desprender la biopelícula adherida al soporte en su totalidad (aproximadamente 5 o 6 lavados). Los crisoles Gooch se sometieron al mismo proceso de secado a 105°C y calcinación a 550°C para determinar los SSV, que se expresaron como los gramos de SVI por litro de soporte (g SVI/Ls).

## **5.4 Cálculos**

En base a los datos obtenidos de las determinaciones analíticas llevadas a cabo se efectuaron los cálculos pertinentes.

### **5.4.1 Cálculo de eficiencia de remoción de DQO (ER DQO)**

La eficiencia de remoción de DQO es la diferencia porcentual entre la concentración de DQO en el afluente y la concentración de DQO en el efluente del reactor.

$$ER\ DQO\ (\%) = \left( \frac{DQO_{af} - DQO_{ef}}{DQO_{af}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 5.3})$$

donde:

$DQO_{af}$  = Concentración de DQO en el afluente (mg/L)

$DQO_{ef}$  = Concentración de DQO en el efluente (mg/L)

#### 5.4.2 Cálculo de la concentración de DQO removida por BSR ( $DQO_{BSR}$ )

La concentración de DQO utilizada por BSR se obtiene a partir de la concentración de sulfato reducido y la concentración de DQO alimentada.

$$DQO_{BSR}\ (mg/L) = 0.67 * (SO_{4\ af} - SO_{4\ ef}) \quad (\text{Ec. 5.4})$$

donde:

$SO_{4\ af}$  = Concentración de sulfato en el afluente (mg/L)

$SO_{4\ ef}$  = Concentración de sulfato en el efluente (mg/L)

$DQO_{af}$  = Concentración de DQO en el afluente (mg/L)

#### 5.4.3 Cálculo de la concentración de DQO removida por bacterias no sulfato-reductoras ( $DQO_{om}$ )

La concentración de DQO removida por otros microorganismos no sulfato-reductores se obtiene por diferencia de la DQO total consumida y la DQO removida por BSR.

$$DQO_{om}\ (mg/L) = (DQO_{af} - DQO_{ef} - DQO_{BSR}) \quad (\text{Ec. 5.5})$$

donde:

$DQO_{af}$  = Concentración de DQO en el afluente (mg/L)

$DQO_{ef}$  = Concentración de DQO en el efluente (mg/L)

$DQO_{BSR}$  = Concentración de DQO removida por BSR.

#### 5.4.4 Cálculo de la eficiencia de remoción de $\text{SO}_4^{2-}$ (ER $\text{SO}_4^{2-}$ )

La eficiencia de remoción de  $\text{SO}_4^{2-}$  es la diferencia porcentual entre la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el afluente y la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el efluente del reactor.

$$ER \text{SO}_4^{2-} (\%) = \left( \frac{\text{SO}_4^{2-}{}_{af} - \text{SO}_4^{2-}{}_{ef}}{\text{SO}_4^{2-}{}_{af}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 5.6})$$

donde:

$\text{SO}_4^{2-}{}_{af}$  = Concentración de sulfato en el afluente (mg/L)

$\text{SO}_4^{2-}{}_{ef}$  = Concentración de sulfato en el efluente (mg/L)

#### 5.4.5 Cálculo de la concentración teórica de acetato en los reactores ( $\text{Ac}_r$ )

Si suponemos que el reactor es totalmente sulfato-reductor y que no hay consumo de acetato por el proceso de sulfato-reducción entonces se puede calcular la concentración de acetato como la suma del acetato inicial alimentado mas el acetato generado por la oxidación incompleta de lactato (vía sulfato-reducción).

$$\text{Ac}_r (\text{mg/L}) = \text{Ac}_{af} + \text{Ac}_{pro} \quad (\text{Ec. 5.7})$$

donde:

$\text{Ac}_{af}$  = Concentración de acetato en el afluente (mg/L)

$\text{Ac}_{pro}$  = Concentración de acetato producido en el reactor de la oxidación incompleta del lactato (mg/L).

De acuerdo con la ecuación de oxidación incompleta de lactato  $1\text{mol Lac (90 g)} \rightarrow 1\text{mol Ac (60 g)}$ , entonces:

$$\text{Ac}_{pro} = \text{Lac}_{af} * 0.66 \quad (\text{Ec. 5.8})$$

donde:

$Lac_{af}$  = Concentración de lactato en el afluente (mg/L)

#### 5.4.6 Cálculo de la concentración de acetato consumido ( $Ac_{con}$ )

El consumo de acetato en el reactor es producto de la diferencia en las concentraciones de acetato en el afluente y en el efluente del reactor.

$$Ac_{con}(mg/L) = Ac_{af} - Ac_{ef} \quad (\text{Ec. 5.9})$$

donde:

$Ac_{af}$  = Concentración de acetato en el afluente (mg/L)

$Ac_{ef}$  = Concentración de acetato en el efluente (mg/L)

Si la diferencia es negativa entonces se considera que no hubo consumo de acetato y la concentración de acetato a la salida representa la suma del acetato inicial más el acetato producido.

#### 5.4.7 Cálculo de las actividades específicas ASR y AME del inóculo y de las biopelículas

$$ASR = \left( \frac{m_{H_2S} * V_b * f_{cs}}{SSV_g} \right) \quad (\text{Ec. 5.10})$$

$$AME = \left( \frac{m_{CH_4}}{V_b * SSV * f_{cm}} \right) \quad (\text{Ec. 5.11})$$

donde:

$ASR$  = Actividad sulfato-reductora (g DQO- $H_2S$ / g SSV-d)

$m_{H_2S}$  = velocidad de producción de sulfuro (g  $H_2S$ /L-d)

$f_{cs}$  = factor de equivalencia de sulfuro como DQO: 1 g DQO/ 0.5 g  $H_2S$

$AME$  = Actividad metanogénica (g DQO- $CH_4$ /g SSV-d)

$m_{CH_4}$  = velocidad de producción de metano (L/d)

$f_{cm}$  = factor de equivalencia de metano como DQO a condiciones de temperatura y presión estándar (273 K y 1 atm): 0.35 L CH<sub>4</sub>/g DQO

$V_b$  = Volumen de líquido en la botella (L)

SSV = Concentración de sólidos suspendidos volátiles en la botella (g SSV/L)

SSV<sub>g</sub> = Cantidad de sólidos suspendidos volátiles en la botella (g SSV)

#### **5.4.8 Balance másico total de compuestos azufrados**

El balance másico total de compuestos azufrados en los reactores LFFD se realizó considerando el promedio de la concentración de las formas azufradas determinadas en los reactores (sulfato y sulfuro) durante el periodo pseudo-estable en la fase de arranque.

Las consideraciones que se tomaron en cuenta fueron las siguientes:

a. A partir de la reducción de sulfato se generó sulfuro, el cual fue cuantificado en el efluente. Este sulfuro pudo encontrarse disuelto en la fase líquida del reactor (efluente) o bien, en fase gaseosa como parte del biogás.

b. La concentración de compuestos azufrados recuperados en el efluente del reactor es el promedio de la concentración de sulfato y sulfuro en el efluente, así como el sulfuro en el biogás. Otras formas en que el azufre pudo haberse encontrado, y que no se consideraron en el balance por no haberse cuantificado, son el tiosulato y el azufre elemental.

c. El porcentaje de compuestos azufrados recuperados se calculó al dividir la concentración de sulfato (mM) en el afluente entre la concentración de compuestos azufrados (mM) recuperados en el efluente del reactor. La diferencia entre 100% y el porcentaje de compuestos azufrados recuperados indica el porcentaje de azufre que se encontró en alguna otra forma azufrada no cuantificada en el reactor.

#### **5.4.9 Balance porcentual de remoción de substratos alimentados**

La concentración de DQO alimentada a los reactores estuvo constituida de acetato y lactato (70:30%). El balance se realizó de acuerdo a la aproximación propuesta por Rittmann, que consiste en realizar los balances en base a 1 equivalente de

electrones (Rittman y McCarty, 2001). El porcentaje de remoción de los donadores y aceptores de electrones se calculó en base a las consideraciones y ecuaciones que se presentan a continuación:

#### Consideraciones

a. Se consideró que primero se llevó a cabo la oxidación incompleta de lactato a acetato por sulfato-reducción y que posteriormente el acetato pudo oxidarse por sulfato-reducción o por otros procesos.

b. Se consideraron válidas las siguientes equivalencias (Rittmann y McCarty, 2001):

- Oxidación completa de lactato

1 mol de lactato  $\equiv$  12 equivalentes de electrones (eq e<sup>-</sup>)

- Reducción de sulfato

1 mol de sulfato  $\equiv$  8 eq e<sup>-</sup>

- Oxidación completa de acetato

1 mol de acetato  $\equiv$  8 eq e<sup>-</sup>

- Oxidación incompleta de lactato

1 mol de lactato  $\equiv$  4 eq e<sup>-</sup>

- Equivalencia de DQO en eq e<sup>-</sup>

8 g DQO  $\equiv$  1 eq e<sup>-</sup>

#### Ecuaciones

1. En primer lugar se calcularon los mili-equivalentes de electrones (meq e<sup>-</sup>) donados a partir de la oxidación incompleta del lactato que se alimentó (mmol/L), que en principio fueron usados para la reducción de sulfato.

$$meq e^{-} don. (Lac \rightarrow Ace) = \frac{Lac_{af} \left( \frac{mmol}{L} \right)}{\frac{4 meq e^{-}}{mmol Lac}} \quad (Ec. 5.12)$$

2. Se calcularon los electrones equivalentes (meq e<sup>-</sup>) aceptados a partir del sulfato consumido.

$$meq e^{-} acep. (SO_4^{2-} red.) = \frac{SO_4^{2-} red. (\frac{mmol}{L})}{\frac{8 meq e^{-}}{mmol SO_4^{2-}}} \quad (Ec. 5.13)$$

3. Se calculó si hubo consumo de acetato mediante la diferencia entre los meq e<sup>-</sup> aceptados por el sulfato reducido (Ec. 5.14) y los meq e<sup>-</sup> donados de la oxidación incompleta del lactato (Ec. 5.13).

$$meq e^{-} don. (Ace) = meq e^{-} acep. (SO_4^{2-} red.) - meq e^{-} don. (Lac \rightarrow Ace) \quad (Ec. 5.14)$$

Un resultado igual a cero indica que los meq e<sup>-</sup> donados por la oxidación incompleta de lactato fueron los que se aceptaron por el sulfato, lo que indicaría que no hubo consumo de substrato por sulfato-reducción.

4. Se calcularon los meq e<sup>-</sup> DQO donados por la DQO consumida, considerando el porcentaje de eficiencia de remoción de DQO en el reactor LFFD correspondiente.

$$meq e^{-} don. (DQO) = \left( \frac{ER DQO (\%)}{100} \right) * DQO_{af} (\frac{meq}{L}) \quad (Ec. 5.15)$$

5. Se calcularon los meq e<sup>-</sup> que fueron aceptados por otros procesos metabólicos (OPM) de la diferencia entre los meq e<sup>-</sup> donados por la DQO (Ec. 5.15) y los meq e<sup>-</sup> aceptados por el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Ec. 5.13).

$$meq e^{-} acep. (OPM) = meq e^{-} don. (DQO) - meq e^{-} acep. (SO_4^{2-} red.) \quad (Ec. 5.16)$$

6. Para calcular el reparto de la DQO removida vía sulfato-reducción (Ec. 5.17) y la DQO removida por otros procesos metabólicos (Ec. 5.18) se partió del hecho de que los meq e<sup>-</sup> donados por la DQO removida (Ec. 5.15) es igual a la suma de los meq e<sup>-</sup> aceptados por el sulfato (Ec. 5.13) más los equivalentes aceptados vía otros procesos metabólicos (Ec. 5.16). Adicionalmente se calculó cuanta DQO se removió vía sulfato-reducción a partir de lactato (Ec. 5.19) y a partir de acetato (Ec. 5.20).

$$DQO \text{ cons. vía SR (\%)} = \frac{\text{meq e}^{-} \text{ acep. (SO}_4^{2-} \text{ red)}}{\text{meq e}^{-} \text{ don. (DQO)}} * ER \text{ DQO (\%)} \quad (\text{Ec. 5.17})$$

$$DQO \text{ cons. vía OPM (\%)} = \frac{\text{meq e}^{-} \text{ acep. (OPM)}}{\text{meq e}^{-} \text{ don. (DQO)}} * ER \text{ DQO (\%)} \quad (\text{Ec. 5.18})$$

$$DQO \text{ (láctico) cons. vía SR (\%)} = \frac{\text{meq e}^{-} \text{ don. (Lac} \rightarrow \text{Ace)}}{\text{meq e}^{-} \text{ don. (DQO)}} * ER \text{ DQO (\%)} \quad (\text{Ec. 5.19})$$

$$DQO \text{ (acético) cons. vía SR (\%)} = DQO \text{ cons. vía SR (\%)} - DQO \text{ (láctico) cons. vía SR (\%)} \quad (\text{Ec. 5.20})$$

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Determinación de la actividad específica del inóculo de los reactores LFFD

Los cuatro reactores LFFD operados fueron inoculados con lodo granular disgregado finamente que provenía de la empresa Ricolino de esta ciudad. El lodo que se inoculó en cada reactor se mantuvo en un reactor UASB a escala laboratorio bajo condiciones de sulfato-reducción con los substratos etanol, acetato y lactato. La caracterización del lodo granular antes de inocular el reactor UASB consistió en determinar las actividades específicas sulfato-reductora y metanogénica por duplicado. La actividad sulfato-reductora que se obtuvo con etanol, acetato, lactato, acetato-lactato (70:30%) y formiato como substrato fue de 0.16, 0.03, 0.05, 0.04 y 0.21 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d, respectivamente, mientras que la actividad metanogénica con acetato fue de 0.09 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d (Figura 6.1).

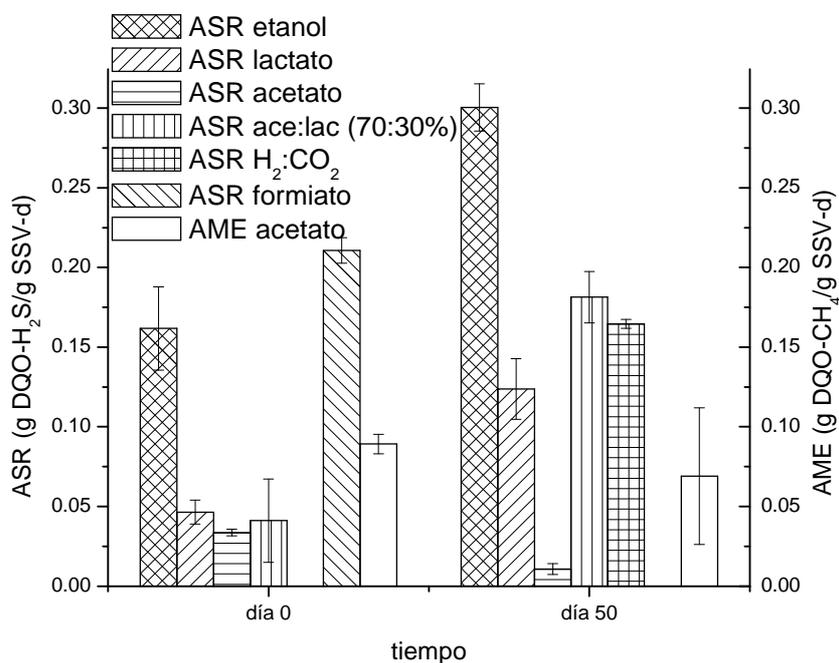


Figura 6.1 Caracterización del inóculo. ASR (g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d) y AME (g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d) antes de inocular el reactor UASB; y al día 50: inóculo para los reactores LFFD.

Antes de inocular el primer reactor LFFD (RA) y después de 50 días de operación del reactor UASB se volvieron a determinar las actividades sulfato-reductora y metanogénica del lodo granular, con el objetivo de conocer la capacidad del consorcio de metabolizar algunos substratos de interés. La AME se determinó con 1 g DQO-acetato/L, mientras que la ASR se determinó independientemente con 1 g DQO/L de etanol, lactato, H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20%), formiato, acetato o una mezcla de acetato-lactato (70:30%).

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la ASR del lodo al utilizar etanol, lactato, formiato y la mezcla de acetato-lactato; la excepción fue el acetato con el cual sólo se obtuvo una actividad de 0.01 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d después de operar el reactor UASB por 50 días. Por su parte, la AME con acetato permaneció prácticamente igual, ya que se obtuvo un valor de 0.09 en el día que se inoculó el reactor UASB y de 0.08 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d en el día 50 (Figura 6.1). Las actividades específicas del inóculo de los reactores RB, RC y RD son las que se obtuvieron con el lodo después de mantenerlo 50 días en el reactor UASB.

En la literatura se han reportado diversos valores de actividades específicas de lodo granular. Para la AME con acetato se han encontrado valores entre 0.2 y 0.6 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d (Omil *et al.*, 1997; Cresson *et al.*, 2008; Gallegos-García, 2009), mientras que para la ASR con acetato Gallegos-García (2009) reportó 0.15 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d en un UASB sulfato-reductor al día 194 de operación, así como 0.22 y 0.16 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d a partir de etanol y lactato, respectivamente. Dichos valores reportados en la literatura son ligeramente superiores a los obtenidos con el lodo granular utilizado en este estudio, con excepción de la ASR a partir de etanol.

## **6.2 Desempeño de los reactores LFFD**

Los reactores LFFD denominados RA, RB, RC y RD fueron operados de acuerdo a las condiciones mostradas en la tabla 5.5. En resumen, los reactores RA y RB se operaron a un TRH de 1 día, mientras que los reactores RC y RD se operaron a TRH de 2 días, la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en los reactores fue 0.67 (RA y RC) y 2.5 (RB y RD). Cada reactor se mantuvo en operación en continuo durante 35 días,

tiempo durante el cual se siguió su desempeño mediante la determinación de sulfuro producido, conversión de sulfato y remoción de DQO (consumo de lactato y acetato), principalmente.

De manera general, la cantidad de sólidos suspendidos volátiles en el efluente (SSV/L) se logró estabilizar en  $50 \pm 20.6$  mg SSV/L (en promedio) en los cuatro reactores (Figura 6.2), alrededor del día 28 de operación. La etapa que comprendió entre los días 28 y 35 de operación de los reactores LFFD se denominó como el periodo pseudo-estable de la etapa de arranque del reactor.

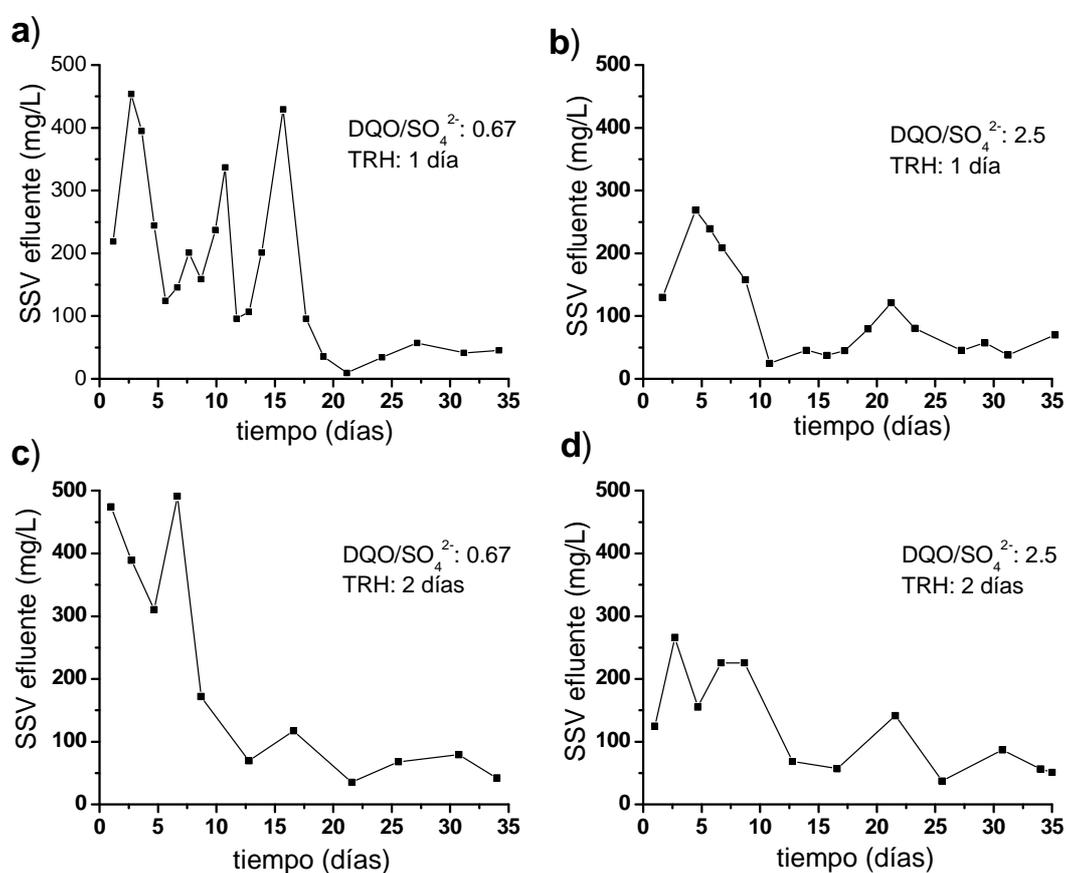


Figura 6.2 Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente (■) de los reactores LFFD; a) RA, b) RB, c) RC y d) RD.

### 6.2.1 Desempeño del reactor RA

La figura 6.3 muestra el desempeño general del reactor RA, el cual fue operado bajo una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67 y TRH de 1 día, presenta el perfil de concentración de sulfuro disuelto producido, la eficiencia de remoción de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y la eficiencia de remoción de DQO.

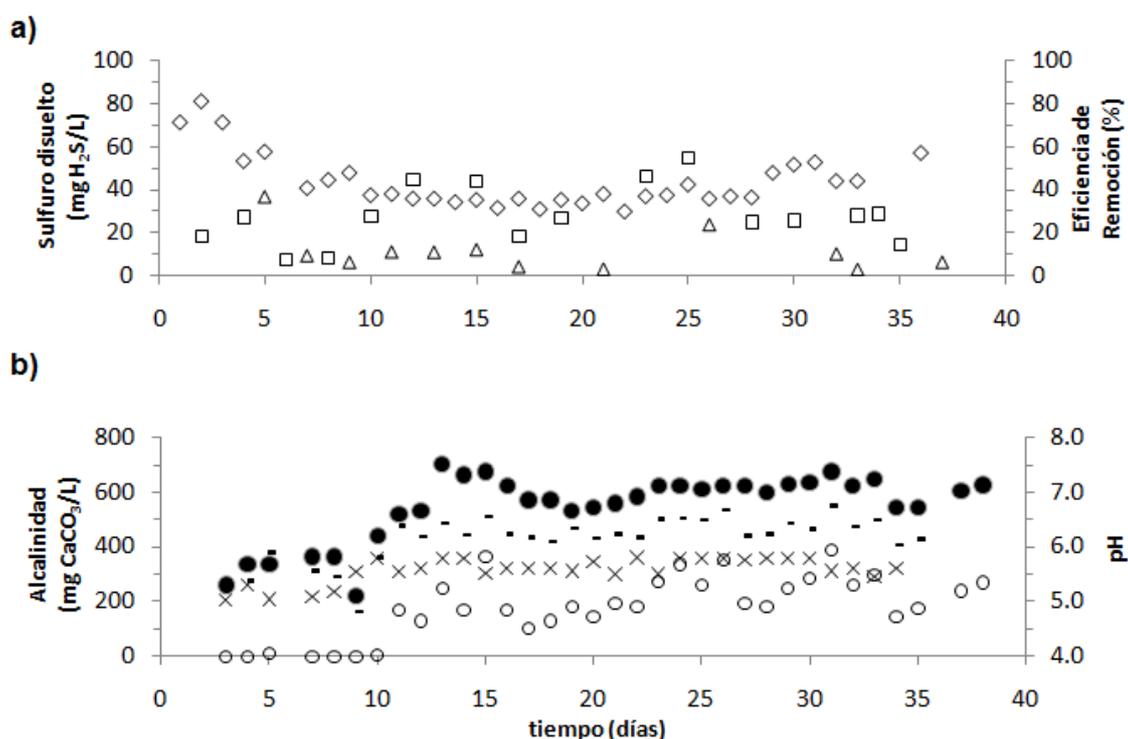


Figura 6.3 Desempeño del reactor RA. a) Perfil de concentración de sulfuro disuelto (◇), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato (Δ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO (□); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total (●), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).

