



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

POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS

**Influencia del sustrato e inóculo en la formación  
de biopelícula sulfatorreductora en un reactor de  
lecho fluidificado inverso**

Tesis que presenta  
**Berenice Flores Aguilar**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias Aplicadas**

En la opción de  
**Ciencias Ambientales**

Directora de Tesis  
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

Asesores  
Dr. Elías Razo Flores  
Dr. Alejandro López Cortés

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2010.



La tesis **“Influencia del sustrato e inóculo en la formación de biopelícula sulfatorreductora en un reactor de lecho fluidificado inverso”** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Berenice Flores Aguilar** y aprobada el **11 de Enero 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.

---

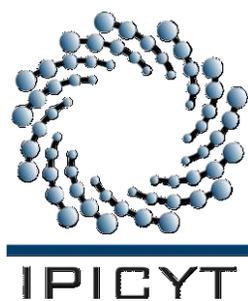
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García  
(Directora de tesis)

---

Dr. Elías Razo Flores  
(Asesor de tesis)

---

Dr. Alejandro López Cortés  
(Asesor de tesis)



Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García y la asesoría de los doctores Elías Razo Flores y Alejandro López Cortés.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-211826). 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.

A mi familia y Juan Luis con todo mi cariño

A mis amigos por su apoyo y amistad brindada, en especial a Ciria, Julia, Cecy,  
Juan José, Elisa, Lupe y Emmanuel.

## **Agradecimientos**

A mi directora de tesis Dra. Berenice Celis García y asesor Elías Razo Flores por todas sus enseñanzas, apoyo, confianza, críticas y comentarios durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Alejandro López Cortés del CIBNOR, por su contribución, disponibilidad y valiosos comentarios durante el desarrollo de la tesis y por compartir conmigo sus conocimientos relacionados con la técnica de DGGE. Además le agradezco todo el apoyo que recibí durante mi estancia en su laboratorio de Biotecnología Microbiana.

A la Dra. Lilia Montoya Lorenzana, posdoctorante de la División de Biología Molecular por toda su ayuda y enseñanzas con respecto al análisis filogenético.

A los técnicos de la División de Ciencias Ambientales, M. en C. Dulce I.F. Partida Gutiérrez, M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, en especial a M. en C. Rebeca Pérez Rodríguez por su gran disponibilidad y apoyo técnico.

A los técnicos académicos de la División de Biología Molecular por su asesoría y apoyo en los experimentos relacionados con la extracción de DNA, PCR y DGGE, M. en C. Rosalba Castillo Collazo y M. en C. Leandro Gabriel Ordoñez Acevedo.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Plantas por su ayuda y sugerencias, en especial a Isabel, Bernardo y Pablo.

A mis compañeros y amigos de la División de Ciencias Ambientales: Alma, Kitzia, Reyes, Olga, Ana, Jorge, Arturo, Josué, Flor, Memo, Marisol y José Luis por el tiempo que compartimos juntos, apoyo y enseñanzas.

## Contenido

Hoja de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	vi
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Digestión anaerobia y sulfatorreducción	1
1.2 Bacterias sulfatorreductoras (BSR)	5
1.3 Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)	9
1.4 Biopelículas	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos	14
3.3. Hipótesis	14
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
4.1 Materiales	15
4.1.1 Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)	15
4.1.2 Condiciones de operación del reactor LFI	16
4.1.3 Fuente de biomasa	17
4.1.3.1 Inóculo para el experimento I	17
4.1.3.2 Inóculo para los experimentos II y III	17
4.1.3.3 Inóculo para el experimento IV	18
4.1.4 Medios de cultivo	18
4.1.4.1 Medio de alimentación del reactor UASB	18

4.1.4.2 Medio de alimentación del reactor LFI	19
4.1.4.3 Medio basal para determinar la actividad sulfatorreductora, fermentativa y metanogénica	19
4.1.4.4 Solución de elementos traza	19
4.2 Métodos	19
4.2.1 Actividad sulfatorreductora del lodo granular	19
4.2.2 Actividad metanogénica del lodo granular	20
4.2.3 Actividad fermentativa del lodo granular	21
4.2.4 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula	22
4.2.5 Actividad metanogénica de la biopelícula	22
4.2.6 Actividad fermentativa de la biopelícula	23
4.2.7 Análisis de la comunidad microbiana	23
4.2.7.1 Extracción de ADN genómico del lodo granular	23
4.2.7.2 Extracción de ADN genómico de la biopelícula	25
4.2.7.3 Amplificación del ADN por PCR	25
4.2.7.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	26
4.2.7.5 Análisis de secuencias y filogenia	27
4.3 Análisis	27
4.3.1 Cuantificación de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos volátiles inmovilizados (SVI)	27
4.3.2 Cuantificación de sulfato y ácidos grasos volátiles (AGV)	28
4.3.3 Cuantificación de sulfuro disuelto	29
4.3.4 Cuantificación del sulfuro por el método Cord-Ruwisch	30
4.3.5 Determinación del pH	30
4.3.6 Cuantificación de la alcalinidad	30
4.3.7 Cuantificación del carbono orgánico total (COT)	31
4.3.8 Cuantificación de la concentración de ADN	32
4.4 Cálculos	32
4.4.1 Equivalencia teórica de las diferentes fuentes de carbono en términos de DQO	32
4.4.2 Porcentaje de remoción de DQO	33
4.4.3 Porcentaje de remoción de sulfato	33
4.4.4 Determinación de la actividad metanogénica, fermentativa y sulfatorreductora	33