De acuerdo con el perfil de sulfuro producido en el reactor (Figura 6.3a), la concentración de sulfuro descendió de 70 mg H<sub>2</sub>S/L hasta 30 mg H<sub>2</sub>S/L en los primeros 15 días de operación. Esto coincide con el periodo en que el reactor eliminó por el efluente la mayor cantidad de sólidos entre 100 y 450 mg SSV/L (Figura 6.2a). A partir de ese momento la concentración de sulfuro presente en el efluente comenzó a incrementarse paulatinamente hasta alcanzar una

concentración máxima de 59 mg H<sub>2</sub>S/L, mientras que se logró la estabilización de la concentración de sólidos en el efluente a un valor de 50 mg SSV/L. En cuanto a la eficiencia de remoción de sulfato, ésta se mantuvo baja a lo largo de todo el experimento, entre 10 y 30% (Figura 6.3a).

Por otro lado, la alimentación del reactor fue de 1 g DQO/L en forma de acetato-lactato 70:30%, y el TRH osciló en valores de alrededor de 24 ± 2 horas por lo que la carga orgánica alimentada fue de 1 g DQO/L-d. En el perfil de DQO se puede observar un incremento irregular en la remoción de DQO a lo largo del tiempo. De acuerdo a la concentración de DQO cuantificada en el efluente del reactor, se lograron obtener eficiencias de remoción de materia orgánica desde 10 hasta 50% a lo largo del tiempo (Figura 6.3a). Cabe señalar que la alta concentración de DQO en el efluente durante los primeros 10 días de operación del reactor coincidió con el tiempo en que el reactor se alimentó con el medio de alimentación ajustado a pH 5.0 (Figura 6.3b), por lo que la escasa remoción de DQO en el reactor se puede atribuir a la influencia del pH debido a que el pH óptimo para el crecimiento de los microorganismos metanogénicos y de la mayoría de las BSR es en valores alrededor de 7.0, y al estar en un medio con pH menor a la neutralidad éstos disminuyeron su actividad metabólica (Rittmann y McCarty, 2001). Adicionalmente, a pH 5.0 en la alimentación no logró cuantificarse alcalinidad por bicarbonato en el efluente del reactor, y la alcalinidad total en el reactor tan sólo llegó a 350 mg CaCO<sub>3</sub>/L, razón por la cual se decidió ajustar el pH en el afluente a 5.5. A partir de ese momento, se consiguió que la alcalinidad por bicarbonato se mantuviera en valores de entre 150 y 400 mg CaCO<sub>3</sub>/L. La alcalinidad total en este reactor se estabilizó en valores de 500 a 700 mgCaCO<sub>3</sub>/L alrededor del día 15 de operación. La distinción entre la alcalinidad de bicarbonato y la alcalinidad total, que incluye las sales de los AGV (producto de los AGV neutralizados), es de crítica importancia. Valores altos de alcalinidad total acompañados de valores bajos de alcalinidad por bicarbonato indican que gran parte de dicha alcalinidad es el resultado de los AGV neutralizados. Los altos niveles de alcalinidad y la baja eficiencia de remoción de sulfato que se reportan para este tiempo, se pueden explicar por la actividad de microorganismos capaces

de consumir DQO, pero no sulfato, que produjeron bicarbonato al degradar la materia orgánica presente. En la sección 6.2.5 se explicará más detalladamente el consumo de la DQO en los reactores. Por su parte, el comportamiento del pH en el reactor fue un incremento de 0.5 a 1.0 del valor de pH en el afluente (Figura 6.3b).

### 6.2.2 Desempeño del reactor RB

El reactor RB fue operado a una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2.5 y a TRH de 1 día, su desempeño se muestra en la figura 6.4.

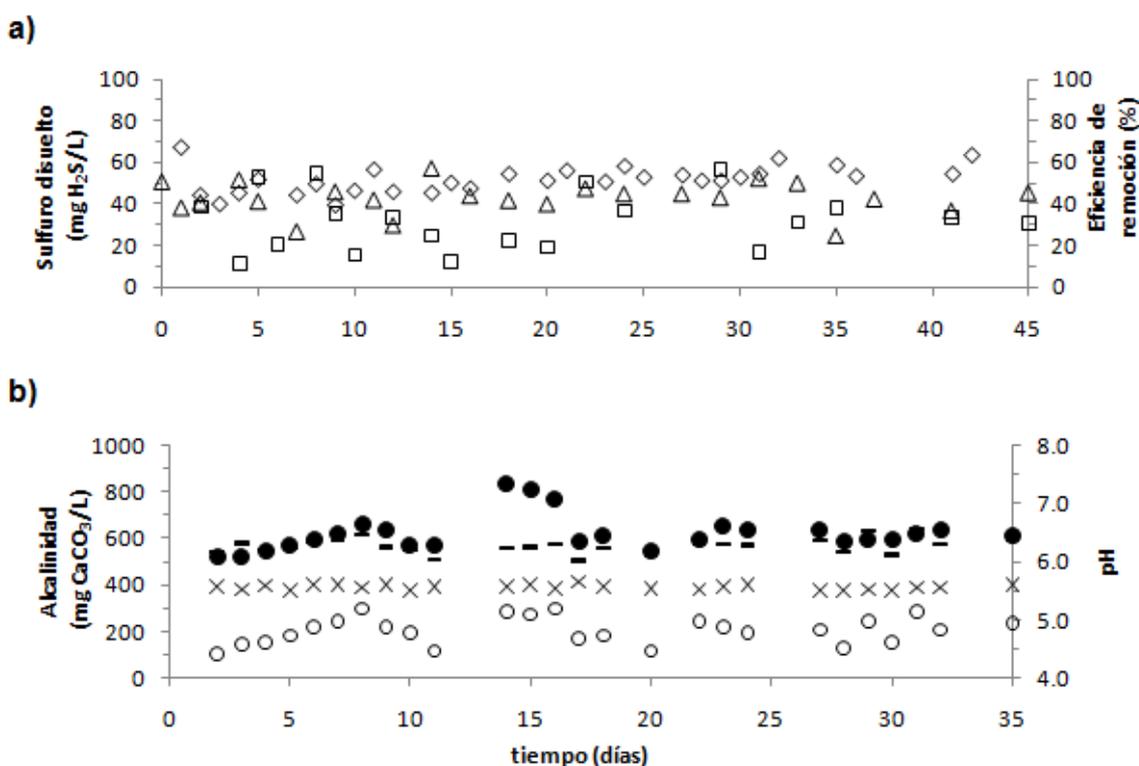


Figura 6.4 Desempeño del reactor RB. a) Perfil de concentración de sulfuro disuelto (◇), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato (Δ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO (□); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total (●), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).

De acuerdo con la figura 6.4a la concentración inicial de sulfuro disuelto producido fue de 69 mg H<sub>2</sub>S/L, este valor descendió en los primeros cuatro días de operación del reactor en que la concentración de los sólidos suspendidos

volátiles en el efluente fue de 280 mg SSV/L (Figura 6.2b). En los siete días subsecuentes, continuó la eliminación de sólidos suspendidos volátiles por el efluente hasta una concentración de 30 mg SSV/L. Pese a lo anterior, la producción de sulfuro no mostró una caída significativa, sino que osciló entre 40 y 50 mg H<sub>2</sub>S/L. Del día 10 en adelante se observó estabilidad en la producción de sulfuro con aumento de la concentración de sulfuro producido de manera discreta hasta alcanzar poco más de 60 mg H<sub>2</sub>S/L en el día 32 de operación del reactor. Los sólidos en el efluente se mantuvieron en valores alrededor de 50 mg SSV/L con un ligero incremento el día 22 donde la concentración fue de 120 mg SSV/L.

El perfil de eficiencia de remoción de DQO (Figura 6.4a) mostró porcentajes de remoción desde 10 hasta 50% a lo largo del tiempo con una variabilidad de 13.9%, sin tendencia alguna. Se logró remover 20% de la DQO alimentada inicialmente, y a los 35 días de operación esta eficiencia de remoción se incrementó al doble.

La eficiencia de remoción de sulfato alcanzada fue alrededor de 20% en los primeros días de operación del reactor y alcanzó valores ligeramente superiores a 40% al término de la operación del mismo (Figura 6.4a). Cabe señalar que en el caso de este reactor se pudo alcanzar mayor eficiencia de remoción de sulfato en comparación con el reactor RA, a pesar de que la concentración de sulfuro producido fue similar en ambos reactores, debido a que, como se puede observar en la tabla 5.5, el reactor RB se operó con una concentración de sulfato menor que el reactor RA.

Tal como se presenta en la figura 6.4b, el pH de la alimentación del reactor se mantuvo en un valor constante de 5.5, mientras que su efluente alcanzó valores de 6.5. La alcalinidad por bicarbonato inició en 100 mg CaCO<sub>3</sub>/L y logró incrementarse hasta 300 mg CaCO<sub>3</sub>/L, mientras que la alcalinidad total producida por este reactor inició en 500 mg CaCO<sub>3</sub>/L. El máximo valor de alcalinidad total obtenido en este reactor correspondió al día 16 de operación (830 mg CaCO<sub>3</sub>/L). A partir de ese momento disminuyó la producción de alcalinidad total, logrando estabilizarse entre 500 y 600 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

### 6.2.3 Desempeño del reactor RC

El reactor RC fue operado bajo una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67 y un TRH de 2 días. La figura 6.5 muestra el perfil de desempeño de este reactor en cuanto a la concentración de sulfuro producido, eficiencia de remoción de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, eficiencia de remoción de DQO, producción de alcalinidad y pH en el efluente.

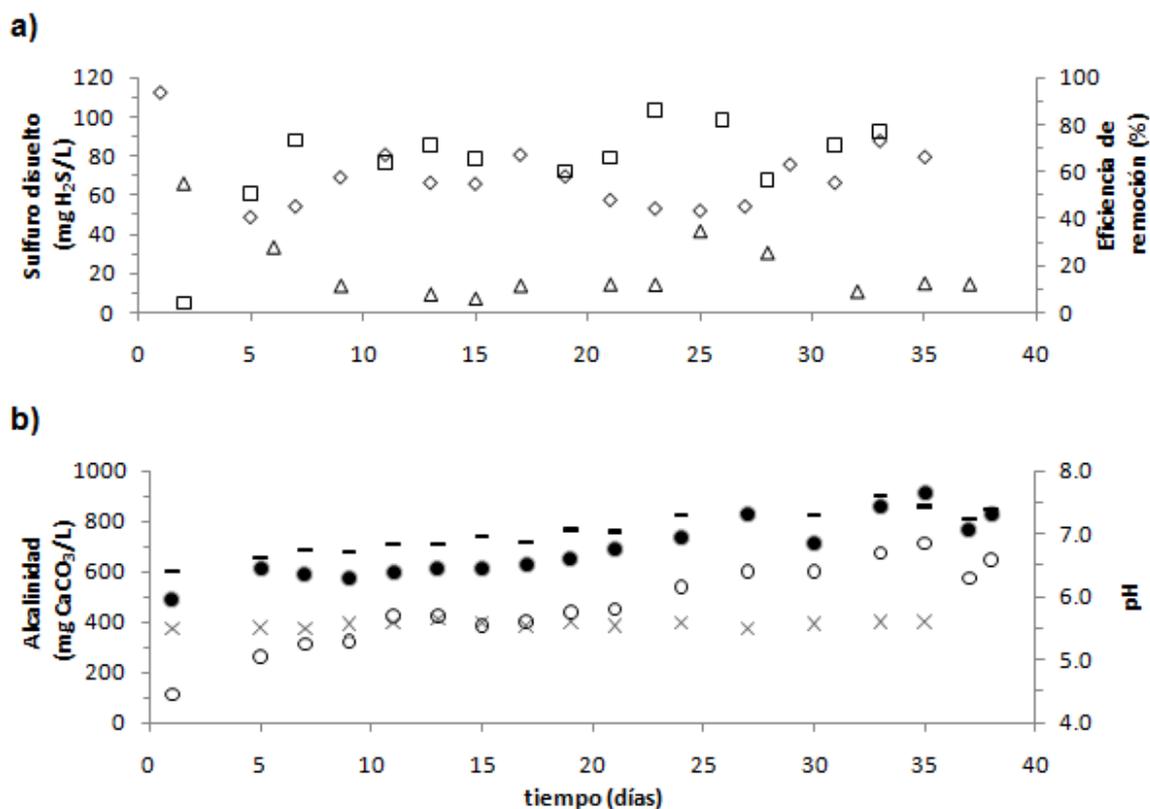


Figura 6.5 Desempeño del reactor RC. a) Perfil de concentración de sulfuro disuelto (◇), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato (Δ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO (□); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total (●), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).

De acuerdo con la figura 6.5a, a lo largo del experimento se observó variación en los perfiles de sulfuro producido iniciando en valores alrededor de 45 mg H<sub>2</sub>S/L e incrementándose paulatinamente hasta alcanzar valores de 80 mg H<sub>2</sub>S/L al final de la operación del reactor. Al inicio del experimento y durante los primeros diez días de operación del reactor, la concentración de sólidos

suspendidos volátiles que salían por el efluente estuvo alrededor de 480 mg SSV/L, dicha concentración disminuyó hasta 150 mg SSV/L al día 14 de operación (Figura 6.2c). Durante este tiempo la concentración de sulfuro disuelto en el reactor aumentó de 45 mg H<sub>2</sub>S/L a 65 mg H<sub>2</sub>S/L. En los siguientes trece días, la concentración de sulfuro en el reactor se mantuvo en valores entre 60 y 80 mg H<sub>2</sub>S/L. A partir de ese momento y hasta culminar la operación del reactor, este valor incrementó paulatinamente hasta alcanzar 87 mg H<sub>2</sub>S/L. El periodo de tiempo en el cual la concentración de sulfuro disuelto fue constante o se incrementó correspondió al tiempo en que el lavado de sólidos del reactor fue entre 50 y 100 mg SSV/L.

La eficiencia de remoción de sulfato se mostró muy poco cambiante durante todo el experimento manteniéndose en valores entre 10 y 20%, mientras que la eficiencia de remoción de DQO estuvo entre 50 y 80%. Al igual que en el reactor RA, este reactor se obtuvieron bajos valores de eficiencia de remoción de sulfato, sin embargo, la eficiencia de remoción de DQO se vio incrementada al igual que los valores de alcalinidad registrados, lo cual permite inferir la presencia y actividad de microorganismos diferentes a las BSR responsables del consumo de DQO y por ende de la alcalinidad producida. La presencia de dichos microorganismos se discutirá en la sección 6.2.5.

El pH en el efluente se mantuvo alrededor de 7.0, por lo que se logró neutralizar la acidez del afluente gracias a la alcalinidad generada de la oxidación de materia orgánica (cuantificada como eficiencia de remoción de DQO). La alcalinidad de bicarbonato se cuantificó en valores desde 100 hasta 600 mg CaCO<sub>3</sub>/L, mientras que la alcalinidad total estuvo entre 500 y 900 mg CaCO<sub>3</sub>/L (Figura 6.5b). Ambas concentraciones de alcalinidad mostraron un aumento constante al paso del tiempo. Los valores de máxima producción de alcalinidad correspondieron al lapso de tiempo de mayor remoción de DQO (Figura 6.5a).

#### **6.2.4 Desempeño del reactor RD**

El reactor RD fue operado bajo una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 2.5 y TRH de 2 días. La figura 6.6 muestra el perfil de desempeño de este reactor en cuanto a sulfuro

producido, eficiencia de remoción de  $\text{SO}_4^{2-}$ , eficiencia de remoción de DQO, producción de alcalinidad y pH en el efluente.

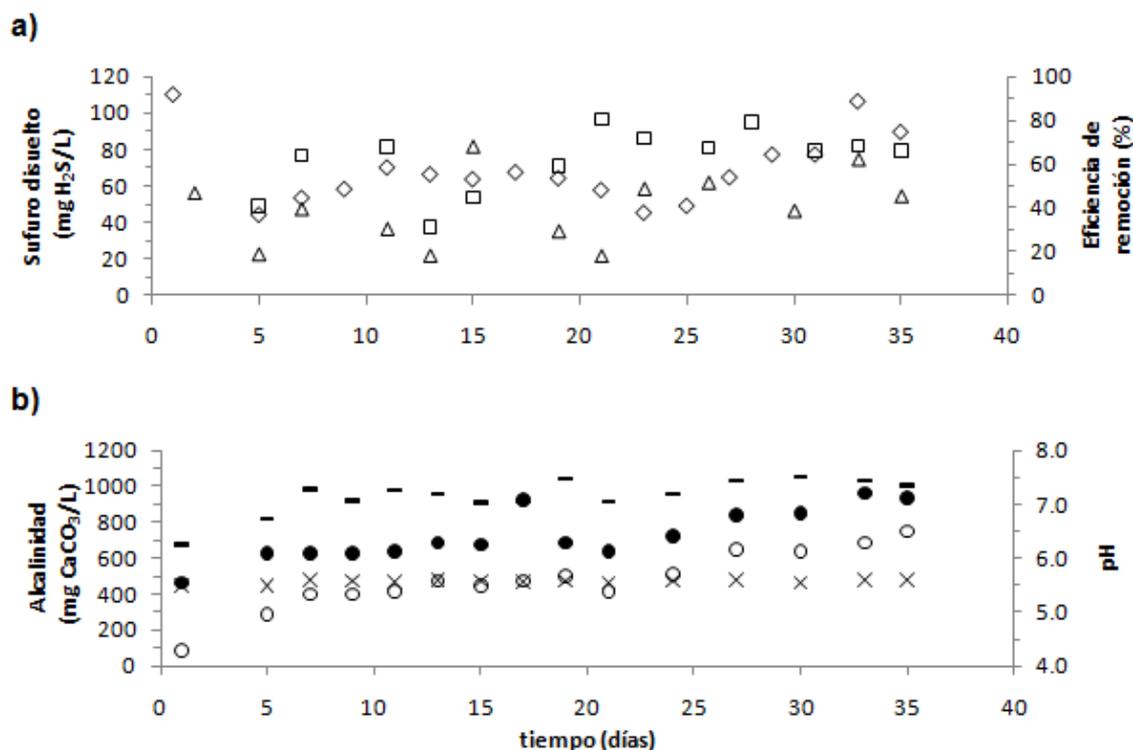


Figura 6.6 Desempeño del reactor RD. a) Perfil de concentración de sulfuro disuelto (◇), porcentaje de eficiencia de remoción de sulfato (Δ) y porcentaje de eficiencia de remoción de DQO (□); b) Perfil de concentración de alcalinidad de bicarbonato (o), alcalinidad total (●), pH en el afluente (x) y pH en el efluente (-).

Como se observa en la figura 6.6a, a lo largo del experimento del reactor RD se observó variación en la concentración de sulfuro producido iniciando en valores de alrededor de 40 mg H<sub>2</sub>S/L con una previa concentración de sulfuro más alta cuantificada para el primer día del experimento (110 mg H<sub>2</sub>S/L) la cual se debe al sulfuro producido que estaba en el lodo al momento de inocularse, e incrementándose paulatinamente hasta valores de poco más de 100 mg H<sub>2</sub>S/L obtenidos al culminar el experimento. En el primer día de la operación del reactor, la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente fue de 120 mg SSV/L. Durante los siguientes ocho días de experimentación de este reactor, la

concentración de sólidos en el efluente estuvo entre 220 y 260 mg SSV/L, la cual disminuyó a partir de ese momento hasta una quinta parte de estos valores, manteniéndose constante hasta el final del experimento (Figura 6.2d). El tiempo en el que se presentó un ligero incremento en la concentración de sólidos suspendidos volátiles lavados del reactor (de 50 a 120 mg SSV/L) coincidió con el tiempo en que el reactor disminuyó la producción de sulfuro del valor constante que había presentado desde los doce días (alrededor de 60 mg H<sub>2</sub>S/L) a un valor de 45 mg H<sub>2</sub>S/L el día 23 de operación. A partir de este día comenzó a incrementarse la concentración de sulfuro disuelto en el reactor hasta un valor final de poco más de 100 mg H<sub>2</sub>S/L. Esta última etapa positiva del desempeño del reactor en cuanto a producción de sulfuro correspondió al lavado constante de sólidos del reactor en los valores más bajos obtenidos a lo largo del experimento (alrededor de 50 mg SSV/L).

La eficiencia de remoción de sulfato se mantuvo muy oscilante en valores desde 20 hasta 60%. Al día 3 de operación del reactor se obtuvo una eficiencia de remoción de sulfato de 50%, lo cual correspondió a la alta producción de sulfuro disuelto registrada para ese día. Este valor disminuyó a 20% de remoción al día 5 de operación, pero posteriormente aumentó a un valor promedio de 30% que se mantuvo hasta alrededor del día 20 de operación. Los últimos cuatro días del experimento presentaron alrededor de 60% de eficiencia de conversión de sulfato (Figura 6.6a).

Por otro lado, la remoción de DQO estuvo alrededor de 40% inicialmente, y se estabilizó en aproximadamente 60% a partir del día 25 de operación, para finalizar en aproximadamente 70% de eficiencia de remoción de DQO. Los días con mayor remoción de DQO fueron los días con mayor eficiencia de remoción de sulfato y mayor producción de sulfuro disuelto por el reactor (Figura 6.6a).

De acuerdo con la figura 7.6b se logró neutralizar el pH ligeramente ácido del afluente (5.5), al obtenerse un incremento en el efluente de 2 unidades de pH con respecto al pH del afluente. La alcalinidad de bicarbonato determinada fue desde valores iniciales de 100 mg CaCO<sub>3</sub>/L hasta valores finales de 650 mg

CaCO<sub>3</sub>/L, mientras que la alcalinidad total estuvo entre 500 mg CaCO<sub>3</sub>/L (inicialmente) y 1000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, al finalizar la operación del presente reactor.

### 6.2.5 Consumo de sustratos y balance másico total de compuestos azufrados en los reactores LFFD

Los cuatro reactores LFFD operados a diferente relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y TRH se alimentaron con la mezcla acetato-lactato (70:30%) y se inocularon con un lodo granular proveniente de la misma fuente. Debido a las diferencias en la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y en el TRH de operación de los reactores LFFD se esperaba que el consumo de los sustratos acetato y lactato fuera diferente y se buscaba favorecer el consumo de acetato. Como se indicó en la sección de cálculos, el balance de sustratos realizado para los cuatro experimentos se fundamentó en la oxidación incompleta del lactato por las BSR que generan acetato y la posterior oxidación del acetato presente por la vía metabólica de sulfato-reducción, de fermentación o de metanogénesis. En la figura 6.7 se muestra el resumen del balance de los sustratos en el periodo pseudo-estable (últimos 7 días) de operación de los cuatro reactores LFFD.

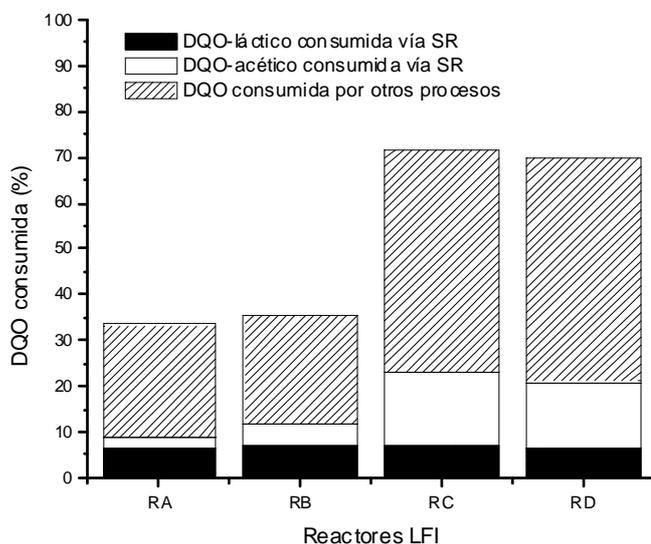


Figura 6.7 Porcentaje de DQO consumida y fracción de DQO consumida vía sulfato-reducción (SR) u otros procesos metabólicos en cada uno de los reactores LFFD.

El porcentaje de DQO consumida vía sulfato se obtuvo considerando el porcentaje de la DQO consumida por sulfato-reducción y el porcentaje de eficiencia de remoción de DQO, mientras que el porcentaje de DQO consumida vía otros procesos metabólicos se obtuvo considerando el porcentaje de la DQO consumida por otros aceptores terminales de electrones (ATE) y el porcentaje de eficiencia de remoción de DQO.

De acuerdo con la figura 6.7, del 100% de DQO alimentada en el reactor RA se consumió 33.4%, de la cual 9.01% fue oxidada por la vía sulfato-reductora, mientras que el porcentaje restante de DQO removida fue consumida por otros procesos como la metanogénesis o la fermentación. Del consumo de DQO por vía SR, el 74.4% fue a partir del lactato consumido y el 25.6% restante se atribuye al consumo de acetato. Estos valores corresponden a 6.7 y 2.3% de la DQO consumida por SR a partir del lactato y acetato alimentados, respectivamente. Los datos anteriores indicaron que en este reactor más del 50% de la DQO consumida fue mediante microorganismos no sulfato-reductores; sin embargo, entre las BSR presentes hubo bacterias capaces de utilizar el acetato como donador de electrones. Flores-Aguilar (2010), reportó que en un reactor LFFD operado bajo condiciones similares de TRH y relación  $DQO/SO_4^{2-}$  a las del reactor RA, el consumo total de acetato logrado (44.8%) fue gracias a microorganismos no sulfato-reductores, mientras que la mitad del lactato alimentado fue removido por BSR desarrolladas en el reactor. En el reactor RB, se consumió por todos los procesos un porcentaje similar de DQO al del reactor RA, esto es, un consumo de DQO de 35.7%. El 11.9% de esta DQO fue consumida por BSR (7.1% a partir de lactato y 4.7% a partir de acetato) y 23.8% fue removida del reactor por otros procesos metabólicos. Comparando el consumo de substratos en estos dos reactores LFFD se encontró que aunque la eficiencia de remoción o consumo de DQO global fue similar tanto en RA como en RB, en este segundo reactor se incrementó ligeramente el porcentaje de DQO removida por las BSR, lo que coincide con un incremento en la eficiencia de remoción de sulfato en el reactor RB en comparación con RA (Fig. 6.3a y 6.4a). En ambos casos el substrato lactato fue preferido por las BSR sobre el substrato acetato, lo cual puede indicar la

mayor prevalencia de BSR capaces de oxidar lactato en comparación con las BSR que oxidan acetato.

Por otro lado, los reactores operados a TRH de 2 días mostraron mayor consumo de DQO, 71.6 y 69.8% en los reactores RC y RD, respectivamente, de los cuales las BSR consumieron 23.2% de la DQO en el reactor RC y 20.9% en el reactor RD, lo que refleja mayor consumo de DQO por las BSR en comparación con los reactores operados a TRH de un día. La DQO consumida por otros procesos metabólicos diferentes a sulfato-reducción fue de 48.4 y 48.9% para el reactor RC y el reactor RD, respectivamente. El porcentaje de DQO consumida vía sulfato-reducción a partir de lactato fue de 7.2% y 6.4% en los reactores RC y RD, respectivamente; la DQO consumida a partir de acetato fue 16.0% en el reactor RC y 14.5% en el reactor RD. Al comparar el consumo de acetato en estos dos reactores con los reactores RA y RB se encontró que en los cuatro reactores hubo consumo de acetato por las BSR-OC; no obstante, en los reactores RC y RD fue evidente el incremento en el consumo de este sustrato. Cabe señalar que casi el 50% de la DQO consumida en los reactores RC y RD fue consumida por microorganismos no sulfato-reductores presentes en estos sistemas. Dicho comportamiento se puede atribuir al TRH de 2 días bajo el cual se operaron los reactores RC y RD, mismo que permitiría el establecimiento de microorganismos capaces de consumir acetato como los microorganismos metanogénicos en la comunidad microbiana del reactor (Omil *et al.*, 1998). De manera general, la figura 6.7 mostró que el factor determinante en el consumo de sustratos en los reactores LFFD fue principalmente el TRH, y que fue menos utilizado el acetato que el lactato por las BSR a TRH de un día, por lo que el acetato formó gran parte de la DQO residual en el efluente al ser uno de los principales productos de la sulfato-reducción, producto de microorganismos como *Desulfovibrio sp.* el cual oxida el sustrato hasta acetato (Kaksonen *et al.*, 2004a; Ren *et al.*, 2007; Celis *et al.*, 2009; Gallegos-García *et al.*, 2009). Se ha reportado que el consumo de acetato en los reactores sulfato-reductores es de suma importancia, para evitar la acidificación dentro de dichos sistemas (Kaksonen *et al.*, 2004b; Celis *et al.*, 2009; Gallegos-García *et al.*, 2009), y aunque este consumo pudo deberse a los

microorganismos adheridos a la biopelícula, también pudo deberse a los microorganismos que, pese a que no lograron anclarse al soporte, aún permanecían dentro del reactor.

Por otro lado, para determinar la forma en que se encontraba el azufre que ingresó a los reactores LFFD en forma de sulfato, además de comprobar que el azufre del sulfato que se redujo correspondió al azufre del sulfuro que se produjo, se realizó un balance másico total de compuestos azufrados (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Balance de compuestos azufrados en los reactores LFFD en el periodo pseudo-estable de los experimentos (valores promedio  $\pm$  desviación estándar).

Reactor	Afluyente	Efluente			Recuperación
	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mM	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mM	S-H <sub>2</sub> S en líq. mM	S-S <sup>2-</sup> en gas mM	S-Total %
<b>RA</b>	15.3 $\pm$ 0.6	13.6 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 0.2	41.2 $\pm$ 0.1	102.3 $\pm$ 9.6
<b>RB</b>	4.8 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	41.8 $\pm$ 0.1	109.0 $\pm$ 6.7
<b>RC</b>	17.7 $\pm$ 1.9	13.2 $\pm$ 2.7	2.1 $\pm$ 0.4	42.0 $\pm$ 0.2	91.6 $\pm$ 16.1
<b>RD</b>	5.0 $\pm$ 1.8	1.6 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.6	41.9 $\pm$ 0.3	100.1 $\pm$ 26.9

n= 7 días

De acuerdo con los resultados del balance de materia para el azufre, en los cuatro reactores se recuperó azufre en el efluente en forma de sulfato y de sulfuro. El faltante de azufre en el reactor RC para alcanzar 100% de recuperación puede estar relacionado con la presencia de otros compuestos azufrados no cuantificados como sulfito, tiosulfato, polisulfuros, politionatos, azufre elemental precipitado y/o azufre utilizado para la formación de biomasa (Lens y Kuenen, 2001). Por su parte, el porcentaje de azufre recuperado como excedente en los reactores RA, RB y RD puede deberse a la sobreestimación del sulfuro en fase gaseosa debido a que éste no se cuantificó experimentalmente, si no que se estimó teóricamente. Al respecto, se estimó que en los cuatro reactores LFFD, aproximadamente 40% de sulfuro se encontró en forma gaseosa en el biogás generado.

Tanto en la conversión de materia orgánica como la conversión de sulfato presentes fueron llevadas a cabo por acción microbiana. Los géneros y especies

de microorganismos que estuvieron presentes en los reactores y en sus biopelículas se presentarán en la sección 6.6.

### 6.2.6 Comparación y discusión del desempeño de los reactores LFFD en fase de arranque

La tabla 6.2 muestra los valores promedio obtenidos en el período pseudo-estable de los cuatro reactores LFFD. Como suplemento de la información presentada en la tabla 6.2, se realizó el análisis estadístico de los cuatro reactores LFFD operados en cuanto a concentración de sulfuro disuelto producido, y las eficiencias de remoción de DQO y sulfato. Según esta información existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en cada uno de los parámetros de desempeño comparados entre los reactores (Anexo 2), esto quiere decir que hay evidencia estadística con un intervalo de confianza de 95% que fundamenta que existe diferencia en los valores de eficiencia de remoción de DQO, eficiencia de remoción de sulfato y de sulfuro producido en los reactores LFFD.

Tabla 6.2 Desempeño promedio de los reactores LFFD en el periodo pseudo-estable de fase de arranque (valores promedio  $\pm$ desviación estándar).

Parámetro/Reactor	RA	RB	RC	RD
TRH (días)	1	1	2	2
DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.67	2.5	0.67	2.5
Eficiencia de remoción de DQO (%)	33.4 $\pm 12.5$	35.6 $\pm 14.4$	71.6 $\pm 9.7$	69.8 $\pm 5.4$
DQO removida por BSR (mg/L)	103.5 $\pm 10.9$	114.0 $\pm 8.3$	156.6 $\pm 17.5$	183.5 $\pm 24.1$
DQO removida por otros microorganismos (mg/L)	182.0 $\pm 8.7$	226.4 $\pm 68.0$	494.1 $\pm 86.2$	511.2 $\pm 32.8$
Eficiencia de remoción de sulfato (%)	9.8 $\pm 1.7$	43.1 $\pm 9.8$	22.4 $\pm 12.4$	66.1 $\pm 13.6$
Sulfuro disuelto (mg/L)	47.9 $\pm 6.3$	55.2 $\pm 4.0$	72.8 $\pm 11.4$	83.2 $\pm 14.1$
Acetato consumido (mg/L)	191.4 $\pm 130.2$	117.6 $\pm 34.9$	362.3 $\pm 25.1$	423.5 $\pm 75.6$
Alcalinidad por bicarbonato (mg/L)	270.8 $\pm 73.3$	210.2 $\pm 53.3$	646.9 $\pm 48.7$	681.2 $\pm 43.7$
pH efluente	6.47 $\pm 0.2$	6.38 $\pm 0.2$	7.40 $\pm 0.2$	7.42 $\pm 0.1$

Como se observa en la tabla anterior, de manera general, al comparar los reactores operados a un mismo TRH entre sí, se encontró que los reactores operados a  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2.5, es decir, los reactores RB y RD, lograron mayor producción de sulfuro (55.2 y 83.2 mg  $H_2S/L$ , respectivamente) y mayor eficiencia de remoción de sulfato (43.1 y 66.1%, respectivamente) en comparación con los reactores operados a la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  estequiométrica. Cabe señalar que la cantidad de sulfato eliminado por los reactores correspondió a la concentración de sulfuro producido principalmente como resultado de la oxidación de lactato. La razón por la cual no se lograron mayores eficiencias de remoción de DQO y  $SO_4^{2-}$  y por ende mayor producción de sulfuro es la siguiente: la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  estequiométrica (0.67) indica la proporción teórica de sulfato necesaria para lograr la remoción completa de la materia orgánica presente en ese medio, en el caso de que 8 electrones del donador (DQO, lactato específicamente) se transfieran al aceptor (sulfato), lo que indicaría a su vez que la materia orgánica se oxidó hasta  $CO_2$  (Omil *et al.*, 1998). La situación anterior propone un escenario en que se alcanzarían eficiencias de remoción de  $SO_4^{2-}$  y de DQO al 100%; sin embargo, en la práctica no sucede lo anterior debido a que en lugar de que se transfieran 8 electrones a cada molécula de sulfato, se transfieren tan solo 4 electrones a cada molécula de sulfato derivados de la oxidación incompleta de la DQO (lactato) hasta acetato (Lens *et al.*, 1998). Como ya se ha mencionado, es más probable que en sistemas sulfato-reductores se lleve a cabo la oxidación incompleta de materia orgánica que la oxidación completa, debido a la mayor abundancia y tiempos de duplicación menores de las BSR-OI en comparación con las BSR-OC (Oude Elferink *et al.*, 1994).

La concentraciones de sulfuro producido en los cuatro reactores son comparables con la producción obtenida por Nagpal *et al.* (2000) quienes reportaron concentraciones de sulfuro producido en un reactor de lecho fluidificado sulfato-reductor alimentado con etanol de 50 a 100 mg  $H_2S/L$  a los 500 días de operación en continuo. Por otra parte Celis-García *et al.* (2007) lograron obtener 106 mg  $H_2S/L$  en un reactor LFFD al día 97 de operación en continuo que fue operado previamente 45 días en lote, mientras que al operar un reactor similar se

reportó una concentración de sulfuro disuelto de 69 mg H<sub>2</sub>S/L al día 110 (Celis *et al.*, 2009); aunque esas concentraciones de sulfuro fueron mayores a las que se obtuvieron en los reactores LFFD operados en el presente trabajo, las reportadas por Celis y colaboradores se obtuvieron de reactores LFFD que requirieron un amplio periodo de arranque en lote previo a la operación en continuo; sin embargo, los reactores LFFD de este estudio (RA-RD) presentan la ventaja de haberse operado en lote por un corto periodo de tiempo (12 a 24 horas). Por su parte, al comparar la producción de sulfuro obtenido por el reactor RA en el presente trabajo (57 mg H<sub>2</sub>S/L) con la obtenida por Flores-Aguilar (2010), se encontró que existió reproducibilidad en dicho experimento, debido a que esta autora reportó 80 mg H<sub>2</sub>S/L producido en un reactor LFFD al día 30 de operación en continuo (sin un arranque en lote prolongado) al alimentarlo con una mezcla acetato-lactato 70:30% a una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.6, las cuales son condiciones de operación similares a las de RA. Una mayor producción de sulfuro en un reactor LFFD fue obtenida por Gallegos-García (2009) quien logró cuantificar 155 mg H<sub>2</sub>S/L al día 21 de operación en continuo del reactor.

Aunque en la literatura no se encuentra diversidad de reportes acerca de los niveles tóxicos de sulfuro para los microorganismos, algunos autores han reportado concentraciones de sulfuro tóxicas ya sea en su crecimiento o en su actividad (utilización de sustrato o de sulfato), mismos que no son linealmente correlacionados y en ocasiones son contradictorios. Estos valores se pueden indicar en términos de concentración de sulfuro disuelto en el medio, aunque la toxicidad en sí se deba a la forma no disociada de este compuesto. Al respecto, Maillacheruvu y Parkin (1996) reportaron que entre las bacterias que oxidan propionato, las que oxidan acetato y las BSR hidrogenotróficas, las BSR acetotróficas fueron más susceptibles a la inhibición por sulfuro. Kaksonen *et al.* (2004a), reportaron que en la operación de un reactor de biopelícula fluidificado a 35°C y valores de pH entre 6.9 y 7.3, la constante de inhibición de la utilización de etanol por los microorganismos se alcanzó en un valor de 225 a 248 mg/L de sulfuro disuelto o bien, entre 76 y 84 mg/L de sulfuro no disociado, mientras que, la constante de inhibición de la utilización de acetato se alcanzó entre 338 y 356

mg/L de sulfuro disuelto ó de 118 a 124 mg/L de sulfuro no disociado. Al comparar los valores de sulfuro obtenidos en los reactores LFFD del presente estudio, con los valores de toxicidad reportados en la literatura, se puede inferir que no hubo inhibición microbiana por sulfuro en los reactores LFFD operados.

En cuanto a la eficiencia de remoción de sulfato, según los resultados mostrados en la tabla 6.2, al operar un reactor LFFD a una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 2.5, se logró que la eficiencia con que se redujo el sulfato fuera de aproximadamente tres veces mayor que la eficiencia de remoción de sulfato obtenida a la relación estequiométrica de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, la cual fue de 9.8%. Gallegos-García (2009) reportó 25% de eficiencia de remoción de sulfato en las primeras tres semanas de operación de un reactor similar a los operados en este estudio a una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67 con acetato-lactato (80:20%) como fuente de carbono. Por su parte, un reactor LFFD operado por Flores-Aguilar (2010), con acetato-lactato (70:30%) en la alimentación y a DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.6 logró 12.5% de eficiencia de remoción de sulfato. Este resultado es muy similar a lo obtenido en este estudio con el reactor LFFD operado bajo las mismas condiciones. Algunos autores han reportado que la eficiencia de remoción de sulfato mejora al incrementar la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Ren *et al.*, 2007; Shabir *et al.*, 2008). Al respecto Zhao *et al.* (2008), reportaron el desarrollo de una comunidad microbiana heterogénea en un reactor CSTR mesófilo operado con una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mayor a la estequiométrica (DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 2.0), la cual permitió alcanzar una eficiencia de remoción de sulfato superior a 90%. Dicha comunidad estuvo integrada por bacterias acidogénicas fermentativas y BSR tales como *Desulfovibrio sp.*, *Desulfobulbus sp.*, así como *Pseudomonas sp.* y *Clostridium sp.* que contribuyeron a la degradación del lactato presente en el reactor. Los autores propusieron que el lactato pudo servir como donador de electrones para *Desulfovibrio sp.* principalmente, o pudo ser fermentado por *Clostridium sp.* y *Bacteroides sp.* para producir propionato y etanol que fueron utilizados subsecuentemente por *Desulfovibrio sp.* o *Desulfobulbus sp.*, además de la oxidación del acetato presente por las BSR acetotróficas.

Por otro lado, el aumento del TRH de 1 día a 2 días incrementó la eficiencia de remoción de DQO en los reactores operados en la presente investigación. Los reactores RA y RB obtuvieron una remoción de DQO de alrededor de 33%, mientras que para los reactores RC y RD la eficiencia de remoción de DQO aumentó a valores alrededor de 65 y 70%. Esto demostró que la remoción de DQO fue independiente de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$ . Sin embargo, según la tendencia, la DQO removida por las BSR no aumentó con el cambio de TRH a diferencia de la concentración de DQO consumida por otro tipo de microorganismos no sulfato-reductores (Fig. 6.7). Lo anterior puede observarse con los reactores operados a TRH de 2 días (RC y RD), en éstos, la DQO removida por bacterias no sulfato-reductoras fue el doble que la DQO removida por estos mismos grupos lograda en los reactores operados a TRH de 1 día (RA y RB). Estos resultados permiten señalar que en los sistemas operados a TRH de 2 días se favoreció la presencia de diversos grupos tróficos, entre ellas las bacterias sulfato-reductoras que oxidan el substrato completamente y los microorganismos metanogénicos, y esta comunidad contribuyó a mejorar la capacidad de remoción de DQO. En cuanto a la influencia del incremento de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  en la eficiencia de remoción de DQO, en el presente estudio se mostró que ésta no fue tan significativa como la influencia del TRH. Se ha reportado que para aguas residuales con relaciones  $DQO/SO_4^{2-}$  mayores que 0.67, la cantidad de materia orgánica es suficiente para reducir completamente al sulfato presente, mientras que la materia orgánica que queda en exceso puede eliminarse de manera completa al acoplarse el proceso de sulfato-reducción con el proceso de metanogénesis (Omil *et al.*, 1998); sin embargo, siempre existirá competencia entre estos grupos microbianos por el acetato presente (Choi y Rim, 1991).

Adicionalmente, en los reactores RC y RD no se encontró lactato residual en sus efluentes durante el periodo pseudo-estable; no obstante, en el efluente de los reactores RA y RB se detectaron 9.4 y 6.2% de la concentración de lactato inicial, respectivamente. Aunado a esto, en estos reactores se detectó acetato acumulado en el efluente como resultado de la oxidación incompleta de lactato. En contraste, los reactores RC y RD (operados a TRH de 2 días) lograron un mayor

consumo de acetato; valores de concentración de acetato consumido de 362.3 mg/L en el reactor RC y 423.5 mg/L en el reactor RD (Tabla 6.2) demostraron que el consumo de acetato dependió del TRH. Esto es, un TRH de 2 días permitió mayor consumo de acetato que el TRH de 1 día. El acetato consumido pudo haberse debido al proceso de sulfato-reducción o metanogénesis; sin embargo, pudo también deberse a otros grupos microbianos presentes en el reactor tal como lo señala Sahinkaya *et al.* (2007), aunque este autor no especifica a que microorganismos se refiere.

De acuerdo con Michaud *et al.* (2005) y Cresson *et al.* (2008), el TRH es un factor clave en la selección de los microorganismos que permanecen dentro de un reactor; ya que éste es el inverso de la tasa de dilución en el reactor, la cual determina el crecimiento microbiano dentro del mismo dependiendo de las constantes de crecimiento específico de los microorganismos involucrados. Atendiendo a esto, los microorganismos que permanecerán en el reactor serán los que posean una constante de crecimiento específica mayor a la tasa de dilución, mientras que los microorganismos con constantes de crecimiento específicas menores se lavarán del reactor. Lo anterior fundamenta que en los reactores LFFD operados a TRH más largos hayan permanecido microorganismos con tiempos de duplicación mayores, entre ellos las BSR-OC y los microorganismos metanogénicos, los cuales pudieron degradar parte del acetato presente. La forma en que se encuentren los microorganismos dentro del reactor (biopelícula o biomasa suspendida) está en función de sus propiedades de inmovilización y del TRH (Cresson *et al.*, 2008; McMahon y Daugulis, 2008), debido a que se demostró que en un reactor de biopelícula los TRH largos no conllevaron el lavado de biomasa suspendida, si no que permitieron que ésta se enriqueciera en el reactor formando la biomasa planctónica del sistema, o que la biomasa fija eventualmente pudiera desprenderse del soporte regresando a su estado planctónico, por lo que esas células planctónicas representaron también una competencia con la biomasa anclada en la biopelícula por los substratos disponibles (Cresson *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, las ASR obtenidas de las biopelículas de los reactores operados a TRH de un día (RA y RB) con lactato y acetato como

substratos, fueron muy parecidas a las obtenidas en los reactores operados a un TRH de 2 días (RC y RD), esto es, valores entre 1.8 y 12 mg H<sub>2</sub>S/L-d a lo largo del tiempo a partir de lactato, y valores entre 0.2 y 2 mg H<sub>2</sub>S/L-d a partir de acetato; sin embargo, la eficiencia de remoción de DQO fue mayor en los reactores operados a TRH de 2 días en comparación con la obtenida en los reactores operados a TRH de 1 día, por lo que se considera que además de los microorganismos anclados en el soporte (biopelícula), la biomasa retenida de manera suspendida en los reactores (biomasa planctónica) contribuyó significativamente en la remoción de materia orgánica y sulfato presentes. De manera específica pudieron existir microorganismos metanogénicos adheridos al soporte y también como biomasa planctónica los cuales degradaron materia orgánica, así como BSR en biopelícula y suspendidas en el reactor que oxidaron materia orgánica en presencia de sulfato.

Por otro lado, el análisis de los valores de pH del efluente en los cuatro reactores; 6.47, 6.38, 7.40 y 7.42 en RA, RB, RC y RD, respectivamente, demostraron que en los cuatro reactores se logró incrementar el valor de pH ácido (pH 5.5) inicial hasta un valor neutro del efluente por la alcalinidad producida en los sistemas. Pese a que en los cuatro reactores hubo producción de alcalinidad, existió diferencia en la concentración de alcalinidad producida. La alcalinidad de bicarbonato en los reactores RA y RB (operados a TRH de 1 día) fue 3 veces menor que la alcalinidad producida en RC y RD. La producción de alcalinidad en el sistema ayuda a neutralizar la acidez del efluente, el cual tiende a disminuir su pH por el acetato acumulado. De acuerdo con la literatura, el valor de la constante de disociación (pKa) del ácido acético es 4.8 (a 25°C), por lo que a un valor de pH menor que el pKa se favorece la presencia de la forma ácida protonada (CH<sub>3</sub>COOH) en solución, mientras que a pH mayores al pKa predomina la especie no protonada (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Esta última especie puede formar ácido acético al acumularse en el efluente, lo que disminuiría el pH del mismo (Gallegos-García, 2009). En los reactores LFFD operados en el presente trabajo, de acuerdo al pH de sus efluentes, el acetato probablemente estaba en su forma desprotonada con la posibilidad de que su acumulación favoreciera la formación de ácido acético y

por ende disminuyera el pH del medio, lo cual se ha reportado como un factor inhibitorio en la eficiencia de una biopelícula (Reis *et al.*, 1990; Kaksonen *et al.*, 2003a,b). En este entendido, la producción de alcalinidad debida a la degradación de la materia orgánica en los reactores cobró relevancia en la neutralización del efluente.