4.4.5 Porcentaje de remoción de sustratos	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
5.1 Caracterización de los inóculos	36
5.2 Resultados del desempeño del reactor LFI en los experimentos I, II, III y IV	38
5.2.1 Desempeño del reactor en el experimento I	39
5.2.2 Desempeño del reactor en el experimento II	42
5.2.3 Desempeño del reactor en el experimento III	44
5.2.4 Desempeño del reactor en el experimento IV	47
5.3 Discusión general del desempeño de los reactores	49
5.4 Consumo de los sustratos en los experimentos I, II, III y IV	50
5.5 Velocidad de producción de sulfuro en las biopelículas de los experimentos I, II, III y IV	56
5.5.1 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento I	56
5.5.2 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento II	58
5.5.3 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento III	59
5.5.4 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento IV	60
5.6 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula de los experimentos I, II, III y IV	62
5.7 Actividad metanogénica y fermentativa en la biopelícula de los experimentos I, II III y IV	65
5.8 Sólidos volátiles inmovilizados al final de los experimentos I, II, III y IV	67
5.9 Concentración de ADN	70
5.10 Análisis de la comunidad microbiana	72
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>91</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Reacciones metabólicas involucradas en la degradación de la materia orgánica en sistemas anaerobios.	3
Tabla 1.2	Propiedades morfológicas y fisiológicas de las bacterias sulfatorreductoras.	8
Tabla 1.3	Factores que afectan la eficiencia de los biorreactores sulfatorreductores.	10
Tabla 4.1	Condiciones operacionales del reactor LFI en los experimentos I, II, III y IV.	17
Tabla 5.1	Sólidos suspendidos volátiles de los inóculos.	36
Tabla 5.2	Actividad metanogénica, sulfatorreductora y fermentativa de los lodos granulares.	37
Tabla 5.3	Promedio del desempeño del reactor LFI en los experimentos I, II, III y IV.	53
Tabla 5.4	Balance de lactato, acetato y glucosa en los experimentos I, II, III y IV.	53
Tabla 5.5	Actividad metanogénica y fermentativa de lodos granulares y biopelículas de los experimentos I, II, III y IV.	66
Tabla 5.6	Concentración de ADN en los lodos granulares y en las biopelículas del experimento III y IV.	71
Tabla 5.7	Secuencias de la base de datos NCBI con la mayor similaridad para cada banda.	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema de la degradación anaerobia de la materia orgánica por BSR, organismos metanogénicos y acetogénicos.	2
Figura 1.2	Diagrama del desarrollo de una biopelícula.	11
Figura 4.1	Diagrama del reactor anaerobio de lecho fluidificado inverso (LFI).	15
Figura 5.1	Desempeño del reactor LFI en el experimento I.	41
Figura 5.2	Desempeño del reactor LFI en el experimento II.	44
Figura 5.3	Desempeño del reactor LFI en el experimento III.	46
Figura 5.4	Desempeño del reactor LFI en el experimento IV.	48
Figura 5.5	Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o lactato, y sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls) en el soporte a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento I. Inóculo lodo Maltera, LM.	57
Figura 5.6	Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o glucosa, y sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls) en el soporte a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento II. Inóculo lodo Ricolino, LR.	59
Figura 5.7	Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o lactato, y sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls) en el soporte a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento III. Inóculo lodo Ricolino, LR.	60
Figura 5.8	Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o lactato, y sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls) en el soporte a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento IV. Inóculo lodo Eerbeek, LE.	61
Figura 5.9	Actividad sulfatorreductora con lactato, glucosa o acetato de los experimentos I, II, III y IV.	64
Figura 5.10	Cantidad de biomasa inmovilizada en el soporte al término	68

	de la operación del reactor LFI en cada experimento.	
Figura 5.11	Imagen de geles de agarosa de los productos de PCR	73
Figura 5.12	Perfil de bandas del DGGE del gen ARNr 16S de las muestras de lodos granulares y biopelículas del LFI a diferentes tiempos.	75
Figura 5.13	Árbol filogenético generado usando el método Neighbor-joining basado en las secuencias de genes ARNr 16S obtenidas de las bandas de DGGE.	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARNr 16S	Subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Actividad fermentativa
AGV	Ácidos grasos volátiles
AM	Actividad metanogénica
ARN	Ácido ribonucleico
ASR	Actividad sulfatorreductora
BESA	Ácido 2-bromoetanosulfónico
BSR	Bacterias sulfatorreductoras
CH <sub>4</sub>	Metano
COT	Carbono orgánico total
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante)
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO/ SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Relación DQO/sulfato (g/g)
LFI	Lecho fluidificado inverso
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
SR	Sulfatorreducción
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
SVI	Sólidos volátiles inmovilizados
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de hidrógeno