De manera general, de acuerdo a la Tabla 6.2, el mejor desempeño en cuanto a remoción de DQO y la más alta eficiencia de remoción de sulfato se logró en el reactor RD, que degradó 69.8% de la DQO y 66.1% del sulfato presentes, mostrando la influencia de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  y del TRH en el desempeño adecuado de un reactor sulfato-reductor. Este resultado concuerda con el estudio de Velasco *et al.* (2008) quienes reportaron 94% de remoción de sulfato y 87% de remoción de etanol (materia orgánica) en un reactor UASB operado a una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2.5; no obstante, es importante notar que los valores obtenidos por Velasco y cols., se lograron después de aumentar gradualmente la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.67 a 2.5 en un período de 110 días.

### **6.3 Desarrollo y desempeño de las biopelículas de los reactores LFFD**

El buen funcionamiento de un reactor de lecho fluidificado, en general, y de un reactor LFFD, en particular, se basa en el desarrollo adecuado de una biopelícula sobre el material de soporte, tanto en cantidad de biomasa adherida como en actividad de la misma, esta última íntimamente ligada con la estructura y diversidad microbiana presente en la biopelícula. Por esta razón es de suma importancia evaluar la formación y desempeño de las biopelículas en el arranque y durante el transcurso de la operación de los reactores. El presente trabajo se enfocó precisamente a evaluar el desempeño de la biopelícula en el período de arranque de los reactores. La figura 6.8 muestra las velocidades de producción de sulfuro obtenidas en las biopelículas a diferente tiempo de operación de los reactores, así como los sólidos suspendidos que lograron inmovilizarse sobre el soporte (determinados en ensayos en lote). También, se muestra con fines comparativos, la velocidad de producción de sulfuro del lodo que se inoculó en los reactores. La velocidad de producción de sulfuro con los diferentes substratos

utilizados (lactato, acetato, acetato-lactato 70:30%, H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> y etanol) mostraron variabilidad durante la formación de biopelículas en los cuatro reactores. De la misma manera, la cantidad de biomasa inmovilizada sobre el material de soporte se mostró variable y con un comportamiento particular en cada reactor LFFD. En las siguientes secciones se describirán detalladamente estos resultados.

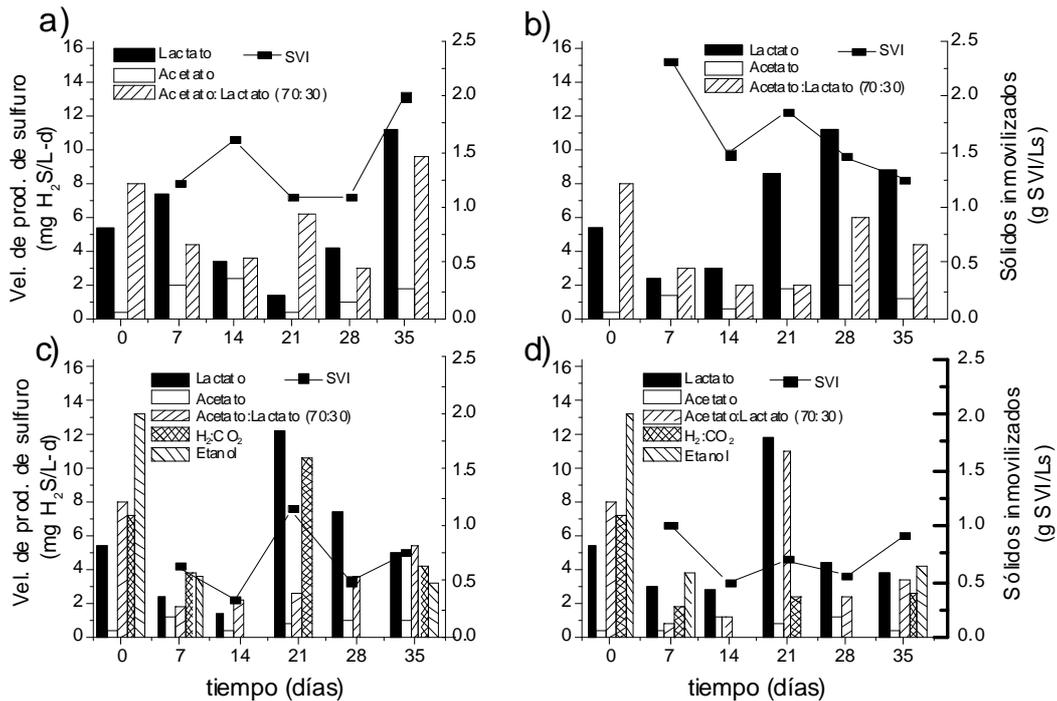


Figura 6.8 Velocidad de producción de sulfuro (mg H<sub>2</sub>S/L-d) cuantificada en el inóculo (tiempo 0) y en las biopelículas formadas a diferentes días de operación de los reactores, y la concentración de sólidos inmovilizados (SVI/Ls) (■) en los reactores RA (a), RB (b), RC (c), RD (d).

### 6.3.1 Perfiles de velocidad de producción de sulfuro por las biopelículas

En general se observa que las muestras de las biopelículas colectadas a diferentes tiempos de operación de los cuatro reactores, mostraron mayores velocidades de producción de sulfuro con lactato como sustrato que en presencia de acetato (Figura 6.8). El lactato fue utilizado preferentemente por las BSR en las biopelículas de los reactores RA y RB, como lo demuestran las velocidades de

producción de sulfuro; valores superiores a 10 mg H<sub>2</sub>S/L-d a los 35 días de operación (Figs. 6.8a y b). Estos valores fueron también más altos que el nivel de producción de sulfuro con lactato alcanzado por el inóculo (5.5 mg H<sub>2</sub>S/L-d) lo que indica enriquecimiento en las biopelículas de las BSR que producen sulfuro a partir de lactato o incremento de la actividad de las BSR presentes.

La velocidad de producción de sulfuro a partir de acetato fue baja en las cuatro biopelículas (valores entre 0.4 y 1.9 mg H<sub>2</sub>S/L-d); sin embargo, cabe destacar que ésta nunca se perdió por completo a lo largo del tiempo de experimentación. La baja velocidad de producción de sulfuro con acetato como sustrato indicó que éste no fue la fuente de carbono principal, de igual manera indica que las BSR capaces de oxidar el acetato no fueron inmovilizadas en la biopelícula, posiblemente debido a la escasa presencia de BSR capaces de utilizar el acetato en el inóculo utilizado y la menor energía relativa que éstas pueden obtener a partir de la oxidación de acetato en comparación con la oxidación del lactato (Kaksonen y Puhakka, 2007). Al final de la operación de los reactores (día 35), las velocidades de producción de sulfuro con acetato fueron menores en las biopelículas de los reactores RC y RD (Figs. 6.8 c y d) que en las biopelículas obtenidas de los reactores al operar a 1 día de TRH (Figs. 7.8 a y b), una cuestión atribuible probablemente a la interacción competitiva entre los microorganismos metanogénicos y las BSR, en donde muy probablemente los microorganismos metanogénicos se vieron favorecidos.

De manera adicional a los sustratos utilizados para determinar la velocidad de producción de sulfuro en RA y RB (acetato, lactato y acetato-lactato 70:30%), también se evaluó la capacidad de producir sulfuro de las biopelículas desarrolladas en los reactores RC y RD a partir de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> y etanol, estos sustratos también se usaron para evaluar la actividad del lodo granular con que fueron inoculados. Los resultados demostraron la presencia de BSR a los 7 y 35 días en las biopelículas de los reactores RC y RD que utilizaron H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> produciendo sulfuro a una velocidad entre 3.5 y 4.0 mg H<sub>2</sub>S/L-d (Figs. 6.8 c y d); sin embargo, este valor fue la mitad de la velocidad obtenida en el inóculo, lo que indicó que las BSR hidrogenotróficas no fueron enriquecidas, aunque lograron

permanecer en estas biopelículas. Shabir *et al.* (2008), menciona que en la mayoría de los sistemas anaerobios el H<sub>2</sub> está disponible como sustrato para los microorganismos como los homoacetogénicos o BSR que consuman H<sub>2</sub>. Sin embargo, en el presente trabajo, el hecho de que no se enriquecieran BSR hidrogenotróficas en las biopelículas se atribuye a que la alimentación de los reactores con la mezcla acetato-lactato (70:30%) aclimató a los microorganismos a esos sustratos preferentemente, además de que termodinámicamente es más factible el proceso de sulfato-reducción a partir de lactato que a partir de H<sub>2</sub>, y que no todas las BSR que consumen lactato o acetato consumen H<sub>2</sub> (Rabus *et al.*, 2006; Tahuer *et al.*, 2007), más que a la competencia de los homoacetogénicos por el H<sub>2</sub> debido a que en el presente trabajo se documentó como nulo este proceso.

Aunque el inóculo mostró la velocidad de producción de sulfuro más alta con etanol (Figs. 6.8 c y d), la comunidad de la biopelícula del reactor RD alcanzó tan solo 4.2 mg H<sub>2</sub>S/L-d como velocidad máxima a los 35 días (Fig. 6.8 d). Esta baja velocidad de producción de sulfuro a partir de etanol o de la mezcla H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> puede ser atribuida a la selección de microorganismos causada por los sustratos utilizados en la alimentación (acetato y lactato). Aunado a esto, de acuerdo con la tabla 2.2, aunque la mayoría de las BSR que pueden oxidar etanol logran oxidar al lactato, existe mayor diversidad de BSR capaces de utilizar con eficiencia lactato como sustrato que de utilizar etanol, además de que la energía libre de Gibbs que se obtiene en la reacción favorece ligeramente el proceso de sulfato-reducción con lactato como sustrato en comparación con etanol, lo que indica que las BSR obtienen mayor energía al usar lactato que al usar etanol por la mayor cantidad de electrones que puede donar dicho sustrato (Tabla 2.1).

### **6.3.2 Perfiles de biomasa adherida al soporte en los reactores LFFD**

El desarrollo de la biopelícula en los cuatro reactores se evaluó mediante la cuantificación de la cantidad de biomasa inmovilizada sobre el material de soporte a lo largo del tiempo. En la figura 6.8 se muestran los valores de biomasa inmovilizada a tiempos similares de operación de los cuatro reactores LFFD (7, 14,

21, 28 y 35 días). Los valores obtenidos de biomasa inmovilizada sobre el soporte fueron variables al paso del tiempo en los cuatro reactores LFFD; sin embargo, en los reactores RA y RB se logró mayor cantidad de biomasa inmovilizada sobre el soporte que en los reactores RC y RD, esto es, de 1.0 a 2.3 g SVI/Ls como valores mínimo y máximo, respectivamente, obtenidos en el primer par de reactores, y valores desde 0.3 hasta 1.1 g SVI/Ls en el segundo. De manera adicional, se observa que los días en que se obtuvieron mayores valores de velocidad de producción de sulfuro por la biopelícula no correspondieron precisamente a los días en que se lograron los valores de mayor cantidad de biomasa adherida al soporte, por lo que no se puede hablar de una relación directa entre el incremento de biomasa que formó la biopelícula y el incremento de la actividad de la misma.

El periodo pseudo-estable de los cuatro reactores LFFD en que la biomasa lavada del reactor se estabilizó en valores bajos se logró en los últimos 7 días de operación de los reactores de manera general, y es en este periodo donde se observa el comportamiento estable y en aumento en cuanto a la biomasa inmovilizada en los reactores LFFD, excepto en el reactor RB en el cual la concentración de biomasa inmovilizada se mantuvo. En los reactores LFFD se alcanzaron valores finales de biomasa inmovilizada sobre el soporte de 1.9, 1.4, 1.0 y 0.9 g SVI/Ls para RA, RB, RC y RD, respectivamente (Fig. 6.8 a, b, c y d). Estos resultados demostraron que el TRH de 1 día permitió la adhesión de más biomasa sobre el material de soporte en comparación del TRH de 2 días. Al respecto Cresson *et al.* (2008) encontró que en términos de crecimiento de la biopelícula, un reactor de biopelícula operado a un TRH corto de un día logró 4.5 veces más concentración de biopelícula durante su fase de arranque que un reactor operado a valores más altos de TRH debido a que el TRH corto limitó el desarrollo de la biomasa suspendida en el líquido del sistema y favoreció su lavado, lo que evitó que esa biomasa planctónica compitiera con la biopelícula por los substratos disponibles y por consiguiente pudiera participar en la remoción de éstos.

La razón por la que aún cuando en los reactores operados a un TRH de un día se logró inmovilizar más biomasa sobre el soporte y mayores velocidades de

producción de sulfuro, y no así mayores eficiencias de remoción de DQO en comparación con los reactores operados a TRH de 2 días, puede atribuirse a que además de la biomasa adherida al soporte, la biomasa planctónica contribuyó a la remoción de DQO de los reactores operados a TRH de 2 días. De la misma manera, la menor concentración de SVI en el soporte de los reactores operados a TRH de 2 días pero mayor eficiencia de remoción de DQO en esos reactores apoya esta aseveración. Por su parte, Cresson *et al.* (2008) encontró que en el desempeño global de un reactor de biopelícula, una estrategia de lavado temprano de biomasa (al operar el reactor a TRH de 1 día) permitió que se alcanzara más eficiencia global del reactor, es decir, mayor producción de biogás (55% del carbono orgánico en el reactor) y menor porcentaje de AGV (7.3% del carbono orgánico del reactor), en comparación con la estrategia de arranque del reactor en que los valores de TRH altos favorecieron el desarrollo de la biomasa planctónica, con la que se obtuvo que 45% del carbono total del sistema constituyó el metano presente. Dichas diferencias muestran que el TRH influye en las eficiencias de tratamiento alcanzadas en un reactor; sin embargo, no al grado en el que las diferencias entre ambas estrategias se reflejan en el desarrollo de la biopelícula. Se especula que el factor TRH está más implicado en el desarrollo de la biomasa más que en su actividad en sí.

De manera general, se puede decir que el desempeño global de los reactores LFFD fue la suma del desempeño de su biopelícula y del desempeño de la biomasa planctónica que permaneció dentro del reactor. Este desempeño demostró que el TRH influye en la remoción de DQO debido que al tener una baja concentración de biomasa en el reactor se requiere mayor tiempo para metabolizarlo eficientemente.

### **6.3.3 Actividades específicas de las biopelículas**

Como puede observarse en las tablas 6.3 y 6.4, las ASR logradas por las biopelículas fueron mayores que las AME obtenidas. En cuanto a la ASR, los valores más altos de actividad al final de la operación de los reactores (8.2, 10.11, 3.91 y 2.39 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d de los reactores RA, RB, RC y RD,

respectivamente) fueron obtenidos a partir de lactato como sustrato, mientras que los menores (1.37, 1.37, 0.77 y 0.27 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d de los reactores RA, RB, RC y RD, respectivamente) fueron logrados con acetato (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Actividades sulfato-reductoras específicas (g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d) del inóculo y de las biopelículas al final de la operación de los reactores LFFD.

	<b>inóculo</b>	<b>RA</b>	<b>RB</b>	<b>RC</b>	<b>RD</b>
Lactato	0.12	8.20	10.11	3.91	2.39
Acetato	0.01	1.37	1.37	0.77	0.27
Ace:Lac	0.18	7.02	5.13	4.22	2.15
H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub>	0.16	n.d.	n.d.	3.20	1.67
Etanol	0.30	n.d.	n.d.	2.44	2.65

n.d.: no determinada

Tabla 6.4 Actividades metanogénicas específicas (g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d) del inóculo y de las biopelículas al inicio y al final de la operación de los reactores LFFD con acetato como sustrato.

	<b>inóculo</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 35</b>
RA	0.08	0.51	1.08
RB	0.08	0.22	1.57
RC	0.08	0.80	1.08
RD	0.08	0.51	0.82

Para los cinco sustratos ensayados, la ASR de las biopelículas de los reactores fue mayor que las actividades obtenidas con el inóculo, siendo mucho mayor la diferencia entre la ASR del inóculo y las biopelículas en el caso de lactato en comparación con los otros cuatro sustratos evaluados. Esto demostró el enriquecimiento en las biopelículas de BSR preferentemente capaces de consumir lactato. Aunque la ASR a partir de acetato obtenida en los cuatro reactores fue baja, cabe señalar que se eliminó completamente, lo que permite afirmar que estuvieron presentes BSR acetoclásticas en estos sistemas a lo largo del tiempo.

En este estudio, se logró una ASR final por la biopelícula del reactor RA de 8.20 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d al utilizar lactato como sustrato, lo cual es similar al valor de la ASR con lactato reportada por Celis-García *et al.* (2007) de 6 g DQO-

H<sub>2</sub>S/g SVI-d, la cual fue obtenida con biopelícula de un reactor LFFD a los 35 días de operación en continuo con un periodo previo de 45 días en lote.

Por otro lado, la AME acetoclástica en los reactores RA, RB, RC y RD al término de los experimentos fue de 1.08, 1.57, 1.08 y 0.82 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d, respectivamente. Al comparar la AME acetoclástica determinada de los reactores RA y RB con la ASR obtenida con acetato como substrato (Tabla 6.3 y 6.4, respectivamente), se observa que probablemente había una competencia por el substrato entre las BSR y los microorganismos metanogénicos. Considerando que la AME alcanzada por los reactores RC y RD, fue superior a la ASR obtenida por los mismos, se puede decir que los microorganismos metanógenos acetoclásticos se vieron favorecidos en la biopelícula de los reactores operados a TRH de 2 días. Por su parte, Gallegos *et al.* (2009) y Celis *et al.* (2009) reportaron baja y ausencia de AME, respectivamente, en un reactor LFFD sulfidogénico. De manera adicional se comprobó la ausencia de actividad homoacetogénica en los reactores RC y RD, ya que se determinó que después de 15 días, el volumen de metano producido (menos de 0.05 mL) estuvo por debajo del límite de detección del cromatógrafo.

#### **6.4 Sólidos volátiles inmovilizados al final de la operación de los reactores LFFD**

La formación de la biopelícula se evaluó mediante los valores de biomasa inmovilizada sobre el material de soporte en el reactor. Al final de la operación de cada reactor LFFD se obtuvieron los siguientes valores: 1.9, 1.4, 1.0 y 0.9 g SVI/Ls para RA, RB, RC y RD, respectivamente (Fig. 6.9). Estos resultados mostraron que un TRH de 1 día permitió la adhesión de más biomasa sobre el material de soporte en comparación con un TRH de 2 días. Este resultado concuerda con los hallazgos de Cresson *et al.* (2006), quienes reportaron alrededor de 2 g/L de sólidos volátiles adheridos en un material de soporte después de 35 días de operación en un reactor metanogénico de lecho turbulento inverso operado a TRH de 1 día. Según estos autores, la operación de un reactor de biopelícula a un TRH corto permite el lavado de la biomasa suspendida en el reactor; misma que puede competir con los microorganismos adheridos. De acuerdo con la figura 6.9, la

máxima cantidad de biomasa adherida se logró en el reactor RA (1.9 g SVI/Ls), siguiéndole los reactores RB, RC y RD.

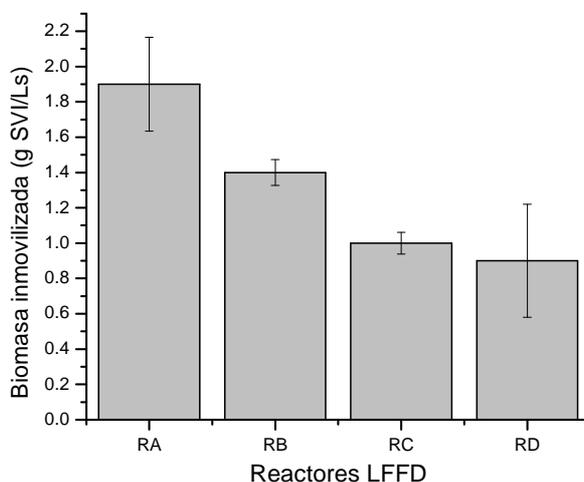


Figura 6.9 Cantidad de sólidos volátiles inmovilizados sobre el soporte (g SVI/Ls) por los cuatro reactores LFFD al día final de su operación.

Estos resultados mostraron que un TRH de 1 día permitió la adhesión de más biomasa sobre el material de soporte en comparación con un TRH de 2 días. Este resultado concuerda con los hallazgos de Cresson *et al.* (2006), quienes reportaron alrededor de 2 g/L de sólidos volátiles adheridos en un material de soporte después de 35 días de operación en un reactor metanogénico de lecho turbulento inverso operado a TRH de 1 día. Según estos autores, la operación de un reactor de biopelícula a un TRH corto permite el lavado de la biomasa suspendida en el reactor; misma que puede competir con los microorganismos adheridos. De acuerdo con la figura 6.9, la máxima cantidad de biomasa adherida se logró en el reactor RA (1.9 g SVI/Ls), siguiéndole los reactores RB, RC y RD.

La mayor cantidad de biomasa adherida sobre el soporte alcanzada en los reactores RA y RB en comparación con RC y RD indicó que el TRH de 1 día favoreció la formación de la biopelícula en los reactores. Sin embargo, al asociar estos resultados a los valores de producción de sulfuro obtenidas por las biopelículas (Sección 6.3.1) en donde se presentó que RA y RB obtuvieron, en general, mayor velocidad de producción de sulfuro que RC y RD, se puede decir

que en los primeros dos reactores la biomasa adherida al soporte fue activa en términos de producción de sulfuro. En el caso particular de la biopelícula formada al día 21 de operación del reactor RD (Fig. 6.8d), en que a pesar de que tenía menor concentración de SVI que la del reactor RB al mismo tiempo de operación (Fig. 6.8b), la primera muestra mayor velocidad de producción de sulfuro a partir de lactato, permite especular que el crecimiento de una biopelícula no indica precisamente en todos los casos mayor actividad sulfato-reductora de la misma, si no que la velocidad con la que la biopelícula metaboliza los substratos depende de su composición microbiana. Por su parte, hubo ocasiones en que se lograron cuantificar valores altos de SVI (alrededor de 1.5 g SSV/Ls) en el soporte pero la velocidad de producir sulfuro fue baja (alrededor de 3 mg H<sub>2</sub>S/L-d) lo cual se observó a los 14 días de operación de los reactores RA y RB (Figs. 6.8 a y b). Esto indicó que probablemente parte de esa biomasa adherida al soporte no poseía la capacidad de producir sulfuro. Es importante recalcar que el desarrollo de una biopelícula sobre un soporte a lo largo del tiempo es un proceso dinámico durante el cual se desprende parte de la biopelícula; las causas por las cuales ocurre el desprendimiento pueden ser diversas. Durante los experimentos se observaron variaciones en la concentración de biomasa adherida y suspendida, así como en la cantidad de sólidos suspendidos en el efluente. Debido a la configuración del reactor, se observó que la velocidad de recirculación del líquido para lograr la fluidificación impactó en la concentración de SSV en el efluente, ya que la biomasa desprendida por la fluidificación del lecho, en ocasiones, era arrastrada hacia el separador de fases y eventualmente se perdía. Sin embargo, a pesar de dichas variaciones, la producción de biopelícula alcanza cierta estabilidad que en un periodo largo de tiempo puede considerarse como pseudo-estable.