**Flores Aguilar, Berenice (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. San Luis Potosí, México.**

## **Resumen**

El sulfato que se genera y descarga en efluentes industriales puede afectar los suministros de agua pública y ser una amenaza de salud para diferentes formas de vida. La sulfatorreducción biológica es una alternativa para el tratamiento de aguas residuales que contienen sulfato. El reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) ha sido una buena opción para la remoción de sulfato en aguas residuales; sin embargo, el arranque requiere operar el reactor en lote por periodos largos para la formación de la biopelícula sulfatorreductora. El objetivo general de este trabajo fue estudiar la formación de una biopelícula sulfatorreductora utilizando diferentes inóculos y sustratos en un reactor LFI, sin ser operado en lote por mucho tiempo. En este trabajo se realizaron 4 experimentos utilizando como inóculos lodos granulares de plantas de tratamiento de efluentes de las industrias mencionadas: maltera en el experimento I; dulcera en los experimentos II y III; y productora de papel en el experimento IV. Los sustratos que se usaron fueron acetato-lactato para los experimentos I, III y IV, y acetato-glucosa para el experimento II. En primer lugar se caracterizaron los diferentes inóculos determinando la actividad sulfatorreductora (ASR), metanogénica (AM), y fermentativa (AF). Posteriormente, en cada experimento (I, II, III y IV) el LFI se inóculo con lodo granular, se operó en lote por 48 h, y consecutivamente se puso en régimen continuo por un periodo de 30-44 días. La ASR de los lodos estuvo entre 0.8 y 2.96 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d, la AM entre 0.15 y 0.46 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d y la AF entre 0.05 y 0.11 g DQO-CO<sub>2</sub>/g SSV-d. En los cuatro experimentos se consideró que los últimos 7 días de operación en continuo representaban un periodo estable, y de esta forma, la producción promedio de sulfuro en los experimentos I, II, III y IV fue de 105, 70, 64 y 55 mg H<sub>2</sub>S/L-d respectivamente. El porcentaje de remoción de sulfato fue de 27, 15, 12.5 y 11, y la eficiencia de remoción de DQO fue de 34.5, 53, 49 y 52% para los experimentos I, II, III y IV, respectivamente. El porcentaje de remoción de los sustratos lactato y glucosa fue de aproximadamente 100% para los cuatro experimentos, y el porcentaje de remoción de acetato fue 25, 48, 45 y 48% para los experimentos I, II, III y IV, respectivamente. Solo en el experimento I se observó la remoción de acetato por sulfatorreducción (6.3%). Los resultados de la ASR y AF en las biopelículas de los cuatro experimentos indicaron un enriquecimiento de estos microorganismos. La cantidad de biomasa inmovilizada en el soporte varió entre 0.49 y 0.74 g sólidos inmovilizados/L soporte. El uso de técnicas moleculares mostró que la comunidad microbiana desarrollada en las biopelículas de los cuatro experimentos fue diferente a la que existía en los lodos granulares. Este trabajo mostró que es posible en tiempos cortos (30 días) la formación de biopelícula sulfatorreductora en un LFI sin ser operado en lote por largo tiempo (45-50 días), y diferentes inóculos y sustratos influyen en el desarrollo de biopelículas sulfatorreductoras con diferentes grupos metabólicos de microorganismos que tienen diferentes relaciones sintróficas y/o competitivas por el sustrato.

**Flores Aguilar, Berenice (2010). Influence of substrate and inocula in the development of sulfate-reducing biofilm in a down flow fluidized bed reactor. M.Sc. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosi, Mexico.**