Cabe señalar que la cantidad de biopelícula formada en el reactor RA es comparable con otros datos reportados en la literatura. En este estudio se logró 1.9 g SVI/Ls al día 35 de operación de un reactor LFFD, lo cual mejora la cantidad de biopelícula formada en un reactor LFFD reportado con antelación por Celis *et al.* (2009) quienes lograron 0.8 g SVI/Ls al día 33 de operación en continuo de un

reactor LFFD y es similar a lo obtenido por Gallegos *et al.* (2009) (1.46 g SVI/Ls al día 293 de operación en continuo de un reactor LFFD con previo arranque en lote de 45 días) y por Celis-García *et al.* (2009) (2.5 g SVI/Ls al día 55 de operación en continuo de un reactor LFFD con previa operación en lote de 30 días). La gran ventaja que ofrece el presente trabajo en comparación con estos 2 últimos estudios mencionados es la anulación del prolongado periodo de operación en lote al arrancar el reactor LFFD.

### **6.5 Discusión integrante del comportamiento de los reactores LFFD y sus respectivas biopelículas.**

Los cuatro reactores LFFD se alimentaron con sulfato y la mezcla acetato-lactato (70:30%), dado que se pretendía con esta estrategia enriquecer y forzar el establecimiento de BSR capaces de consumir acetato desde el inicio de la operación de los reactores. En todos los casos la fuente de biomasa fue la misma, no obstante, hubo diferencia tanto en la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  como en el TRH utilizados, por lo que las diferencias en el comportamiento de los cuatro reactores entre sí, se pueden atribuir a las diferencias en estas condiciones operacionales que a su vez condicionaron la estructura de la comunidad microbiana desarrollada en los reactores responsable del consumo de DQO y sulfato (Figura 2.1).

El hecho de que en los reactores operados hubiera consumo de DQO y ASR en base a acetato y lactato indicó que microorganismos responsables de esta actividad y que provenían inicialmente del inóculo permanecieron en los reactores al adherirse sobre el soporte y formar una biopelícula. Es importante señalar que las BSR retenidas en los reactores pudieron ser BSR capaces de llevar a cabo la oxidación completa del lactato a dióxido de carbono, pero también pudieron ser las BSR que solamente tienen la capacidad de oxidar el lactato a acetato como las del género *Desulfovibrio* (Widdel, 1988). En este sentido, es importante señalar que la diferencia metabólica entre los dos tipos de BSR se debe a las diferencias enzimáticas entre estos grupos. De acuerdo con Tahuer *et al.* (1989) y Rabus *et al.* (2006), de manera general, para ambos grupos de BSR, la oxidación de sustrato se lleva a cabo mediante una ruta bioquímica en la que el sustrato

(lactato) es convertido a piruvato y subsecuentemente a acetil-Coenzima A. A partir de este compuesto, una fosfotransacetilasa genera acetato. La carencia de la enzima citrato liasa en las BSR que oxidan incompletamente el sustrato impide que el acetato ingrese al ciclo de Krebs para oxidarse a dióxido de carbono.

Aunado a la ruta bioquímica de sulfato-reducción, de la cual se ha hablado previamente, teóricamente es posible que se llevara a cabo la fermentación de los AGV presentes en el reactor, dando origen a compuestos más simples como acetato, dióxido de carbono e hidrógeno por la acción de los microorganismos acetogénicos. En los experimentos de actividades metabólicas desarrollados en este trabajo no se comprobó la presencia de microorganismos fermentativos; sin embargo, el análisis molecular permitirá comprobar si éstos existieron en los reactores.

Otro proceso bioquímico que existió en los reactores LFFD fue la metanogénesis, es decir, la formación de metano y dióxido de carbono a partir del acetato presente en la alimentación inicial en los reactores y el acetato generado a partir de la oxidación incompleta de lactato, o bien, a partir del hidrógeno y dióxido de carbono mediante microorganismos autótrofos (Visser, 1995), lo cual se comprobó con la presencia de AME a partir de acetato en los reactores (Tabla 7.3) e indirectamente por los resultados de consumo de acetato en los reactores LFFD (Tabla 6.2)

Por otro lado, existe otra ruta metabólica de síntesis de acetato que pudo estar implicada en la baja conversión de DQO en los reactores y en los valores bajos de ASR con acetato como sustrato, ésta se conoce como homoacetogénesis, es decir, la generación de acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Dicho proceso no se documentó en el presente trabajo, por lo que se requieren más experimentos para corroborarlo.

Por último y no así menos importante, se comprobó la presencia de las BSR hidrogenotróficas como parte de la comunidad microbiana de los reactores RC y RD, las cuales generaron sulfuro de hidrógeno y dióxido de carbono a partir de hidrógeno y dióxido de carbono como donador de electrones y fuente de carbono, respectivamente.

De manera general, se encontró que la comunidad microbiana establecida dentro de los reactores LFFD estuvo compuesta por BSR que consumieron lactato, hidrógeno y acetato, metanógenos y posiblemente bacterias fermentativas, lo cual se comprobó mediante el análisis molecular.

## **6.6 Análisis de la comunidad microbiana**

### **6.6.1 Concentración de ADN de los inóculos, de las biopelículas y de los líquidos de reactor**

El análisis de la comunidad microbiana se realizó con base en los siguientes procedimientos secuenciales: extracción de ADN, amplificación del ADN extraído, perfil de DGGE y análisis de las secuencias. Se logró la amplificación del ADN extraído de los lodos granulares que se usaron para inocular los reactores RA y RB (I1) y RC y RD (I2). Además, se amplificó el ADN de 12 muestras de líquido y 20 muestras de biopelícula de los 4 reactores.

Los geles de agarosa que confirman la amplificación del ADN de los extractos se muestran en la figura 6.10. En ésta se muestra que todos los productos de PCR obtenidos presentaron una longitud similar de pares de bases (aproximadamente 600 pares de bases) como era de esperarse por el par de oligonucleótidos utilizados.

Previo a la elaboración del perfil de DGGE se determinó la concentración de ADN en las muestras con el objetivo de conocer la cantidad de ADN disponible para el análisis por DGGE. En la misma determinación, el equipo NanoDrop calculó los índices 260/280 y 260/230; valores que permiten establecer si el ADN cuantificado es puro, es decir, se encuentra libre contaminantes como proteínas y ácidos húmicos, carbohidratos o solventes orgánicos, respectivamente (Tabla 6.5). De manera general, en la tabla 6.5 se observa que las concentraciones de ADN en las muestras incrementaron conforme aumentó el tiempo de muestreo de las biopelículas. Las muestras identificadas con un asterisco fueron obtenidas mediante la técnica de PCR convencional, mientras que el resto se obtuvieron mediante PCR anidada. Las muestras que se obtuvieron mediante PCR convencional se purificaron con etanol-agua al 70-30% (v/v) y se eluyeron en

aproximadamente 15  $\mu$ L de agua, mientras que las obtenidas mediante PCR anidada se concentraron mediante centrifugado hasta un volumen final de aproximadamente 20  $\mu$ L.

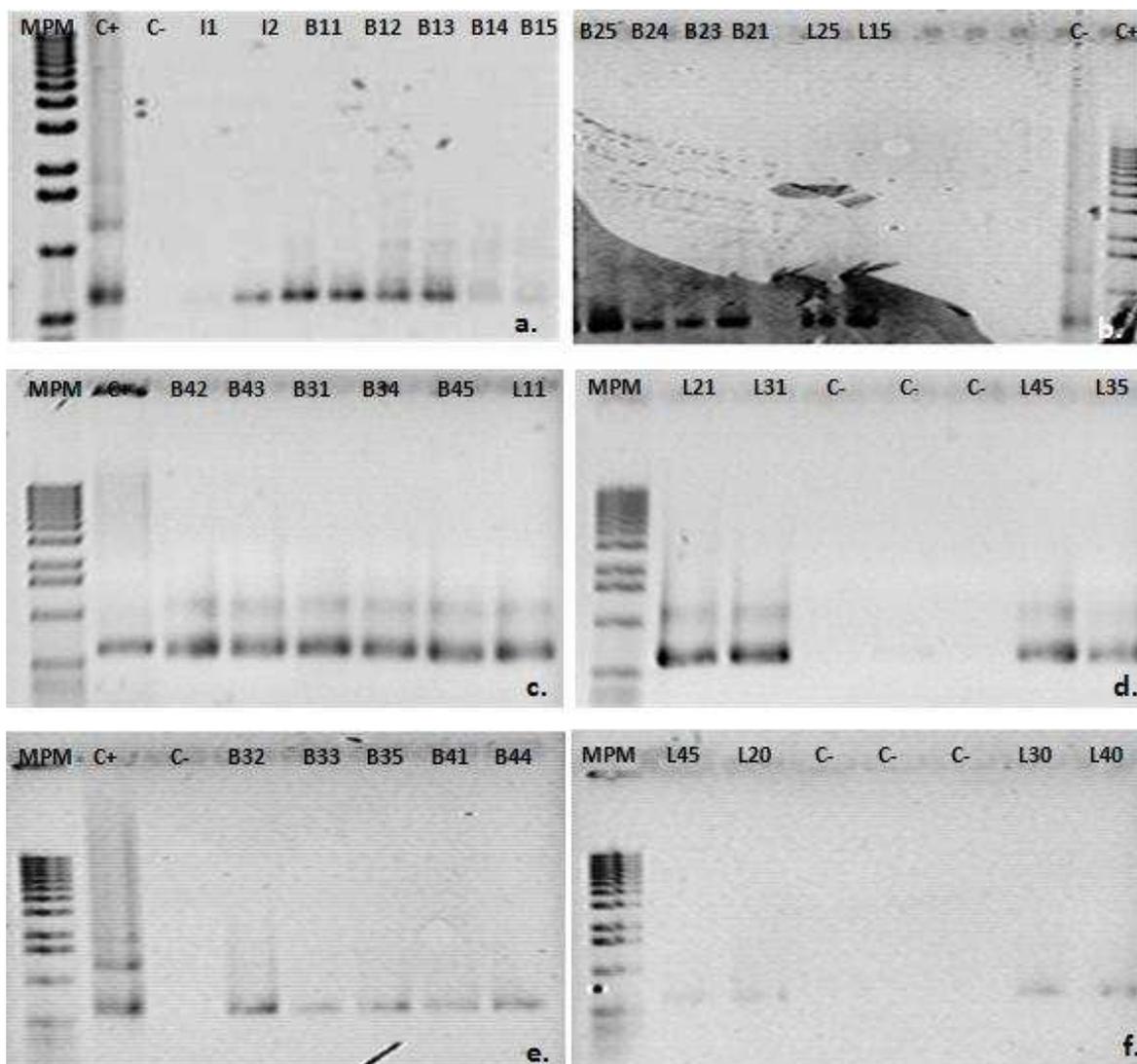


Figura 6.10 Geles de agarosa de los productos de PCR de las muestras de inóculos, biopelículas y líquidos de reactor. La identificación de las muestras es la siguiente: C+: control positivo de PCR; C-: control negativo de PCR; I1: inóculo de RA y RB; I2: inóculo de RC y RD. L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después la letra indica el reactor (1=RA, 2=RB, etc.), el segundo número indica el día en que se tomó la muestra a partir de la inoculación: 0= 0 días, 1= 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5= 35 días.

Tabla 6.5 Concentración de ADN de los productos de PCR.

Identificación de la muestra	Concentración (ng/uL)	Relación 260/280	Relación 260/230
I1	247.42	1.71	1.65
I2	924.89	1.91	2.24
L10	1572.32	1.83	2.15
L11	1571.73	1.84	2.20
L15*	303.76	1.84	2.11
L20	1394.24	1.85	2.16
L21	2096.57	1.83	2.20
L25	199.61	1.84	2.11
L30	1205.86	1.86	2.21
L31	1706.24	1.84	2.19
L35	1793.23	1.81	2.15
L40	1018.42	1.87	2.07
L41	1873.87	1.83	2.17
L45	1264.25	1.85	2.20
B11*	99.25	1.81	2.07
B12*	119.90	1.82	2.11
B13*	131.59	1.86	2.02
B14*	178.25	1.86	2.13
B15*	105.06	1.84	2.12
B21*	123.17	1.77	2.17
B22*	184.33	1.85	2.15
B23*	129.32	1.74	2.22
B24*	126.65	1.70	2.15
B25*	170.02	1.83	2.19
B31	1730.38	1.79	2.23
B32	1348.3	1.86	2.09
B33	1274.7	1.85	2.11
B34	1744.84	1.82	2.15
B35	1277.47	1.85	2.12
B41	1347.49	1.86	2.11
B42	1608.85	1.81	2.15
B43	1778.43	1.81	2.17
B44	2880.93	1.82	2.12
B45	1803.01	1.83	2.11

La clave para la identificación de las muestras es la misma que la usada en la figura 6.10. \* indica productos de PCR obtenidos mediante PCR convencional.

De acuerdo con los valores de concentración de ADN, las muestras obtenidas por PCR anidada y concentradas mediante la técnica de centrifugación mostraron valores mayores de concentración de ADN en comparación con las amplificadas mediante PCR convencional.

En el análisis de las relaciones 260/280 y 260/230 se observó que la relación 260/280 fue mayor que 1.7 en todas las muestras, mientras que la relación 260/230 fue mayor que 2, excepto para la muestra I1. La primera relación indicó que no se encontró contaminación por proteínas en las muestras de ADN, mientras que la segunda señaló que sólo el ADN en la muestra I1 no se encontraba puro. En esta muestra, el índice 260/230 menor que 2 pudo deberse a la presencia de ácidos húmicos que en principio se encontraban en el lodo granular y que permanecieron en el extracto de ADN y posteriormente en el producto de PCR, o a la presencia de cloroformo que se utilizó durante la extracción del ADN. Al respecto Yeates *et al.* (1998) señalaron que los ácidos húmicos interfieren en la cuantificación de ADN debido a que éstos presentan absorbancia tanto a 230 nm como a 260 nm, siendo la última utilizada en la cuantificación del ADN, por lo que una relación 260/230 menor que 2 presume contaminación por ácidos húmicos; por su parte, una relación 260/280 menor que 1.7 sugiere contaminación por proteínas.

### **6.6.2 Perfiles de DGGE**

A partir del fragmento de PCR de 560 pares de bases de ADN de cada muestra se realizó el perfil de DGGE con el objetivo de conocer los cambios en la comunidad microbiana de los reactores a través del tiempo. En las figuras 6.11, 6.12 y 6.13 se muestran los perfiles de DGGE obtenidos a partir del ADN amplificado de las biopelículas, del inóculo y de las muestras de líquido de los 4 reactores. Cada carril corresponde a una muestra del experimento (inóculo, líquido de reactor o biopelícula) que se tomó a un tiempo específico de la operación de los reactores, y cada banda en el carril, en teoría, corresponde al filotipo de una población microbiana desarrollada en el reactor (Dabert *et al.*, 2002).

Cabe señalar que el día en que se tomaron las muestras para el perfil de DGGE se retiró soporte del reactor para el análisis del desarrollo de las biopelículas (actividades metabólicas y biomasa inmovilizada sobre el soporte). La intensidad de cada banda indica mayor abundancia del filotipo al cual corresponde la banda (Morales *et al.*, 2005; Juang *et al.*, 2009), por lo que las bandas tenues demuestran una cantidad escasa de ADN, mientras que las bandas más gruesas demuestran mayor cantidad de ADN.

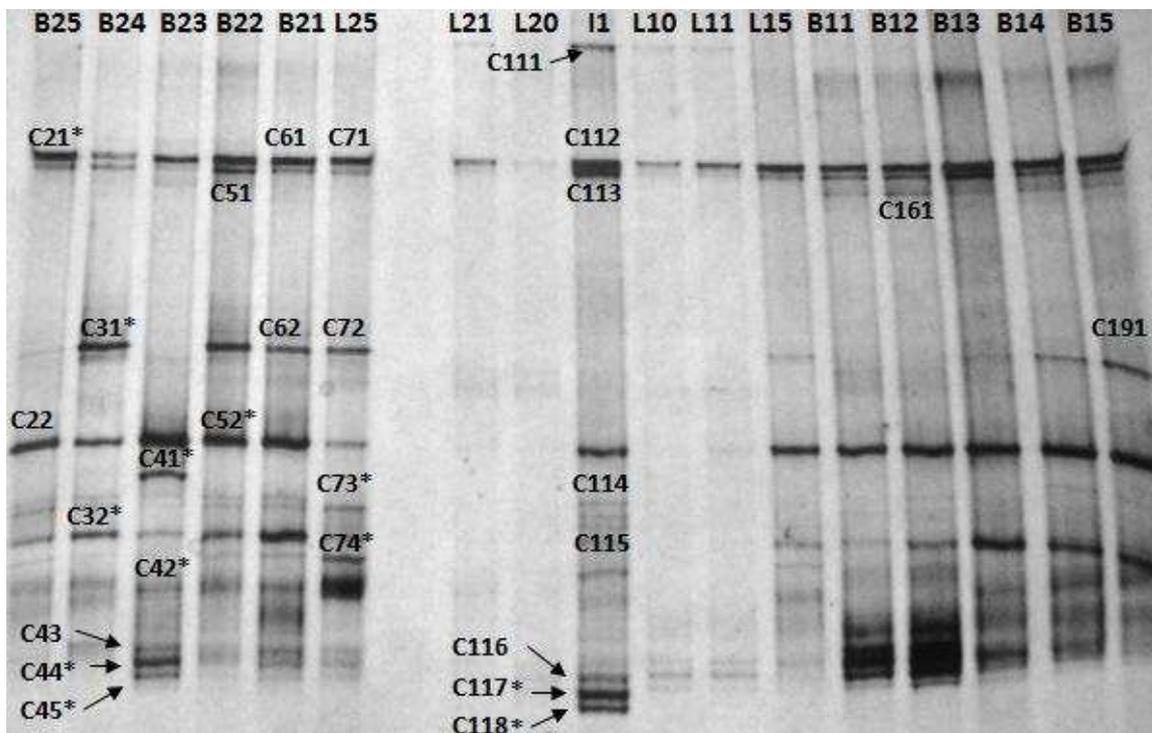


Figura 6.11 Perfil de DGGE del gen ARNr 16s de los reactores LFFD RA y RB. La identificación de las muestras es la siguiente: I1: inóculo de RA y RB; L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después de la letra indica el reactor (1=RA, 2=RB); el segundo indica el día en que se tomó la muestra: 0= 0 días, 1= 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5= 35 días. Los códigos en las bandas indican las bandas que se cortaron. El asterisco indica las bandas que se lograron secuenciar.

En las figuras 6.11-6.13 se puede observar que existen diferencias entre la distribución, número e intensidad de las bandas en los diferentes carriles de los perfiles de DGGE, lo que indicó que la comunidad microbiana fue distinta para

cada muestra. Las bandas identificadas con una letra y números en las figuras 6.11-6.13 fueron las bandas elegidas para su posterior reamplificación y secuenciación debido a que eran las más definidas e intensas y se conservaban en los carriles. En total se cortaron 80 bandas de las cuales se logró la reamplificación de 72, mismas que se enviaron a secuenciar con un proveedor externo de este servicio (McLab, San Francisco, California).

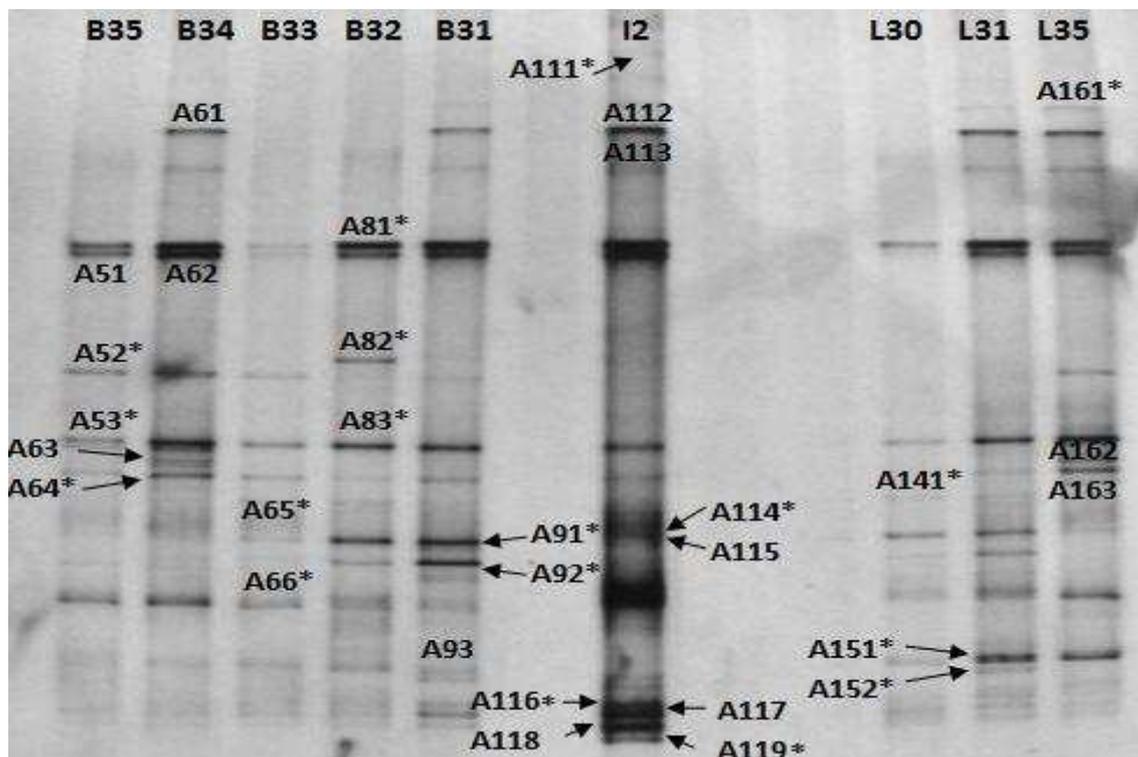


Figura 6.12 Perfil de DGGE del gen ARNr 16s del reactor LFFD RC. La identificación de las muestras es la siguiente: I2: inóculo; L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después de la letra indica que la muestra corresponde al reactor RC. El segundo número indica el día en que se tomó la muestra: 0= 0 días, 1= 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5= 35 días. Los códigos en las bandas indican las bandas que se cortaron. El asterisco indica las bandas que se lograron secuenciar.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon con las secuencias contenidas en la base de datos del NCBI (Gen-Bank) con el objetivo de identificar

las afiliaciones taxonómicas que correspondían con mayor porcentaje de similitud a dichas bandas. En las tablas 6.6-6.8 se presentan las afiliaciones taxonómicas de la secuencia parcial del gen ARNr 16S obtenidas de Gen-Bank que corresponden a las bandas de interés de los geles de DGGE.