### **Abstract**

The sulfate generated and discharged in industrial waters may affect the public water supply, becoming a health threat to a variety of life forms. The biological sulfate reduction process is an alternative for the treatment of sulfate-containing wastewaters. The down flow fluidized bed reactor (DFFB) has shown to be a good option for sulfate removal in wastewaters. However, the start-up of this type of reactors requires batch operation for long periods of time to develop a sulfate reducing biofilm. The aim of this work was to study the formation of sulfate reducing biofilms using several sources of inoculum and substrates using a DFFB reactor, without being operated in batch for long time. In this study 4 experiments were performed using as inoculum the following granular sludges obtained from the effluent treatment plants of the mentioned industries: malting in experiment I; confectionery in experiments II and III; and pulp and paper in experiment IV. The substrates used were acetate-lactate for experiments I, III and IV, and acetate-glucose for experiment II. In the first place, the three different inoculums were characterized determining their sulfate-reducing (SRA), methanogenic (MA), and fermentative (FA) activities. Secondly, for each experiment (I to IV), the DFFB reactor was inoculated with the corresponding granular sludge, then operated in batch for 48 h and afterwards operated in continuous regime for 30-44 d. The results obtained from the SRA values for the four experiments ranged from 0.8 to 2.96 g COD-H<sub>2</sub>S/g VSS-d; for the MA from 0.15 to 0.46 g COD-CH<sub>4</sub>/g VSS-d and for the FA from 0.05 to 0.11 g COD-CO<sub>2</sub>/g VSS-d. In the four experiments it was considered that the last 7 days of continuous operation represented a stable period, and in this manner, the sulfide production was 105, 70, 64 and 55 mg H<sub>2</sub>S/L-d for experiments I, II III and IV, respectively. The percentages of sulfate and COD removal were 27, 15, 12.5, 11 and 34.5, 53 49 and 52%, for experiments I, II, III and IV, respectively. The percentage of substrate removal as lactate or glucose was almost 100%, and for acetate was 25, 48, 45 and 48% for experiments I, II, III and IV, respectively. It was only in experiment I where acetate was removed via sulfate reduction (6.3%) The results of the sulfate reducing and fermentative activities in the biofilms obtained in the four experiments indicated the enrichment of sulfate reducing microorganisms. The amount of immobilized biomass in the support varied from 0.49 to 0.74 g immobilized volatile solids/L support. The use of molecular tools showed that the microbial community developed in the biofilms of the four experiments was different from the community that was present in the granular sludges. This work showed that it was possible to develop a sulfate reducing biofilm in a short period of time (30 days) in a DFFB reactor without a long batch operation (45-50 days). Different inocula and substrates have influence on the development of sulfate reducing biofilms with different metabolic groups of microorganisms that may have different syntrophic or competitive relationships for the substrate.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) es la forma más oxidada del azufre y uno de los aniones más abundantes en el medio ambiente, es generado y descargado a partir de diferentes procesos industriales incluyendo los drenados ácidos de minas, la producción de aceite comestible, la fermentación de melazas, las operaciones de curtidoras, la producción de alimentos y el procesamiento de pulpa y papel entre otros. Además del sulfato, las aguas residuales generadas por estas industrias pueden contener altas concentraciones de otras especies de azufre como sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) y tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) entre otras, las cuales pueden afectar los suministros de agua pública y ser una amenaza de salud para diferentes formas de vida, por lo tanto, los efluentes industriales que poseen alto contenido de sulfato y otras especies de azufre deben tratarse antes de ser liberados al ambiente (Liamleam y Annachhatre, 2007).

Un proceso eficiente para la remoción del sulfato que se encuentra en efluentes industriales es el proceso biológico anaerobio de sulfatorreducción que se describe a continuación.

### 1.1 Digestión anaerobia y sulfatorreducción

En el proceso de digestión anaerobia la materia orgánica presente se transforma a biogás, que contiene principalmente dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y metano ( $\text{CH}_4$ ). Este proceso biológico se lleva a cabo en varias etapas por diferentes grupos de microorganismos como son: fermentativos, acetogénicos, metanogénicos, y bacterias sulfatorreductoras (BSR) si el sulfato está presente. Las diferentes etapas del proceso de digestión anaerobia se describen a continuación y se muestran en la Figura 1.1.

1. Hidrólisis: Las bacterias hidrolíticas convierten los compuestos complejos insolubles tales como proteínas, polisacáridos y lípidos a moléculas menos complejas como aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena corta.

2. Acidogénesis o fermentación: En esta etapa, los compuestos que se formaron durante la hidrólisis son degradados por bacterias anaerobias acidogénicas, el

resultado es la formación de alcoholes, ácidos grasos volátiles (AGV) como lactato, butirato, propionato, acetato y gases ( $H_2$ ,  $CO_2$ ).

3. Acetogénesis: Esta etapa consiste en la conversión de AGV a acetato e hidrógeno.

4. Metanogénesis: En esta etapa se lleva a cabo la formación de metano por la descarboxilación de acetato por microorganismos metanogénicos acetotróficos y por la hidrogenación de dióxido de carbono por metanogénicos hidrogenotróficos.

En la digestión anaerobia en presencia de sulfato (Figura. 1.1), las BSR pueden competir con microorganismos acetogénicos y metanogénicos por varios sustratos como acetato, propionato, butirato e  $H_2/CO_2$  (Widdel, 1988; Omil *et al.*, 1998). Algunas de las reacciones metabólicas involucradas en la degradación de la materia orgánica se muestran en la Tabla 1.1.

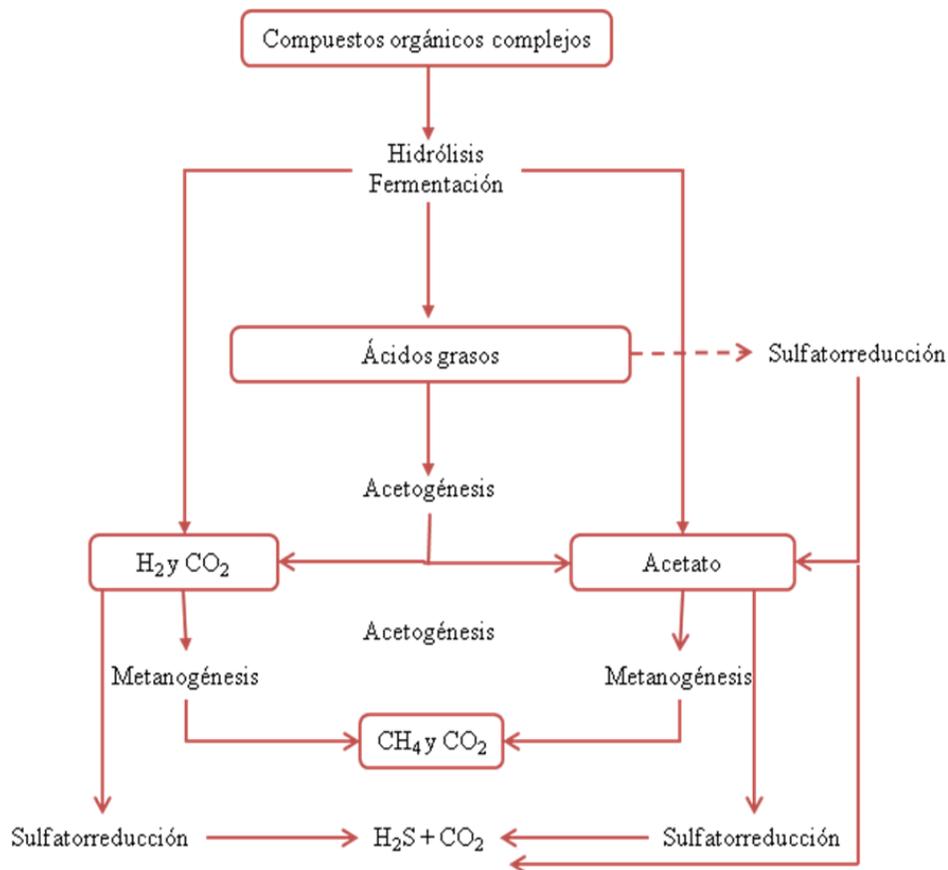


Figura 1.1 Esquema de la degradación anaerobia de la materia orgánica por BSR, organismos metanogénicos y acetogénicos (Lens *et al.*, 2000).

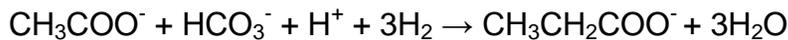
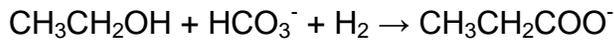
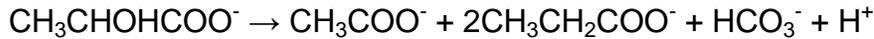
Tabla 1.1 Reacciones metabólicas involucradas en la degradación de la materia orgánica en sistemas anaerobios (Gibson, 1990; Oude Elferink *et al.*, 1994).

---

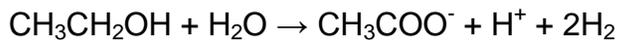
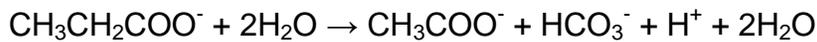
**Reacciones**

---

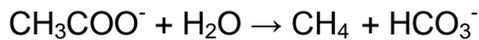
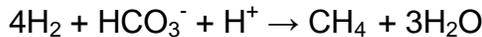
**Fermentativas**



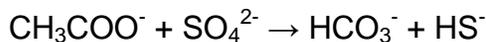
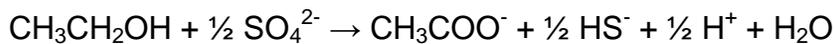
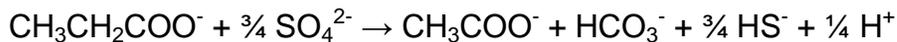
**Acetogénicas**



**Metanogénicas**



**Sulfatorreductoras**




---

Acetato=  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ; Propionato=  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ ; Lactato=  $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ ; Etanol=  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ; Glucosa=  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ .

El proceso biológico de sulfatorreducción requiere 8 electrones para que se lleve a cabo la reducción de sulfato ( $\text{S}^{6+}$ ) a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) el cual a su vez, puede encontrarse presente en forma de sulfuro de hidrógeno cuando se combina con el hidrógeno tal como se muestra en las Ec. 1.1 y 1.2 (Liamlean and Annachhatre, 2007).



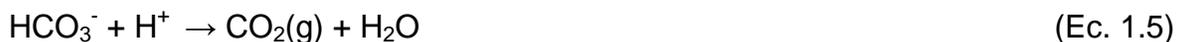
De manera general el proceso de sulfatorreducción puede representarse como se indica en la Ec. 1.3, donde el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) se reduce a sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y la materia orgánica ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) se oxida por acción microbiana, produciendo alcalinidad (bicarbonato). Este proceso lo llevan a cabo miembros de los Dominios Bacteria y Archaea que pueden utilizar el sulfato como aceptor terminal de electrones en su metabolismo energético; sin embargo, se utiliza el término bacterias sulfatorreductoras para referirse a aquellos microorganismos que tienen este rasgo metabólico, sin ser un taxon (Muyzer y Stams, 2008).



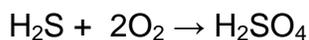
El sulfuro que se genera por la reducción del sulfato puede reaccionar con iones metálicos para producir precipitados de sulfuros metálicos (compuestos de solubilidad extremadamente baja) facilitando de esta manera la remoción de metales pesados que se encuentran en efluentes industriales, tal como se ilustra en la Ec. 1.4. Además, los iones de bicarbonato producidos en la oxidación sulfurogénica del donador de electrones (Ec. 1.3) incrementan el pH del agua residual como se muestra en la Ec. 1.5 (Kaksonen *et al.*, 2004a).