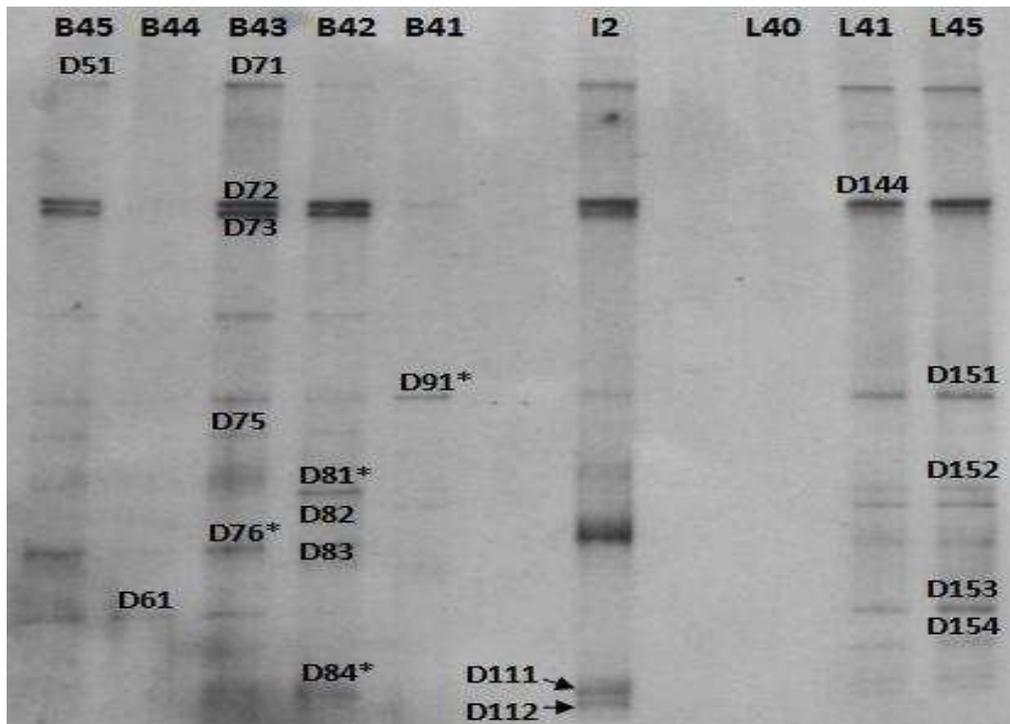


Figura 6.13 Perfil de DGGE del gen ARNr 16s del reactor LFFD RD. La identificación de las muestras es la siguiente: I2: inóculo; L: líquido de reactor; B: biopelícula. El primer número después de la letra indica que la muestra corresponde al reactor RD. El segundo indica el día en el que se tomó la muestra: 0= 0 días, 1= 7 días, 2 = 14 días, 3 = 21 días, 4 = 28 días, 5= 35 días. Los códigos en las bandas indican las bandas que se cortaron. El asterisco indica las bandas que se lograron secuenciar.

La gran diversidad de microorganismos no cultivados presentados en estas tablas obedece al hecho de que hasta este momento la mayoría de los microorganismos en muestras ambientales o en comunidades complejas no han sido asilados ni obtenidos en cultivos puros, principalmente por la carencia de un medio de cultivo que represente de manera ideal las condiciones ambientales en

que se desarrollan estos microorganismos de manera natural, razón por la cual en la actualidad, la identificación microbiológica se basa mayoritariamente en técnicas moleculares (Fernández *et al.*, 2008).

Tabla 6.6 Afiliación taxonómica de las secuencias del gen bacteriano ARNr 16S de las bandas cortadas del gel de DGGE de los reactores RA y RB.

<b>Banda</b>	<b>Secuencia con la más alta similitud en GenBank (BLASTN), origen (No. acceso)</b>	<b>Similitud (%)</b>
C21	Bacteria no cultivada clon ZnB7, reactor sulfidogénico que trata agua residual con Zn (EU780384)	97
C31	Bacteria no cultivada clon FBR2, reactor de lecho fluidificado con actividad sulfuro oxidante (AY263716)	96
C52	Procariota no cultivada clon NiB8, reactor sulfidogénico para recuperar Fe y Ni (EU921658)	99
C41	Bacteria no cultivada clon R3B3H, reactor EGSB anaerobio operado a temperatura menor a 15°C (GQ423835)	99
C73	Bacteria no cultivada clon EUB8-2, lodo granular utilizado en tratamiento de agua residual (AY693826)	98
C32	<i>Lactococcus sp.</i> TP2MN, bio-reactor de membrana que trata agua residual (GU272384)	100
C74	<i>Acinetobacter sp.</i> WP2MN, bio-reactor de membrana que trata agua residual (GU272398)	100
C42	Bacteria no cultivada clon R1p15, lodo granular con capacidad de oxidar ácidos grasos (AF482433)	95
C44	<i>Aquabacterium sp.</i> MZQ-LS01, tratamiento de agua para beber (GQ407265)	99
C45	Bacteria del género <i>Burkholderia</i> no cultivada clon I, lodo residual de una industria papelera (GU212141)	99
C117	Bacteria no cultivada clon 44c, digestor anaerobio que trata agua residual de una industria química (FJ462104)	96
C118	<i>Desulfovibrio sp.</i> L7, reactor sulfidogénico alimentado con donadores de electrones simples (EF055877)	99

En la figura 6.11 en el carril identificado como I1, que corresponde a la muestra del lodo con que fueron inoculados los reactores RA y RB, se observa un perfil de bandas distinto al que se obtuvo en los otros carriles del gel, que corresponden tanto a las muestras de biopelículas (identificadas con una letra B)

como a las muestras líquidas del reactor (identificadas con la letra L). En general, se observó que el perfil de bandas de la muestra del inóculo de los reactores RA y RB (Fig. 6.11, carril I1) presentó ocho bandas características de 560 pares de bases pero de secuencia de nucleótidos distinta, ya que las bandas se encontraban en distinta posición dentro del gradiente del gel.

Tabla 6.7 Afiliación taxonómica de las secuencias del gen bacteriano ARNr 16S de las bandas cortadas del gel de DGGE del reactor RC.

<b>Banda</b>	<b>Secuencia con la más alta similitud en GenBank (BLASTN), origen (No. acceso)</b>	<b>Similitud (%)</b>
A111	<i>Chloroflexi</i> no cultivada clon QEEA3BD11 (CU918803)	96
A52	Bacteria no cultivada recuperada de DGGE de la banda a2, lodo granular anaerobio (HM006712)	100
A82	Bacteria no cultivada clon FBR2 gen 16S ARNr, reactor de lecho fluidificado con actividad sulfuro oxidante (AY263716)	98
A83	Procariota no cultivada clon NiB8, reactor sulfidogénico para recobrar Fe y Ni (EU921658)	97
A53	Bacteria no cultivada recuperada de DGGE de la banda a19, biopelícula de un reactor sulfato-reductor (HM006707)	98
A64	Bacteria no cultivada clon DtB37, lodo granular de un reactor UASB que trata agua residual de una industria de alimentos (AB291518)	99
A141	Bacteria del filo <i>Bacteroidetes</i> no cultivada clon QEDN1CC10, lodo de un digestor anaerobio mesofílico que trata agua residual municipal (CU926960)	100
A65	Bacteria no cultivada clon R3B3H, reactor EGSB anaerobio operado a temperatura menor a 15°C (GQ423835)	99
A91	<i>Lactococcus</i> sp. TP2MN, bio-reactor de membrana que trata agua residual (GU272384)	100
A92	<i>Acinetobacter</i> sp. WP2MN, bio-reactor de membrana que trata agua residual (GU272398)	100
A66	<i>Clostridium</i> sp. no cultivada clon C10, reactor anaerobio de biomasa inmovilizada (EF221807)	98
A151	<i>Comamonas testosteroni</i> clonWWC-C5ALMO31 (GU428955)	100
A152	Bacteria no cultivada clon EEOTU32, reactor anaerobio que trata agua residual de una industria de bebida (HM346821)	100
A119	<i>Desulfovibrio</i> sp. S14PV-2008, sedimento (AM946979)	97

Tabla 6.8 Afiliación taxonómica de las secuencias del gen bacteriano ARNr 16S de las bandas cortadas del gel de DGGE del reactor RD.

<b>Banda</b>	<b>Secuencia con la más alta similitud en GenBank (BLASTN), origen (No. acceso)</b>	<b>Similitud (%)</b>
D91	Procariota no cultivada clon NiB8, reactor sulfidogénico para recobrar Fe y Ni (EU921658)	99
D81	<i>Lactococcus sp.</i> TP2MN, bio-reactor de membrana que trata agua residual (GU272384).	98
D76	<i>Clostridium sp.</i> no cultivada clone C10, reactor de biopelícula (EF221807)	99
D61	<i>Acidovorax caeni</i> cepa R-24607, lodo activado desnitrificante (AM084011)	98
D84	<i>Chloroflexi</i> no cultivada clon QEDQ1AD03, lodo de un digestor anaerobio mesofílico que trata agua residual municipal (CU923169)	97

De acuerdo con la base de datos del NCBI (GenBank), en dicha muestra de lodo granular se identificaron los siguientes microorganismos: una bacteria no cultivada clon ZnB7 recuperada por Dar *et al.* (2009) de un reactor sulfidogénico que trataba agua residual con Zn, la cual correspondió a la banda C112 (ó C21) misma que se conservó en las biopelículas y muestras de líquido de los reactores RA y RB; una procariota no cultivada clon NiB8 recuperada por Bijmans *et al.* (2009) de un reactor sulfidogénico utilizado para recuperar Fe y Ni (banda C114 ó C52); *Acinetobacter sp.* WP2MN obtenida de un reactor de tratamiento de agua residual (banda C115 ó C74), una bacteria no cultivada encontrada en un digestor anaerobio que trataba agua residual de una industria química (banda C117) y la bacteria *Desulfovibrio sp.* L7 aislada de un reactor sulfidogénico alimentado con donadores de electrones simples (banda C118) (Dar *et al.*, 2007). De acuerdo con la literatura, la mayoría de los microorganismos identificados en esta muestra de lodo son similares a microorganismos que ya se habían identificado en lodo granular o de digestores anaerobios, entre ellos los de carácter sulfato-reductor.

Por su parte, las muestras de biopelículas de los reactores RA y RB mostraron más número de bandas y mayor intensidad de las mismas que las

muestras correspondientes a los líquidos del reactor. En las figuras 6.12 y 6.13 se observó que los reactores RC y RD mostraron un perfil similar.

Al observar los carriles L11 y B11 en la figura 6.11 correspondientes a muestras de líquido y biopelícula respectivamente, tomadas a los 7 días del reactor RA, se observa una banda muy oscura en la parte superior (identificada como C112 en el carril I1). La intensidad de esta banda aumentó al pasar de B11 a B15, lo que indicó que conforme transcurrió el tiempo de operación del reactor RA, la población que corresponde a este filotipo se estableció más en la biopelícula. Dicha población fue identificada con un 97% de identidad como una bacteria no cultivada clon ZnB7 recuperada de un reactor sulfidogénico que trataba agua residual con Zn (Dar *et al.*, 2009). En los líquidos de este reactor estuvo presente este tipo de bacteria (carriles L10, L11 y L15) aunque en menor intensidad que en la biopelícula, lo que refiere que parte de esta población se encontraba como biomasa suspendida en el reactor debido al mecanismo natural de formación de biopelículas, adhesión-crecimiento-desprendimiento, y que por lo tanto eventualmente salió del reactor.

Un caso similar de enriquecimiento y subsistencia de una población en el reactor sucedió con la procariota no cultivada clon NiB8 reportada por Bijmans *et al.* (2009) de un reactor sulfidogénico utilizado para recuperar Fe y Ni la cual tuvo 99% de similitud a la banda identificada con la clave C52 (Fig. 6.11, carril B22), ésta estuvo presente en el inóculo y permaneció en el reactor RA, principalmente en la biopelícula y en el líquido al tiempo final de operación del reactor (carril L15).

La banda C115 (ó C32 en el carril B24) estuvo presente en el inóculo con baja intensidad, de la misma manera que en el líquido del reactor al día 35 (L15), no obstante su enriquecimiento en la biopelícula fue notorio al incrementar la intensidad de la banda de B11 a B15.

La banda C191 (Fig. 6.11, carril B15) que es la misma que la banda C31 de este gel, correspondió con un 96% de similitud a la bacteria no cultivada clon FBR2 recuperada de un reactor de lecho fluidificado con actividad sulfuro oxidante (Cytryn *et al.*, 2005). Al no estar identificada completamente esta bacteria, no es posible conocer con exactitud sus características metabólicas, debido a que en un

reactor sulfo-oxidante podrían existir tanto microorganismos capaces de oxidar los compuestos azufrados como aquellos capaces de reducirlos y entre estos últimos se encuentran las BSR (que reducirían el sulfato producto posible de la oxidación del sulfuro). En el reactor RA, la banda C191 (ó C31) no se observó en el inóculo ni el líquido del reactor o la biopelícula de las primeras dos semanas de operación del reactor, lo cual puede atribuirse a la muy baja cantidad en que seguramente se encontraba presente este microorganismo en dichas muestras; sin embargo, a partir de la tercera semana de operación del reactor ésta comenzó a enriquecerse.

Por su parte, la banda C111 en el carril I1 no permaneció en el reactor anclada en el soporte dado que no se presentó en los carriles correspondientes a la biopelícula, aunado a esto, esta banda se observa muy tenue en los carriles del líquido al inicio de la operación del reactor. A pesar que dicha banda no logró identificarse en la base de datos del NCBI, su presencia en algunos carriles del DGGE del reactor RA, permite deducir que esta población en particular no tenía o era casi nula su capacidad de formar biopelícula por lo que permaneció en el líquido del reactor terminando por lavarse del mismo, o bien, que los microorganismos que representan esta banda y que pudieron formar biopelícula se habían desprendido del soporte por las condiciones hidrodinámicas. Al contrario de la banda C111, la banda C113 no se presentó en el líquido de reactor aunque sí en la biopelícula. De manera general, en el reactor RA se encontraron microorganismos no cultivados pero con la capacidad de producir sulfuro, a los cuales se les atribuye el proceso de sulfato-reducción suscitado.

Por otro lado, del carril correspondiente a I1 hacia la izquierda se presenta el perfil de DGGE del reactor RB (Fig. 6.11). En este reactor la banda C111 tuvo el mismo comportamiento que en el reactor RA; no se presentó en la biopelícula pero sí en el líquido del reactor de la primera semana de operación. La población de la banda C112, que corresponde a una bacteria no cultivada clon ZnB7 recuperada de un reactor sulfidogénico que trataba agua residual con Zn (Dar *et al.*, 2009) con un 97% de identidad se estableció paulatinamente en este reactor tanto en su líquido como en su biopelícula. En el caso del perfil de esta biopelícula, la intensidad de dicha banda disminuyó en la cuarta semana de operación del

reactor, y debido a que en esa misma semana disminuyó la cantidad de sólidos inmovilizados sobre el soporte, se puede especular que esta bacteria eventualmente pudo ser desprendida del soporte y se eliminó del reactor por el efluente.

La población correspondiente a la banda C113 (ó C51) no fue identificada; sin embargo, es posible observar que logró enriquecerse en el reactor RB adherida al soporte aunque no en forma de biomasa suspendida en el reactor. De manera similar a lo ocurrido en el perfil del reactor RA con la banda C191 (ó C31), en el perfil del reactor RB la banda C191 (bacteria no cultivada clon FBR2) se presentó tanto en algunas muestras del líquido como de biopelícula, no así en el inóculo con el que se trabajó en este reactor. A diferencia del comportamiento de esta banda en el reactor RA, en el reactor RB se presentó desde el inicio de la operación del reactor como parte de la biopelícula aunque en las semanas tres y cinco no se apreció en el gel. Por su parte, los microorganismos correspondientes al ADN recuperado de las bandas C114 y C32 (Fig. 6.11, carril B24) permanecieron en el reactor RB principalmente como parte de la biopelícula, al igual que el microorganismo correspondiente a la banda identificada como C32. De manera adicional, se identificó al género *Burkholderia* (bacteria de lodo residual de una industria papelera) con un 99% de similitud con la banda C45 como parte de la comunidad microbiana del reactor RB, principalmente en la biopelícula formada a la tercera semana de operación (Fig. 7.11, carril B23).

En la parte inferior del carril del I1 se aprecian tres bandas más de secuencia diferente (C116, C117 y C118). Las dos últimas correspondieron a una bacteria no cultivada clon 44c recuperada de un digestor anaerobio que trataba agua residual de una industria química y a *Desulfovibrio sp.* L7 encontrada en un reactor sulfidogénico alimentado con donadores de electrones simples (Dar *et al.*, 2007), respectivamente. Debido a que estas bandas se presentaron nuevamente en los carriles de las biopelículas de los reactores RA y RB, principalmente, se deduce que los microorganismos correspondientes a las mismas presentan la capacidad de adhesión al material de soporte.

La figura 6.12 presenta el gel de DGGE del reactor RC. En la parte central de la figura se observa el carril I2, el cual corresponde a la muestra del lodo granular con que se inoculó este reactor, mientras que hacia la derecha de la figura se encuentran los carriles de las muestras del líquido del reactor a los tiempos de muestreo previamente mencionados, y hacia el lado izquierdo se presentan los carriles de las muestras de la biopelícula.

En el carril del inóculo (Fig. 6.12) se presentaron 13 bandas características, a diferencia de lo obtenido en la muestra del inóculo de los reactores RA y RB (I1 en la figura 6.11) esto demuestra que el inóculo del reactor RC se logró identificar una población más diversa, cuestión atribuible al mayor tiempo que pasó el lodo granular en acondicionamiento dentro del reactor semilla UASB (previo a la inoculación de los reactores LFFD RC y RD). Entre los microorganismos identificados en este inóculo podemos mencionar a *Chloroflexi* no cultivada (Tabla 7.6) que correspondió a la banda A111 con un 100% de similitud (Riviere *et al.*, 2009); una procariota no cultivada encontrada en un reactor sulfidogénico que correspondió a la banda A83 con un 97% de similitud (Tabla 6.6) y *Desulfovibrio* sp. S14PV-2008, la cual presentó un 97% de similitud con la banda A119 (Tabla 6.6). De manera general, el inóculo de los reactores RC y RD se conformó de varios de tipos de microorganismos, por lo que la actividad metabólica presente fue variada pero con predominancia de metabolismo sulfato-reductor; no obstante, géneros no sulfato-reductores como *Chloroflexi*, se hicieron presentes en este lodo granular.

La mayoría de las diferentes poblaciones microbianas identificadas en el inóculo lograron permanecer dentro del reactor RC en la primera semana de su operación (Fig. 6.12, carriles B31 y L31). Tal aseveración está basada en la cantidad y distribución de bandas en estos carriles comparados con el carril I2. Entre estas bandas podemos citar a las denominadas A91 y A92 que correspondieron con un 100% de similitud a una especie del género *Lactococcus* y a una especie del género *Acinetobacter*, respectivamente (ambas encontradas en un bio-reactor de membrana que trataba agua residual). Estas poblaciones microbianas permanecieron en el reactor para la segunda semana de operación, a

lo cual se agregó la bacteria no cultivada clon FBR2 recuperada de un reactor de lecho fluidificado con actividad sulfuro oxidante, misma que correspondió a la banda A82 con un 98% de similitud. Cabe señalar que en el carril correspondiente a la semana siguiente de operación del reactor (Fig. 6.12, carril B33) se observa menor intensidad de las bandas, lo que indicó que pudo haber ocurrido lavado de células del reactor o desprendimiento de gran cantidad de células adheridas al soporte. La figura 6.5c respalda esta afirmación debido a que para este periodo se obtuvo el valor más bajo de sólidos volátiles inmovilizados en el soporte del reactor (0.4 g SVI/Ls).

En los carriles de las muestras de la biopelícula a las últimas dos semanas de operación del reactor RC se presentó una diversidad de bandas, de la cual se pueden identificar en común las siguientes: A61 del carril B34 (que es igual a A112 en el carril I2), A62, A64 y A66 del carril B34, así como A51 del carril B35. De éstas, la banda A64 correspondió con un 99% de similitud a una bacteria no cultivada clon DtB37 recuperada del lodo granular obtenido de un reactor UASB que trataba agua residual de una industria de alimentos (Narihito *et al.*, 2009) y la banda A66 correspondió con un 98% de similitud a una especie del género *Clostridium* obtenida por Duarte *et al.* (2010) de un reactor de biomasa inmovilizada. Adicionalmente, se pudieron identificar en la biopelícula de este reactor a una bacteria no cultivada recuperada de lodo granular en un reactor con sulfato y ácidos grasos (Flores-Aguilar, 2010), misma que fue en un 100% similar a la banda A52, y una bacteria no cultivada recuperada de un DGGE de una biopelícula de un reactor sulfato-reductor (Flores-Aguilar, 2010) que correspondió a la banda A53 con un 98% de similitud.

Como en el líquido del reactor RC se observó diversidad de bandas en el último día de operación (Fig. 6.12, carril L35), se puede atribuir parte del desempeño de este reactor a la biomasa suspendida que se encontraba dentro de él en ese tiempo, aunado al desempeño de su biopelícula. La población microbiana que formó parte de dicha biomasa suspendida estuvo compuesta por el ADN de las bandas A64, A66, A151 A152 (Tabla 6.6) así como por microorganismos del género *Bacteroidetes* (banda A141 en el carril L30) el cual se

conforma de microorganismos anaerobios fermentativos. Los microorganismos correspondientes a las bandas A161, A51, A162 y A163 presentes en el líquido del reactor no fueron identificados.

El perfil de DGGE del reactor RD se muestra en la figura 6.13. El carril I2 corresponde a la muestra del inóculo del reactor RD (inóculo similar al que se utilizó para el reactor RC); en este carril se aprecian 7 bandas características. Según el perfil de los carriles B41 y L41, la mayor parte de la biomasa dentro del reactor a su primera semana de operación se encontró en forma de biomasa suspendida, debido a que en el carril B41 sólo se observa claramente una banda (D91), la cual fue identificada con un 99% de similitud con la procariota no cultivada clon NiB8 obtenida de un reactor sulfidogénico utilizado para recobrar Fe y Ni (Bijmans *et al.*, 2009). Pese a que el DGGE de este reactor sólo reveló esta banda en el carril B41, es probable la coexistencia de otras poblaciones adheridas al soporte en menor cantidad, de las que pudo no haberse extraído satisfactoriamente su ADN por la baja cantidad en que se encontraban. A partir de la segunda semana de operación del reactor (Fig. 6.13, carril B42) incrementó la diversidad de las poblaciones microbianas inmovilizadas sobre el soporte (bandas D72, D73, D74, D91, D75, D81, D82, D83 y D84). La banda D81 fue identificada con 98% de similitud con dos especies del género *Lactococcus*, mientras que la banda D84 fue similar en un 97% a un microorganismo no cultivado del género *Chloroflexi* el cual fue identificado en un reactor anaerobio mesófilo de tratamiento de agua residual municipal (Riviere *et al.*, 2009).

En la tercera semana de operación en continuo (Fig. 6.13, carril B43) la comunidad microbiana establecida en la biopelícula fue similar a la población desarrollada hasta la segunda semana de operación del reactor. De manera adicional, se identificó en dicha muestra con un 99% de similitud con la banda D76 a una especie no cultivada del género *Clostridium*, la cual fue reportada por Riviere *et al.* (2009) como un microorganismo involucrado en procesos de la digestión anaerobia.

Por su parte, en la muestra de la biopelícula de la siguiente semana de operación del reactor RD (Fig. 6.13, carril B44) fue posible identificar claramente a

la población correspondiente al filotipo de la banda D61. Según la base de datos del NCBI, esta banda fue en un 98% similar al microorganismo *Acidovorax caeni* que se encontró en un lodo desnitrificante (Osaka *et al.*, 2006; Heylen *et al.*, 2006). De manera adicional se logra observar en este carril una banda muy tenue a la misma altura que la banda D91 (Fig. 6.13, carril B41), la cual corresponde con un 99% de similitud a una procariota no cultivada (clon NiB8) identificada en un reactor sulfidogénico utilizado para recobrar Fe y Ni. A pesar de que en esta muestra de biopelícula sólo se logró identificar a este microorganismo con actividad sulfato-reductora, la concentración de sulfuro producido y de sulfato consumido en dicho reactor (Figura 6.6a) demuestran su presencia.

Al término de la operación del reactor RD se encontraron ancladas en el soporte las poblaciones correspondientes a las bandas D51 (ó D71), D72, D73, D76 y D61, de las cuales se identificaron una especie fermentadora y una desnitrificante de los géneros *Clostridium* y *Acidovorax*, respectivamente, así como una procariota involucrada en un reactor anaerobio sulfidogénico (que correspondió a la banda D91). La identificación de microorganismos con metabolismo fermentativo y sulfato-reductor en esta muestra de biopelícula demostró la diversidad microbiana que conformó la biopelícula del reactor RD.