$\text{M}^{2+} = \text{Fe}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  entre otros.



Para llevar a cabo la remoción de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), teóricamente se requiere una relación mínima de materia orgánica, expresada como demanda química de oxígeno (DQO) y sulfato, g DQO/ g  $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.67, como se indica en la Ec. 1.6.



$$\text{g O}_2 \equiv \text{g DQO}$$

$$64 \text{ g O}_2 \equiv 64 \text{ g DQO}$$

$$\text{g SO}_4^{2-} \equiv 96 \text{ g}$$

Por lo tanto:

$$\frac{64 \text{ g DQO}}{96 \text{ g SO}_4^{2-}} = 0.67$$

(Ec. 1.6)

$$96 \text{ g SO}_4^{2-}$$

Frecuentemente, las aguas residuales ricas en sulfato como los drenados ácidos de mina son deficientes en donadores de electrones (materia orgánica) y en estos casos, es necesaria su adición externa para que se lleve a cabo la reducción del sulfato (Liamleam y Annachhatre, 2007).

## 1.2 Bacterias sulfatorreductoras (BSR)

Las bacterias sulfatorreductoras que llevan a cabo el proceso biológico de sulfatorreducción, son microorganismos que se encuentran en diferentes ambientes naturales tales como: sedimentos marinos, ventanas hidrotermales, tapetes microbianos salinos, acuíferos, sedimentos de agua dulce y rizosfera, entre otros. Además, están presentes en ambientes diseñados como las plantas de tratamiento de agua residual, y en lugares con valores de pH de 2 como los sitios de drenados ácidos de mina, y en lagunas de carbonato donde el pH puede ser hasta 10 (Muyzer y Stams, 2008).

Las BSR son microorganismos anaerobios que utilizan el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como último aceptor de electrones en el proceso de degradación de compuestos orgánicos, dando como resultado la producción de sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Ec.1.3); pueden utilizar otros aceptores de electrones además del sulfato, sulfito o tiosulfato en su metabolismo energético tales como: azufre elemental ( $\text{S}^0$ ), fumarato, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), dimetilsulfóxido, Mn (IV) y Fe (III) (Thauer *et al.*, 2007; López-Cortés *et al.*, 2006; Lens y Kuenen, 2001).

Por otra parte, los sustratos (donadores de electrones) que generalmente emplean las BSR son compuestos orgánicos de bajo peso molecular como: acetato, lactato, propionato, butirato y fumarato; también pueden usar glucosa, fructosa y etanol así como hidrógeno (Liamleam y Annachhatre, 2007). Sin embargo, compuestos orgánicos poliméricos como almidón, celulosa, proteínas,





Tabla 1.2 Propiedades morfológicas y fisiológicas de las bacterias sulfatorreductoras (Rabus *et al.*, 2006; Thauer *et al.*, 2007)

Género o especie	Morfología	Oxidación de los donadores de electrones	H <sub>2</sub>	Acetato	Propionato	AGV	Etanol	Lactato	Succinato malato	Fruc Gluc
<i>Desulfovibrio</i>	Vibrio	i	+	-	-	-	+	+	±	±
<i>Desulfobacter</i>	Oval o vibrio	CAC	±	+	-	-	±	+	-	-
<i>Desulfobulbus</i>	Oval	i	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>Desulfomicrobium</i>	Oval o bacilo	i	+	-	-	-	±	+	+	-
<i>Desulfobacterium</i>	Oval	CO	±	(+)	(±)	±	±	±	±	±
<i>Desulfococcus</i>	Coco	CO	-	(+)	+	+	+	+	-	-
<i>Desulfosarcina</i>	Oval o bacilo	CO	+	(+)	+	+	+	+	±	-
<i>Desulfonema</i>	Filamentos largos	c	(±)	(+)	+	+	-	±	+	-
<i>Desulfotomaculum</i>	Vibrio o bacilo	i ó CO	±	±	±	±	+	±	+	±
<i>Desulfobacter postgatei</i>	Coco o bacilo	CAC	-	+	nr	-	-	-	-	-
<i>Desulfobacca</i>	Oval	c	-	+	-	-	-	-	-	-

AGV, ácidos grasos volátiles; i, oxidación incompleta hasta acetato; c, oxidación completa hasta CO<sub>2</sub> por ruta desconocida; CAC, oxidación completa via ciclo del ácido cítrico; CO, oxidación completa vía monóxido de carbono deshidrogenasa/C1; nr, no reportado; +, utilizado; (+), pobremente utilizado; ±, utilizado o no utilizado; (±), pobremente utilizado o no; -, no utilizado. Fruc: fructosa; Glu: glucosa. En esta tabla no se incluyen Archaeas sulfatorreductoras ya que son microorganismos termófilos con temperaturas optimas de crecimiento mayores a 80°C.

### **1.3 Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)**

El reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) es un reactor de biopelícula anaerobio que se basa en el desarrollo de biopelículas sobre partículas que soportan el crecimiento bacteriano, esto permite retener la biomasa dentro del reactor y por lo tanto operar a cortos tiempos de retención hidráulica (TRH) (Celis *et al.*, 2009). Por otro lado, la actividad de la biomasa se considera un sistema hidrodinámico, que involucra un equilibrio entre el crecimiento y desprendimiento de la biopelícula.

Este tipo de reactor presenta ventajas en el tratamiento de aguas residuales sobre otros reactores anaerobios tales como una fácil separación de las fases sólida-líquida, y una alta concentración de biomasa con mayor actividad específica, lo cual lleva a un diseño de proceso más compacto y robusto (Nicoletta *et al.*, 2000). Asimismo, en este tipo de reactor se reducen los problemas por obstrucción que se presentan en un reactor de biopelícula de lecho fijo. Por otra parte, los reactores fluidificados han mostrado buenos resultados en relación a una biopelícula delgada con una alta actividad específica (Chan Choi *et al.*, 1995; Buffière y Moletta, 2000).

Los biorreactores sulfatorreductores para tratar aguas residuales de procesos industriales han llegado a ser una alternativa convencional del tratamiento químico para la remoción del sulfato. Los beneficios de un bioproceso de sulfatorreducción comparado con un tratamiento químico convencional son la remoción de metales solubles, sulfato y acidez así como la producción de menos lodo y productos de menor solubilidad comparado por ejemplo con la precipitación de hidróxidos (Kaksonen *et al.*, 2004a). El proceso de estos biorreactores se basa en la producción de sulfuro de hidrógeno por bacterias sulfatorreductoras, seguido por precipitación de metales y neutralización del agua por la alcalinidad producida por la oxidación microbiana del donador de electrones (Kaksonen *et al.*, 2004a; Gallegos-García *et al.*, 2009).

En la Tabla 1.3 se muestran algunos factores que influyen en el desempeño de un biorreactor sulfatorreductor.

Tabla 1.3 Factores que afectan la eficiencia de los biorreactores sulfatorreductores (Kaksonen y Puhakka, 2007).

Factor	Efecto
<b>Diseño del reactor</b>	
Área superficial disponible para microorganismos	Incrementa el potencial de las poblaciones de BSR activas y la cantidad de sulfato reducido.
<b>Composición microbiana</b>	
Especies	Condiciones de crecimiento óptimo, sustrato utilizado y tolerancia a compuestos tóxicos varía entre diferentes especies.
Propiedades de adhesión de los microorganismos	La capacidad de especies microbianas para colonizar gránulos de lodo o superficies es variable.
Tipo e historia del inóculo	Competencia entre BSR y otros microorganismos.
<b>Composición del afluente</b>	
Concentración de sulfato	Afecta el crecimiento y actividad de las BSR; BSR pueden no competir a bajas concentraciones de sulfato; Inhibición a alta concentración.
pH	Afecta el crecimiento y actividad de BSR; la disminución del pH incrementa la concentración de H <sub>2</sub> S libre; Alto pH (>8) puede favorecer las BSR sobre otros microorganismos; El pH afecta la configuración y diámetro de agregados de biomasa.
<b>Condiciones operacionales</b>	
Concentración de sustrato y carga orgánica	Afecta el crecimiento y actividad de las BSR; la sulfato reducción incrementa con el incremento de concentración de sustrato. Alta relación SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /sustrato favorece las BSR sobre otros microorganismos.
Tipo de sustrato	Etanol, propionato, butirato y glucosa pueden favorecer el crecimiento de BSR, sin embargo acetato y metanol pueden favorecer el crecimiento de metanógenos; lactato es bueno para obtener alta producción de biomasa de BSR; Etanol estimula la producción de sulfuro; Fermentación de glucosa puede disminuir el pH.
Concentración de H <sub>2</sub> S	Alta concentración de H <sub>2</sub> S puede inhibir el crecimiento de BSR o favorecer a las BSR sobre otros microorganismos.
Condiciones de agitación	El incremento en la agitación puede disminuir la captación de sustrato.
Tiempo de Residencia Hidráulica (TRH)	TRH corto puede llevar al lavado de biomasa y afectar la velocidad de sulfatorreducción

## 1.4 Biopelículas

Las biopelículas son comunidades microbianas que están espacialmente y metabólicamente estructuradas, rodeadas de una matriz polimérica producida por ellas mismas y adheridas a una superficie inerte o viva. Contiene espacios intersticiales o canales que proporcionan el medio para la circulación de nutrientes, así como el intercambio de productos metabólicos del interior al exterior de la biopelícula y viceversa (Costerton y Lewandowski, 1995). Por otro lado, una parte importante de la biopelícula son los exopolisacáridos (EPS, por sus siglas en inglés), que ayudan a los microorganismos a adherirse al soporte sólido, y los protege contra fuerzas de corte, deshidratación y sustancias tóxicas (Stoodley *et al.*, 2002). El desarrollo de una biopelícula consta de un proceso de cinco etapas como se ilustra en la Figura 1.2.