En el caso de las muestras de los líquidos de este reactor, tanto al inicio como al término de la operación del mismo, se encontraron las poblaciones microbianas de las bandas D71, D144 (ó D72), D151 (ó D91), D152 (ó D81) y D153 (ó D61), las cuales formaron parte de la biomasa planctónica de este bio-reactor. Como ya se mencionó, la banda D91 correspondió con un 99% de similitud a una procariota no cultivada obtenida de un reactor sulfidogénico. La presencia de este microorganismo en el líquido del reactor durante y al final de su operación indicó que parte de la biomasa planctónica poseía la capacidad de reducir el sulfato, lo cual confirmó la importancia de la biomasa planctónica en el funcionamiento exitoso de un bio-reactor. El microorganismo de la banda D81 que fue identificado en la biopelícula de este reactor, y que posee un metabolismo fermentativo también se encontró en el líquido, lo que lo señala como clave en la remoción de materia orgánica.

Por otro lado, existe en la literatura información de las características fisiológicas y metabólicas de los géneros bacterianos que se identificaron en las comunidades microbianas del lodo granular inoculado y de las desarrolladas en los reactores (Holt *et al.*, 2000), lo que respalda su presencia en esos sitios. A continuación se presentan algunas características importantes de los géneros bacterianos identificados en las muestras de lodo granular, biopelícula y líquidos de los reactores de este estudio.

El género *Chloroflexi* está formado por bacterias verdes no azufradas. Se les considera aerobias facultativas con la capacidad de obtener energía mediante el proceso de fotosíntesis sin la consecuente producción de oxígeno. Bajo condiciones anaerobias son primeramente fotoheterótrofos, mientras que en presencia de oxígeno son quimioheterótrofos; en ambas condiciones se pueden alimentar de substratos orgánicos como el acetato. Este género estuvo presente en las biopelículas de los reactores RC y RD, principalmente, en donde pudieron alimentarse del acetato presente. Por su parte, en la literatura se han reportado especies filamentosas de *Chloroflexi* como parte de la ecología microbiana de plantas de tratamiento de agua residual (Kragelund *et al.*, 2007), en lodo granular de digestores anaerobios (Chouari *et al.*, 2005; Roest, 2007; Freeman *et al.*, 2008; Talbot *et al.*, 2008) y como parte de biopelículas sulfato-reductoras formadas a partir de lodo granular (Kaksonen *et al.*, 2004b; Celis *et al.*, 2009).

El género *Acinetobacter* se compone en parte de microorganismos cocobacilos no fermentadores de respiración aerobia que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza sobreviviendo a expensas de fuentes de carbono a su disposición. Este género forma parte de la biota normal de la piel. Aunque se les conoce ampliamente como microorganismos aerobios, algunos reportes mencionan a este género como aerobio/microaerofílico (Vieira *et al.*, 2003). Aunado a los compuestos orgánicos que pueden degradar, tales como fenol, benzoato, aminoácidos y algunos constituyentes del lodo residual de aceites, por ejemplo, alcanos y compuestos de nitrógeno, azufre y oxígeno (NSO), los microorganismos de este género logran remover compuestos inorgánicos como metales pesados y fósforo. Algunas cepas de *Acinetobacter* son capaces de

oxidar etanol y algunas especies el lactato, además de que la mayoría poseen la capacidad de producir variedad de polisacáridos extracelulares, mismos que le confieren la capacidad de formar biopelículas (Abd-El-Haleem, 2003). Este microorganismo puede consumir acetato bajo condiciones aerobias (Van Loosdrecht *et al.*, 1997). El hecho de que el reactor semilla UASB del que se extrajo el lodo para inocular a los reactores LFFD fue alimentado en un 50% con etanol, 25% con lactato y 25% con acetato pudo haber propiciado la presencia de microorganismos de este género en el lodo granular, mismos que permanecieron principalmente en la biopelícula del reactor RA por su capacidad de generar polisacáridos extracelulares. Se ha reportado la presencia del género *Acinetobacter* como parte de la comunidad microbiana de los lodos activados de una planta de tratamiento aerobia-anaerobia para la remoción de fosfato (Wagner *et al.*, 1994), en reactores continuos en donde, después de haber sido aislado de una planta de tratamiento de aguas residuales, esta bacteria sobrevivió bajo condiciones anaerobias (Boswell *et al.*, 2001), así como en el lodo granular aerobio (Juang *et al.*, 2010) y lodo granular de un reactor UASB que trataba aguas residuales de una industria de gelatina (Vieira *et al.*, 2003).

Otro género bacteriano que se encontró en la muestra del inóculo de los reactores LFFD operados fue *Desulfovibrio*, que es un grupo de microorganismos sulfato-reductores estrictamente anaerobio con la capacidad de oxidar a los substratos orgánicos de manera incompleta a acetato en presencia de sulfato, sulfito o tiosulfato como aceptor terminal de electrones (Madigan *et al.*, 1997). Algunos substratos sobre los que crecen los microorganismos de este género son malato, lactato, alcoholes primarios (metanol, etanol, propanol y butanol), glicerol y algunos aminoácidos. Su desarrollo óptimo se presenta a temperaturas alrededor de 30°C, aunque pueden crecer a temperaturas menores (Rabus *et al.*, 2006; Tahuer *et al.*, 2007). La presencia de lactato y etanol en el medio de alimentación del reactor semilla, así como la presencia de hidrógeno en el reactor permitieron el desarrollo de este género en el inóculo que posteriormente pasó a formar parte de las biopelículas de los reactores RA, RB y RC. Algunos representantes del género *Desulfovibrio* se han reportado por otros autores como parte de la comunidad

microbiana de reactores sulfato-reductores formando biopelícula sobre un soporte. Al respecto, se han identificado microorganismos sulfato-reductores de este género en un reactor fluidificado alimentado con lactato y etanol (Kaksonen *et al.*, 2004b; Celis *et al.*, 2009), mientras que Morales *et al.* (2005) encontraron al género *Desulfovibrio* como parte de la diversidad bacteriana de un reactor de columna operado con un DAM artificial.

En los reactores RC y RD operados se identificó a un integrante del género *Clostridium*. Cabe señalar que según la literatura, el género *Clostridium* es un género de bacterias anaerobias capaces de formar esporas localizadas ampliamente en el ambiente, que son capaces de fermentar varios substratos, por ejemplo algunos carbohidratos como la glucosa, para producir ácidos orgánicos y alcoholes; sin embargo, en el proceso de digestión anaerobia participan como acetógenos (Zhao *et al.*, 2008; Celis *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010), razón por la cual se les puede atribuir a éstos parte del consumo de DQO por microorganismos no sulfato-reductores que se presentó en los reactores LFFD. Por lo anterior, el género *Clostridium sp.* pudo jugar un rol de cooperación con las BSR en el proceso de sulfato-reducción del inóculo y de las biopelículas de los reactores RC y RD al participar como microorganismo fermentador de lactato generando etanol, propionato o acetato que pudieron ser utilizados posteriormente por BSR o microorganismos metanogénicos en el caso del acetato (Zhao *et al.*, 2008).

Las bacterias del género *Lactococcus* son anaerobias facultativas fermentadoras que logran sobrevivir en un rango variado de pH (4.8 a 9.6) y soportan ambientes ácidos de alrededor de pH 5.0. Son quimiorganótrofos con metabolismo fermentativo. Consumen carbohidratos y ácidos orgánicos por excelencia, por lo que su ubicación principal es en ambientes relacionados a productos lácticos; no obstante, se ha demostrado su aislamiento de fuentes ambientales como suelo y efluentes (Klijn *et al.*, 1995). Al respecto se puede citar al microorganismo del género *Lactococcus* que se encontró como parte de la comunidad microbiana de los reactores LFFD de este estudio.

Otro tipo de microorganismo involucrado en el desempeño del reactor RC fue una especie del género *Comamonas*. Estas bacterias pertenecen al grupo de

las Proteobacterias y son aerobios estrictos no fermentativos que crecen en medios que contienen ácidos orgánicos, por lo que en el reactor RC pudo participar como degradador de los ácidos orgánicos presentes. Específicamente, la especie *C. testosteroni* de este género, se ha reportado como parte de procesos de lodo activado (Willems y De Vos, 2006), en reactores de sulfo-oxidación (Cytryn *et al.*, 2005), así como en reactores anaerobios sulfato-reductores (Flores-Aguilar, 2010), siendo este último un sistema de naturaleza semejante al reactor LFFD trabajado en este estudio. Un género ampliamente relacionado con el género *Comamonas* por sus características filogenéticas es el género *Aquabacterium*. Este último se identificó como parte de la comunidad microbiana de la biopelícula del reactor RB. Previamente, Kalmbach *et al.* (1999) reportaron a *Aquabacterium* como un microorganismo formador de una biopelícula sobre partículas de polietileno en un sistema de agua para beber.

Por su parte, el género *Acidovorax* incluye microorganismos quimiorganotróficos los cuales oxidan compuestos de carbono en presencia de oxígeno. Ciertas bacterias de este género presentan crecimiento de tipo litoautotrófico al ser capaces de utilizar el H<sub>2</sub> como fuente de energía, y alternativamente algunas cepas son capaces de llevar a cabo la desnitrificación heterotrófica de nitrato. Miembros del género *Acidovorax* se encontraron presentes en una biopelícula desarrollada bajo condiciones microaerófilas en donde también se encontraban presentes bacterias sulfato-reductoras (Okabe *et al.*, 2003).

La identificación molecular de los microorganismos presentes en los reactores LFFD demostró una comunidad microbiana más diversa en los reactores operados a TRH de 2 días (RC y RD), la cual se conformó en común por los géneros *Desulfovibrio* y otras bacterias recuperadas de reactores sulfidogénicos, *Chloroflexi*, *Clostridium*, *Lactococcus* y bacterias de la familia *Comamonanaceae*. En el caso de los reactores operados a TRH de un día, la comunidad microbiana que logró establecerse fue menos heterogénea, la cual incluyó a *Desulfovibrio*, géneros de bacterias recuperados de reactores sulfidogénicos, así como *Lactococcus*. Aunque el análisis molecular de la comunidad microbiana realizado

no permitió identificar microorganismos metanogénicos debido a se utilizó un par de oligonucleótidos para amplificar ADN de miembros del dominio bacteria y no del dominio *Arquea*, dentro del cual se encuentran las *Arqueas* metanógenas (Roest, 2007), los resultados de las AME del inóculo y de los reactores, así como el balance de consumo de substratos en los reactores demostraron la presencia de estos microorganismos como consumidores del acetato presente.

Las diferencias en la comunidad microbiana desarrollada en función de las diferentes relaciones  $DQO/SO_4^{2-}$  que se trabajaron en los reactores mostró que a  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.67 (reactores RA y RC) se enriquecieron bacterias con la capacidad de producir sulfuro; sin embargo, a una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2.5 (reactores RB y RD), además de las bacterias sulfato-reductoras, se desarrollaron bacterias con la capacidad de degradar la materia orgánica presente sin utilizar el sulfato, tales como los géneros *Lactococcus* en los reactores RB y RD, así como *Acinetobacter* en el reactor RB y *Clostridium* y *Chloroflexi* en el reactor RD.

El hallazgo de microorganismos con la capacidad de producir sulfuro demuestra el proceso de sulfato-reducción en los reactores, mientras que la identificación de microorganismos como los pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Chloroflexi*, así como *Comamonas testosteroni* que se han reportado como aerobios, microaerofílicos o anaerobios facultativos indicó que pudo existir en los reactores un ambiente microaerofílico producto de oxígeno que podría haber ingresado al reactor por la entrada del afluente.

## 7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 7.1 Conclusiones

El desempeño de los cuatro reactores LFFD y los valores de las actividades sulfato-reductoras específicas logradas por sus respectivas biopelículas permitieron elucidar cuales son las condiciones de operación que permiten un arranque de reactor mas óptimo y desarrollo eficiente de la biopelícula.

Se logró un arranque exitoso de los cuatro reactores LFFD operados, al tener un equilibrio entre la biomasa lavada tempranamente (lo que disminuyó la competencia de ésta con la biopelícula) y la formación de la biopelícula sobre el soporte con un corto periodo de operación en lote (12-24 h) y en un corto periodo de tiempo de operación en continuo y (35 días).

Se logró un arranque más eficiente en términos de eficiencias de remoción de DQO y  $\text{SO}_4^{2-}$  al operar el reactor LFFD a una relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 2.5 y TRH de 2 días, es decir, a las condiciones operacionales aplicadas al reactor RD.

La mayor actividad sulfato-reductora específica se obtuvo por la biopelícula desarrollada en el reactor RB, el cual fue operado a una relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 2.5 y TRH de un día. Esta máxima actividad sulfato-reductora se alcanzó al utilizar el lactato como sustrato.

Aún cuando la actividad sulfato-reductora con acetato como sustrato fue baja a lo largo de los cuatro experimentos, ésta logró conservarse en todo momento, lo que indica que en los reactores LFFD se establecieron BSR capaces de consumir acetato. Aunado a esto, algunos microorganismos metanogénicos que consumieron acetato lograron desarrollarse en los reactores, principalmente en los reactores RC y RD (operados a TRH de 2 días).

El aumento de la actividad sulfato-reductora de las biopelículas en comparación con la actividad sulfato-reductora del inóculo demostró que en los reactores LFFD lograron enriquecerse microorganismos sulfato-reductores responsables de dicha actividad.

La relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 2.5 y TRH de un día permitieron la formación de biopelícula más eficiente conformada de BSR consumidoras de lactato y de acetato, así como de microorganismos consumidores de acetato pero no de

sulfato, los cuales contribuyeron a la remoción de DQO en el reactor y a la no acumulación de acetato en el efluente (reactor RB)

El TRH de 2 días promovió mayor remoción de DQO en los reactores, lo que sugiere que, además de la biopelícula formada, la biomasa planctónica tuvo un papel significativo en el desempeño de los reactores.

El análisis de sólidos volátiles inmovilizados sobre el soporte demostró la formación de la biopelícula; sin embargo, el análisis microbiológico molecular (perfil de DGGE y secuenciación) mostró la composición microbiana que conformó a la biopelícula y a la biomasa planctónica. Los resultados del perfil de DGGE comparados con la base de datos del NCBI permitieron identificar a los microorganismos presentes en los reactores, muchos de los cuales se encontraron como especies no cultivadas. No obstante, entre los géneros que se identificaron como parte de la comunidad microbiana de los reactores se pueden citar al género sulfato-reductor *Desulfovibrio* y varios microorganismos sulfidogénicos no cultivados, así como a otros microorganismos no sulfato-reductores, tales como *Chloroflexi*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Comamonas* y *Acidovorax*.

De manera general, este trabajo permitió comparar las diferencias en actividad y diversidad de la comunidad microbiana en reactores de biopelícula sulfato-reductores. Las biopelículas formadas a TRH de 2 días fueron más ricas en diversidad microbiana, que las formadas a TRH de un día. De igual manera, se encontraron diferentes microorganismos en los reactores operados a diferente relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , lo que demostró que aunque se provenga de un mismo inóculo, los parámetros operacionales del reactor  $DQO/SO_4^{2-}$  y TRH juegan un papel clave en el establecimiento y desarrollo de una comunidad microbiana específica en éstos, con diferentes características morfológicas y metabólicas. La ventaja de tener una biopelícula más heterogénea en tipos de microorganismos radica en la colaboración que puede suscitarse entre éstos para la remoción de sulfato y materia orgánica presentes.

## 7.2 Perspectivas

Como parte del análisis molecular de la comunidad microbiana y en base a los resultados obtenidos del perfil de DGGE y de la identificación con la base de datos del NCBI se plantea realizar el análisis filogenético de las comunidades presentes en los inóculos y en los reactores LFFD operados con el objetivo de conocer la afiliación filogenética de estas comunidades microbianas, es decir, las relaciones evolutivas entre las especies microbianas que se identificaron en los reactores.

De manera adicional se propone demostrar si las biopelículas formadas persisten al operarse los reactores por más tiempo bajo incrementos de carga, así como la aplicación potencial de los bio-reactores más exitosos en este trabajo (RB y RD) para la precipitación de metales al operarlos con un efluente real de DAM.

Dado que en este trabajo la modificación de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  se realizó dejando constante la cantidad de DQO y disminuyendo la cantidad de sulfato, y la más eficiente formación de biopelícula se logró a TRH de un día, se plantea la operación de dos bio-reactores LFFD a TRH de un día y  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.67 y 2.5, manteniendo constante la cantidad de sulfato pero incrementando la cantidad de DQO, con el objetivo de probar si es posible obtener más altas eficiencias de remoción de sulfato que las alcanzadas en los reactores RA y RB de éste estudio.

Por otro lado, se propone la operación de un reactor LFFD utilizando como inóculo comunidades microbianas de sedimentos previamente enriquecidas en lote con acetato y lactato principalmente a pH más ácido que 5.5.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-El-Haleem, D. (2003). *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *Afr. J. Biotechnol.* **2**, 71-74.
- Alvarado–Lassman, A., Rustrian, E., García-Alvarado, M.A., Rodríguez-Jiménez, G.C. y Houbron, E. (2008). Brewery wastewater treatment using anaerobic inverse fluidized bed reactors. *Biores. Technol.* **99**, 3009-3015.
- Álvarez, M.A., Pozzo, T. y Mattiasson, B. (2006). Enhancement of sulphide production in anaerobic packed bed bench-scale biofilm reactors by sulphate reducing bacteria. *Biotechnol. Lett.* **28**, 175-181.
- American Public Health Association APHA, (1988). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20<sup>th</sup>. ed. Washington D.C.
- Bayrakdar, A., Sahinkaya, E., Gungor M., Uyanik, S. y Atasoy, A.D. (2009). Performance of sulfidogenic anaerobic baffled reactor (ABR) treating acidic and zinc-containing wastewater. *Biores. Technol.* **100**, 4354-4360.
- Beer, D. y Stoodley, P. (2006). Microbial biofilms. En: *The Prokaryotes. A handbook on the biology bacteria: symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H y Stackebrandt E. (Eds.) Springer-Verlag. New York. pp. 904–937.
- Bijmans, M.F., van Helvoort, P.J., Dar, S.A., Dopson, M., Lens, P.N. y Buisman, C.J. (2009). Selective recovery of nickel over iron from a nickel-iron solution using microbial sulfate reduction in a gas-lift bioreactor. *Wat. Res.* **43**, 853-860.
- Boswell, C-D., Dick, R-E., Eccles, H. y Macaskie, L-E. (2001). Phosphate uptake and release by *Acinetobacter johnsonii* in continuous culture and coupling of phosphate release to heavy metal accumulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 333 -340.
- Buffière, P., Steyer, J.P., Fonade, C. y Moletta, R. (1995). Comprehensive modeling of methanogenic biofilms in fluidized bed systems: mass transfer limitations and multisubstrate aspects. *Biotechnol. Bioeng.* **48**, 725-736.

- Buffière, P. y Moletta, R. (2000). Relations between carbon removal rates, biofilm size and density of a novel anaerobic reactor: the inverse turbulent bed. *Water Sci. Technol.* **41**, 253-260.
- Celis-García, M.L.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**, 1265-1275.
- Celis-García, L.B., Razo-Flores, E. y Monroy, O. (2007). Performance of a down-flow fluidized-bed reactor under sulfate reduction conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 771-779.
- Celis, L.B., Villa-Gómez, D., Alpuche-Solis, A., Ortega-Morales, B.O., y Razo-Flores, E. (2009). Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized-bed reactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 111-121.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J. y Sghir, A. (2005). Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ. Microbiol.* **7**(8), 1104–1115.
- Choi, E. y Rim, J.M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Sci. Technol.* **23**, 1259-1264.
- Church, C., Wilkin, R., Alpers, C., O-Rye, R. y McCleskey, B. (2007). Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water. *Geochem. Transac.* **8**(10). <http://www.geochemicaltransactions.com/content/8/1/10>.
- Conell, D. y Miller, G. (1984). Chemistry and ecotoxicology of pollution. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1<sup>a</sup> ed. pp. 7-130.
- Cresson, R., Carrere H., Delgenès, J.P. y Bernet, N. (2006). Biofilm formation during the start-up period of an anaerobic biofilm reactor—Impact of nutrient complementation. *Biochem. Eng. J.* **30**, 55–62.
- Cresson, R., Escudié, R., Delgenès, J.P. y Bernet, N. (2007). Key-factors to shorten the start-up of methanogenic biofilm processes. En: Proceedings

- 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion, 23-27 septiembre, Brisbane, Australia.
- Cresson, R., Escudie, R., Steyer, J.P., Delgenès, J.P. y Bernet, N. (2008). Competition between planktonic and fixed microorganisms during the start-up of methanogenic biofilm reactors. *Wat. Res.* **42**, 792-800.
- Cytryn, E., Minz, D., Gelfand, I., Neori, A., Gieseke, A., De Beer, D., y Van Rijn, J. (2005). Sulfide-oxidizing activity and bacterial community structure in a fluidized bed reactor from a zero discharge mariculture system. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 1802-1810.
- Dabert, P., Delgenès, J-P., Moletta, R. y Gordon, J-J. (2002). Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **1**, 39–49.
- Dar, S.A., Stams, A.J., Kuenen, J.G. y Muyzer, G. (2007). Co-existence of physiologically similar sulfate-reducing bacteria in a full-scale sulfidogenic bioreactor fed with a single organic electron donor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 1463-1472.
- Dar, S.A., Bijmans, M.F., Dinkla, I.J., Geurkink, B., Lens, P.N. y Dopson, M. (2009). Population dynamics of a single-stage sulfidogenic bioreactor treating synthetic zinc-containing waste streams. *Microbiol. Ecol.* **58**, 529-537.
- Dolla A., Fournier M. y Dermoun Z. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J. Biotechnol.* **126**, 87–100.
- Duarte, I.C., Oliveira, L.L., Saavedra, N.K., Fantinatti-Garboggini, F., Menezes, C.B., Oliveira V.M. y Varesche, M.B. (2010). Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in a horizontal anaerobic immobilized biomass reactor. *Biores. Technol.* **101**, 606-612.
- Dunsmore, B.C., Jacobsen, A., Hall-Stoodley, L., Bass, C.J., Lappin-Scott, H.M. y Stoodley, P. (2002). The influence of fluid shear on the structure and material properties of sulphate-reducing bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 347-353.

- Erdirencelebi, D., Ozturk, I., Ubay-Cokgor, E. y Ubay-Tonuk ,G. (2007). Degree of sulfate-reducing activities on COD removal in various reactor configurations in anaerobic glucose and acetate-fed reactors. *Clean* **35**(2), 178-182.
- Fernández-Polanco, M. y García Encina, P.A. (2006) Application of biological treatment systems for sulfate-rich wastewaters. En: Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters. Cervantes, F.J., Pavlostathis, S.G. y van Haandel, A.C. (Eds.) IWA Publishing, London, UK. pp. 213-231.
- Fernández, N., Díaz, E.E., Amils, R. y Sanz, J.L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbiol. Ecol.* **56**, 121-132.
- Flores-Aguilar, B. (2010). Influencia del sustrato e inóculo en la formación de biopelícula sulfatorreductora en un reactor de lecho fluidificado inverso. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC. IPICYT, San Luis Potosí, México.
- Freeman, S.A., Sierra-Álvarez, R., Altinbas, M., Hollingsworth, J., Stams, A. y Smidt, H. (2008). Molecular characterization of mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. *Biodegradation* **19**, 161–177.
- Gallegos-García M. (2009) Procesos biológicos de sulfatorreducción en biopelículas para la precipitación de metales. Tesis doctoral. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC. IPICYT, San Luis Potosí, México.
- Gallegos-García, M., Celis, L.B., Rangel-Mendez, R., y Razo-Flores, E. (2009). Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acid wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 91-99.
- Gantzer, C.J. (1989). Inhibitory substrate utilization by steady-state biofilm. *J Environ. Eng. Div. ASCE* **115**, 302-319.
- González-Silva, B.M. (2007). Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor. Tesis de

- maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC. IPICYT. San Luis Potosí, México.
- Hao, J.O., Chen, J.M., Huang, L. y Buglass, R.L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **26**, 155-187.
- Heylen, K., Vanparys, B., Wittebolle L., Verstraete, W., Boon N. y De Vos P. (2006). Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2637-2643.
- Holt, J.G. Krieg, N.R. Seath, P.H.A. Staley, J.T. y Williams, S.T. (2000). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Baltimore: Lippicott Williams y Wilkins, pp. 77, 80, 335-340 y 560.
- Hulshoff Pol, L.W., van Lier, J.B y Veenstra, S. (1995). Assignments: implementation full-scale UASB reactor. Memorias: *International course on anaerobic waste water treatment*. Julio 17-28. Wageningen Agricultural University-IHE Delft. Wageningen, Holanda.
- Hulshoff Pol, L., Lens, P., Stams, A.J.M. y Lettinga G. (1998). Anaerobic treatment of sulfate-rich wastewaters. *Biodegradation* **9**, 213-224.
- Isa, Z., Grusenmeyer S. y Verstraete, W. (1986). Sulfate-reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 572-579.
- Kimura, S., Hallberg, K y Johnson, D. (2006). Sulfidogenesis in low pH (3.8–4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation* **17**, 159-167.
- Jong, T. y Parry, D. (2006). Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Wat. Res.* **40**, 2561 – 2571.
- Juang, Y-C., Adav, S., Lee, D-J. y Lai, J-Y. (2009). Biodiversity in aerobic granule membrane bioreactor at high organic loading rates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 383–388.
- Kaksonen, A.H., Riekkola-Vanhanen, M.L. y Puhakka, J.A. (2003a). Performance and ethanol oxidation kinetics on sulfate reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation* **14**, 207-217.

- Kaksonen, A.H., Franzmann P.D. y Puhakka, J.A. (2003b). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewaters. *Wat. Res.* **37**, 255-266.
- Kaksonen, A.H., Plumb, J.J., Franzmann, P.D. y Puhakka, J.A. (2004a). Effects of hydraulic retention time and sulphide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 332-343.
- Kaksonen, A.H., Plumb, J.J., Franzmann, P.D. y Puhakka, J.A. (2004b). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 279-289.
- Kaksonen, A.H. y Puhakka, J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Eng. Life Sci.* **7**(6), 541-564.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J. y Szewzyk, U. (1999). *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 769-777.
- Karri, S., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A. (2006). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere* **62**, 121-127.
- Klijn, N., Weerkamp A. y De Vos Nizo, W. (1995). Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 788-792.
- Kolmert, A. y Johnson, D.B. (2001). Remediation of acidic waster waters using immobilized, acidophilic sulfate-reducing bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 836-843.
- Koschorreck, M., Wendt-Potthoff, K. y Geller, W. (2003). Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 1159-1162.

- Koschorreck, M. (2008). Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**, 329–342.
- Kosinska, K. y Miskiewicz, T. (1999). Upgrading the efficiency of dissimilatory sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* via adjustment of the COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio. *Biotechnol. Lett.* **21**, 299-302.
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., van der Waarde J., Krooneman, J., Rossetti, S., Thomsen, T. y Nielsen P. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microb. Ecol.* **59**, 671–682.
- Lens, P.N.L. y Kuenen, J.G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Sci. Technol.* **44**(8), 57–66.
- Lens P.N.L., Omil F., Lema J.M. y Hulshoff Pol. W. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: Environmental technologies to treat sulfur pollution-principles and pngineering. Lens P.N.L. y Hulshoff Pol L.W. (Eds). International Water Association. Londres. pp. 153-174.
- Lens, P., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate rich wastewaters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **28**, 41-88.
- Lettinga, G., Hulshoff Pol, L.W. y Zeeman, G. (1998). Anaerobic wastewater treatment En: Biological wastewater treatment. Lecture notes. Landbouwniversiteit, Wageningen.
- Liamleam, W. y Annachatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol. Adv.* **25**, 452-463.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker J. (1997). Brock. Biología de los microorganismos. Prentice Hall, New Jersey USA. 10<sup>a</sup>ed. pp. 321-624.
- Maillacheruvu K.Y. y Parkin G.F. (1996). Kinetics of growth, substrate utilization and sulfide toxicity for propionate, acetate and hydrogen utilizers in anaerobic systems. *Water Environ. Res.* **68**, 1099-1106.
- Maree, J.P., y Strydon, W.F (1985). Biological sulfate removal in an upflow packed bed reactor. *Wat. Res.* **19**, 1101-1106.

- McMahon, K.D., Zheng, D., Stams, A. J. M., Mackie, R. I. y Raskin, L. (2004). Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 823-834.
- Michaud, S., Bernet, N., Roustan., M. y Delgenès, J. P. (2005). Use of the methane yield to indicate the metabolic behavior of methanogenic biofilms. *Process. Biochem.* **40**, 2751-2755.
- Morales, T.A., Dopson, M., Athar R. y Herbert, R.B. (2005). Analysis of bacterial diversity in acidic pond water and compost after treatment of artificial acid mine drainage for metal removal. *Biotechnol. Bioeng.* **90**(5), 543-551.
- Muyzer, G., De Wall, E. y Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(3), 695-700.
- Muyzer, G. y Stams, A.J.M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 441-454.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A. y Peeva, L. (2000). Ethanol utilization by sulphate reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 534-543.
- Narihiro, T., Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M., Yamauchi, T., Shiraishi, K., Kamagata, Y., Nakamura, K. y Sekiguchi, Y. (2009). Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-strength organic wastewaters. *Microbes Environ.* **24**, 88-96.
- Neculita, C.M., Zagury, G.J. y Bussiere, B., (2007). Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *J. Environ. Qual.* **36**, 1-16.
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M. y Heijnen, J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J. Biotechnol.* **80**, 1-33.

- Nikolaev, Yu. A. y Plakunov, V.K. (2007). Biofilm—"city of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* **76**(2), 125–138.
- Okabe, S., Nielsen, P.H. y Characklis, W.G. (1992). Factors affecting microbial sulphate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulphide concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 725-734.
- Okabe, S., Ito, T. y Satoh H. (2003). Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 322-334.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L. y Lettinga G. (1996). Effect of upward velocity and sulfide concentration on sulfide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* **31**, 699-710.
- Omil, F., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga G. (1997). Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido de sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares. *Afinidad* **54**(471), 353-361.
- Omil, F., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1998). Long-term competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 677-685.
- Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N. y Inamori, Y. (2006). Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. *Microbiol. Ecol.* **52**, 253-266.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Visser, A., y Hulshoff Pol, L.W. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 119-136.
- Rabus, R. Hansen, T.A. y Widdel F. (2006) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. En: *The Prokaryotes. A handbook on the biology bacteria: ecophysiology and biochemistry.* Springer-Verlag. New York. pp. 659–768.

- Reis, M., Lemos, P.C., Almeida, J.S. y Carrondo M.J.T. (1990). Influence of produced acetic acid in growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Lett.* **12**, 145-148.
- Ren, N.Q, R., Chua, H., Chan, S.Y. C., Tsang, Y.F. y Sin N. (2007). Effects of COD/SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> ratios on an acidogenic sulfate-reducing reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* **46**, 1661-1666.
- Rittmann, B.E. y McCarty, P.L. (2001). Environmental biotechnology: principles and applications. 1<sup>a</sup> ed. McGraw Hill Inc, New York.
- Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P. y Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.* **3**(6), 700-714.
- Rinzema, A. y Lettinga, G. (1988). Anaerobic treatment of sulphate –containing wastewater. En: Biotreatment systems. Wise, D.L. (Ed.) CRC Press, Boca Raton, **3**, 65-109.
- Roest, K. (2007). Microbial community analysis in sludge of anaerobic wastewater treatment systems: Integrated culture-dependent and culture-independent approaches. Tesis doctoral. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Shabir, A., Kleerebezem, R., Stams, A., Kuenen, J.G. y Muyzer, G. (2008). Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 1045–1055.
- Sahinkaya, E., Ozkaya B., Kaksonen A.H. y Puhakka A.J. (2007). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at 8 and 65 °C temperatures is limited by acetate oxidation. *Wat. Res.* **41**, 2706-2714.
- Speece, R.E. (1996). Sulfide production, En: Anaerobic biotechnology for industrial waste-waters. Speece, R.E. (ed.) Archaea Press. Nashville, Tennessee, pp. 287-318.
- Stams, A.J. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **66**, 271–294.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. y Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187–209.
- Tahuer, R.K., Stackebrand, E. y Hamilton, A.W. (2007). Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. En: Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. Barton, L.L y Hamilton, A. Cambridge University Press. pp. 1-27.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F. y Massé, D.I. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Wat. Res.* **42**, 513 – 537.
- Van Loosdrecht, M.C., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D. y Heijnen, J.J. (1997). Biological phosphate removal processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 289-296.
- Velasco, A., Ramírez, M., Volke-Sepúlveda T., González-Sánchez, A. y Revah, S. (2008). Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *J. Haz. Mater.* **151**, 407-413.
- Vieira, A.M., Bergamasco, R., Gimenes, M., Vataru-Nakamura, C. y Dias-Filho, B.P. (2003). Enumeration and isolation of facultative anaerobic bacteria in an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating wastewater from a gelatine industry. *Acta Scientiarum. Biological Sci. Maringá*, **25**(2), 257-26.
- Villa-Gómez D.K. (2006). Arranque de un reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) para la producción biológica de H<sub>2</sub>S. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC. IPICYT, San Luis Potosí, México.
- Visser, A., Alpheenar, P.A., Gao, Y., Van Rossum, G. y Lettinga, G. (1993). Granulation and immobilization of methanogenic and sulphat-reducing bacteria in high rate anaerobic reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 575-581.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate-containing wastewater. Tesis doctoral, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

- Visser, A. Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci. Technol.* **33**, 99-110.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. y Scheifer, K-H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 792-800.
- Wang, A., Ren, N., Wang, X. y Lee, D. (2008). Enhanced sulfate reduction with acidogenic sulfate-reducing bacteria. *J. Haz. Mat.* **154**, 1060-1065.
- Ward, D.M. y Winfrey, M.R. (1985). Interactions between methanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments. *Adv. Aquat. Microbiol.* **3**, 141-179
- Weijma J.P.L.W.H., Stams A.J.M. and Lettinga G. (2000). Performance of a thermophilic sulfate and sulfite reducing high rate anaerobic reactor fed with methanol. *Biodegradation* **11**, 429-439.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. En: *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder A.J.B. (ed.) John Willey and Sons. Inc. pp. 469-585.
- Widdel, F. y Hansen, T.A. (1992). The dissimilatory sulfate and sulphur bacteria. En: *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.H., Springer-Verlag. pp.583-624.
- Willems, A. y De Vos, P. (2006). *Comamonas*. En: *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. Springer-Verlag. pp 723-736.
- Yeates, C., Gillings, M.R., Davison, A.D., Altavilla, N. y Veal, D.A. (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological procedures online.* **1**, 40-47.
- Zhao, Y-G., Ren, N-Q y Wang, A. (2008). Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. *Chemosphere* **72**, 233-242.
- Zhao, Y-G., Wang, A-J. y Ren, N-Q. (2010). Effect of carbon sources on sulfidogenic bacterial communities during the starting-up of acidogenic sulfate-reducing bioreactors. *Biores. Technol.* **101**, 2952-2959.

## **9 ANEXOS**

### **Anexo 1. Soluciones empleadas en el análisis molecular**

#### **1.1 Extracción de ADN**

Buffer PBS a pH 7.6.

Para preparar un litro se disolvieron 8.0 g de NaCl, 0.20 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.6 con HCl o NaOH y se aforó a un volumen final de 1 L con agua destilada.

Buffer lizosima.

Es una solución de Tris-HCl 10 mM a un pH de 8.0. Para prepararla se disolvieron 0.5 mL de Tris-HCl (1000 mM) a pH 8.0 en 50 mL de agua desionizada.

Buffer proteinasa.

Es una solución compuesta de 10 mM de Tris-HCl a pH 7.6, 5 mM de EDTA a pH 8.0 y 50 mM de NaCl. Para prepararla se mezclaron 0.5 mL de Tris-HCl (1000 mM) a pH 7.6, 0.5 mL de EDTA (500 mM) a pH 8.0 y 0.5 mL de NaCl (5000 mM) y se aforó a un volumen final de 50 mL con agua desionizada.

Solución PVP-CTAB.

Es una solución compuesta de 2% de PVP y 2% de CTAB. Para prepararla se mezclaron 2 g de PVP y 2 g de CTAB en 100 mL de buffer proteinasa y se autoclaveó para disolver.

#### **1.2 Tinción del gel de DGGE con nitrato de plata**

Solución de fijación.

La solución de fijación es una solución de ácido acético al 10%. Para prepararla se disolvieron 50 mL de ácido acético glacial en 450 mL de agua desionizada. Se conservó en refrigeración hasta su uso.

Solución de tinción.

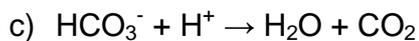
La solución de tinción es una solución de nitrato de plata. Para prepararla se disolvieron 0.5 g  $\text{AgNO}_3$  y 750  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37% en 500 mL de agua desionizada. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de utilizarla y conservarse de manera que se evite la incidencia de la luz.

Solución de revelado.

La solución de revelado es una solución carbonatada. Para prepararla se disolvieron 13.99 g de carbonato de sodio anhidro en 600 mL de agua desionizada, se enfrió durante 15 minutos a  $-20^\circ\text{C}$  y posteriormente se pasó a refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso. Antes de utilizarse, se disolvieron 1.2 mL de formaldehído al 37% y 0.6 mL de una solución de tiosulfato de sodio al 0.2%. La solución de tiosulfato se preparó al disolver 0.0273 g de tiosulfato de sodio en 10 mL de agua desionizada. Esta solución puede conservarse en congelación por varios días.

## Anexo 2. Fundamento de la determinación de alcalinidad

La alcalinidad está determinada por las características de unión de protones de las bases y/o ácidos remanentes. Ésta se determina por la suma de todos los componentes que pueden unir protones en el intervalo de pH de interés. El ejemplo de una base aceptando un protón es el  $\text{NH}_3$ , mientras que de ácidos aceptando un protón son el acetato y bicarbonato (Ecuaciones a, b y c).



Puesto que el  $\text{CO}_2$  a menudo se encuentra en exceso, comparado con otros ácidos débiles, en sistemas anaerobios con actividad microbiana, es muy importante que exista suficiente alcalinidad en el medio para neutralizarlo. En los sistemas anaerobios, las sales de los AGV también contribuyen a la alcalinidad a pH neutro, pero no están disponibles para la neutralización de los ácidos volátiles adicionales aún cuando éstos pueden constituir una fracción mayor de la alcalinidad total. Los sistemas anaerobios operan en el intervalo de pH neutro en el cual el bicarbonato es la especie dominante.

La alcalinidad de bicarbonato es la alcalinidad causada por la presencia de bicarbonato en el sistema de reacción. Este amortiguador es muy importante en un intervalo de pH entre 6.0 y 7.0, y de especial interés para la digestión anaerobia, porque es en este intervalo de pH en el cual ocurre la metanogénesis, la cual sería inhibida si el pH disminuye por debajo de 6.0. Un pH alrededor de 5.8, en principio es suficiente para neutralizar todo el bicarbonato presente.

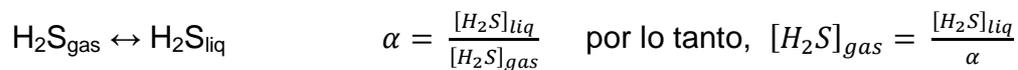
Las condiciones de pH bajo pueden ser causadas por dos fuentes de acidez:  $\text{H}_2\text{CO}_3$  y AGV, que son generados en las reacciones microbianas. Estos ácidos requieren de alcalinidad para neutralizarse con el objetivo de que la actividad microbiana no se vea afectada por la disminución de pH. El requerimiento mayor en procesos anaerobios bien operados es la neutralización del  $\text{H}_2\text{CO}_3$  que resulta de la alta presión parcial de  $\text{CO}_2$  en el reactor (las

concentraciones de AGV comúnmente son bajas). Si la concentración de ácidos ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) excede la alcalinidad disponible, el reactor se acidificará inhibiendo severamente la actividad microbiana, especialmente a los microorganismos metanógenos. Cuando la producción de metano se detiene, los AGV se seguirán acumulando empeorando la situación.

La distinción entre la alcalinidad de bicarbonato y la alcalinidad total, que incluye las sales de los AGV, es de crítica importancia. Por un lado, la alcalinidad de bicarbonato se refiere a la alcalinidad total menos la alcalinidad equivalente de AGV (debido a los AGV neutralizados). Cualquier catión excepto el  $\text{H}^+$  mantiene el acetato en su forma alcalina. La alcalinidad de los AGV contribuye al amortiguamiento del  $\text{H}_2\text{CO}_3$  pero es transitorio porque los AGV varían y no puede confiarse en ellos. Puesto que las sales de AGV no pueden proveer amortiguamiento para los AGV libres adicionales, la alcalinidad de bicarbonato es de interés particular. A pH de 5.8, cerca del 80% de la alcalinidad de bicarbonato se titulará mientras que sólo una pequeña fracción de la alcalinidad de AGV será titulada a ese pH.

### Anexo 3. Concentración de sulfuro en fase gaseosa

El sulfuro es el producto de la reducción del sulfato. La concentración de sulfuro disuelto en el líquido depende de la solubilidad del sulfuro, la cual está influenciada por los factores fisicoquímicos pH y temperatura. Para determinar la concentración de sulfuro en fase gaseosa, de acuerdo con Hulshoff Pol *et al.* (1995), debe utilizarse la ley de Henry y el equilibrio de fases considerando la concentración de sulfuro cuantificado, el pH en el efluente y la temperatura de operación de los reactores LFFD.



$$ST = [H_2S]_{liq} + [HS^-] \quad \text{por lo tanto, } [HS^-] = ST - [H_2S]_{liq}$$

$$[H_2S]_{liq} = \left\{ 1 + \frac{K_{H_2S}}{[H^+]} \right\}^{-1}$$

$$ST = \left\{ 1 + K_{H_2S} 10^{pH} \right\}^{-1} ST$$

$$[H_2S]_{gas} = \frac{f}{\alpha} ST$$

donde:

f = fracción de sulfuro disuelto no ionizado en el sulfuro total y se calcula como

$$f = \left\{ 1 + K_{H_2S} 10^{pH} \right\}^{-1}$$

$$T = \text{°C}$$

$$K_{H_2S} = (0.38T + 1.892) 10^{-8}$$

$$\alpha = 3.442 - 0.044T$$

ST = sulfuro total

#### Anexo 4. Análisis estadístico del desempeño de los reactores LFFD

Con el objetivo de determinar si estadísticamente existía diferencia significativa en el desempeño de los reactores LFFD (RA, RB, RC y RD), en cuanto a sulfuro producido, eficiencia de remoción de sulfato ( $ER\ SO_4^{2-}$ ) y eficiencia de remoción de DQO ( $ER\ DQO$ ) durante el periodo pseudo-estable de su operación en continuo, se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA con un intervalo de confianza de 95%). Para realizar el ANOVA se utilizó la herramienta de análisis "One-way-ANOVA" del programa Microcal Origin 6.0.

A continuación se presentan los resultados del ANOVA del desempeño de los reactores.

##### a. One-way-ANOVA: RA, RB, RC y RD ( $H_2S$ )

$H_0$ : RA = RB = RC = RD (Hipótesis nula)

$H_1$ : RA  $\neq$  RB  $\neq$  RC  $\neq$  RD

$H_0$ : No existe diferencia significativa en la velocidad de producción de sulfuro entre los cuatro reactores.

$H_1$ : Existe diferencia significativa en la velocidad de producción de sulfuro por lo menos en uno de los cuatro experimentos.

Criterio de rechazo: Si el valor P es menor que  $\alpha$ , entonces se rechaza la hipótesis nula.

$\alpha = 0.05$

One-Way ANOVA on columns selected between Col (RA  $H_2S$ ) -> Col (RD  $H_2S$ ):

Data	Mean	Variance	N
RA $H_2S$ (mg/L)	47.89286	46.98832	7
RB $H_2S$ (mg/L)	55.19167	19.62274	6
RC $H_2S$ (mg/L)	72.792	161.72292	5
RD $H_2S$ (mg/L)	83.21	249.5732	5

F = 14.02479

p = 4.66154E-5

At the 0.05 level, the means are significantly different.

Conclusión: Ya que  $p = 0.000047 < 0.05$ , se cumple el criterio de rechazo de  $H_0$ , entonces se acepta  $H_1$  ( $RA \neq RB \neq RC \neq RD$ ), es decir, la velocidad de producción de sulfuro es significativamente diferente al menos en un reactor.

**b. One-way-ANOVA: RA, RB, RC y RD (ER  $SO_4^{2-}$ )**

$H_0$ :  $RA = RB = RC = RD$  (Hipótesis nula)

$H_1$ :  $RA \neq RB \neq RC \neq RD$

$H_0$ : No existe diferencia significativa en la eficiencia de remoción de sulfato entre los cuatro reactores.

$H_1$ : Existe diferencia significativa en la eficiencia de remoción de sulfato por lo menos en uno de los cuatro experimentos.

Criterio de rechazo: Si el valor P es menor que  $\alpha$ , entonces se rechaza la hipótesis nula.

$\alpha = 0.05$

One-Way ANOVA on columns selected between Col (RA ER  $SO_4^{2-}$ ) -> Col (RD ER  $SO_4^{2-}$ ):

Data	Mean	Variance	N
RA ER $SO_4^{2-}$ %	9.82834	3.74775	4
RB ER $SO_4^{2-}$ %	43.13385	120.61535	5
RC ER $SO_4^{2-}$ %	24.37862	205.22507	4
RD ER $SO_4^{2-}$ %	59.20293	674.78901	8

F = 7.39057

p = 0.00222

At the 0.05 level, the means are significantly different.

**Conclusión:** Ya que  $p = 0.0022 < 0.05$ , se cumple el criterio de rechazo de  $H_0$ , entonces se acepta  $H_1$  ( $RA \neq RB \neq RC \neq RD$ ), es decir, la eficiencia de remoción de sulfato es significativamente diferente al menos en un reactor.

**c. One-way-ANOVA: RA, RB, RC y RD (ER DQO)**

$H_0$ :  $RA = RB = RC = RD$  (Hipótesis nula)

$H_1$ :  $RA \neq RB \neq RC \neq RD$

$H_0$ : No existe diferencia significativa en la eficiencia de remoción de DQO entre los cuatro reactores.

H<sub>1</sub>: Existe diferencia significativa en la eficiencia de remoción de DQO por lo menos en uno de los cuatro experimentos.

Criterio de rechazo: Si el valor P es menor que  $\alpha$ , entonces se rechaza la hipótesis nula.

$\alpha = 0.05$

One-Way ANOVA on columns selected between Col (RA ERDQO) -> Col (RD ERDQO):

Data	Mean	Variance	N
RA ERDQO %	33.4075	207.27689	4
RB ERDQO %	35.6525	274.85269	4
RC ERDQO %	71.615	124.22137	4
RD ERDQO %	69.835	38.4543	4

F = 10.86991

p = 9.74432E-4

At the 0.05 level, the means are significantly different.

**Conclusión:** Ya que  $p = 0.00097 < 0.05$ , se cumple el criterio de rechazo de H<sub>0</sub>, entonces se acepta H<sub>1</sub> (RA  $\neq$  RB  $\neq$  RC  $\neq$  RD), es decir, la eficiencia de remoción de DQO es significativamente diferente al menos en un reactor.

## Anexo 5. Imágenes de los reactores UASB y LFFD empleados



Fotografías de los reactores utilizados. a) Reactor de lecho de lodo de flujo ascendente (UASB). b) Reactor de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD).

## **Anexo 6. Productos científicos**

Aceptación del trabajo "Biofilm development during the start-up of a sulfate-reducing down-flow fluidized bed reactor at different COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and HRT" para presentación oral en el XII Congreso Mundial de Digestión Anaerobia a celebrarse del 31 de octubre al 4 de noviembre del 2010 en Guadalajara, México.