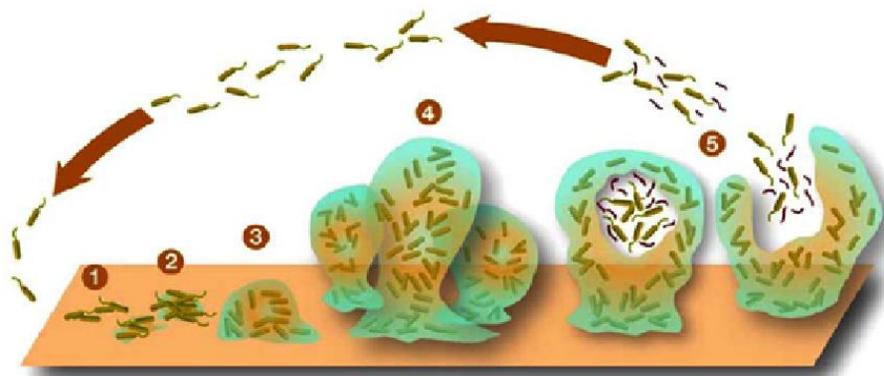


Figura 1.2 Diagrama del desarrollo de una biopelícula. 1. Adhesión inicial de las células a la superficie. 2. Producción de EPS ofreciendo fijación “irreversible” más firme de las células a la superficie. 3. Desarrollo temprano de la arquitectura de la biopelícula. 4. Maduración de la arquitectura de la biopelícula. 5. Dispersión de células de la biopelícula (Tomado de Stoodley *et al.*, 2002).

Las biopelículas pueden estar formadas de una población que se desarrolla a partir de especies únicas o una comunidad de múltiples especies microbianas (McLeod *et al.*, 1990). Sin embargo, la coexistencia de diferentes microorganismos en una biopelícula otorga beneficios tales como asociaciones sintróficas estables que se caracterizan por ser procesos metabólicos en los que dos o más

microorganismos cooperan para llevar a cabo un proceso que un solo microorganismo no podría realizar. No obstante, debido a la variedad de microorganismos presentes en la biopelícula también puede existir competencia por un mismo sustrato en presencia de un aceptor de electrones específico (Thauer *et al.*, 2007).

El desarrollo de una biopelícula es el resultado de diferentes fenómenos tales como la adhesión de los microorganismos a la superficie sólida, adsorción y desorción de microorganismos, así como crecimiento y desprendimiento de la biopelícula (Cresson *et al.*, 2006). Por otra parte, el desarrollo de una biopelícula y su dinámica poblacional se han identificado en términos de consorcios sintróficos compuestos de diferentes especies de microorganismos (Zellner *et al.*, 1991; Araki y Harada, 1994).

En los últimos años, con el fin de caracterizar las comunidades microbianas presentes en las biopelículas y lodos granulares, se han hecho estudios de biología molecular que incluyen la obtención de secuencias de ADN que codifican para el ARNr 16S, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Con estas técnicas se demostró por ejemplo, que lodos granulares mesófilos y termófilos expuestos a sustratos similares (sucrosa, acetato y propionato) presentaron diferencia en la diversidad microbiana (Sekiguchi *et al.*, 1998).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El reactor anaerobio de lecho fluidificado inverso (LFI) presenta ventajas sobre otro tipo de reactores ya que se lleva a cabo la precipitación de metales y su recuperación, debido a que en este tipo de reactor los precipitados sulfúricos de metales y la biomasa se recuperan en una sola unidad, como se demostró por Gallegos-García *et al.* (2009). Sin embargo, una desventaja de este reactor es que el periodo de arranque, durante el cual se forma la biopelícula sobre el soporte, suele ser largo.

La duración del periodo de arranque de un reactor sulfurogénico de lecho fluidificado inverso (LFI) con biopelículas anaerobias no está definida y en experimentos anteriores dicho periodo consistía en operar el reactor en lote entre 45 y 50 días. Esta forma de operar suponía que a mayor tiempo se incrementaría la formación de biopelícula microbiana. Sin embargo, se ha demostrado que operar el reactor en lote por largo tiempo implica que los microorganismos suspendidos en la columna de agua compitan con los microorganismos adheridos al soporte por el sustrato, ocasionando así un largo tiempo para la formación de biopelícula en el reactor (Cresson *et al.*, 2006).

Por otra parte, estudios han demostrado que el desempeño estable de un reactor anaerobio y eventualmente su escalamiento depende ampliamente del establecimiento de una comunidad microbiana apropiada durante el arranque, que está en función del tipo de inóculo que se emplee debido a su diversidad microbiana y dinámica poblacional (McMahon *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2008).

Por lo anterior, para poder entender y posiblemente manejar las asociaciones sintróficas microbianas en una biopelícula sulfatorreductora, es necesario estudiar los microorganismos que se adhieren y crecen sobre un soporte, bajo condiciones específicas de operación en el arranque de un reactor de biopelícula (LFI).

### **3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **3.1. Objetivo general**

Utilizar diferentes inóculos y sustratos para la formación de biopelículas sulfatorreductoras en el arranque de un reactor anaerobio de lecho fluidificado inverso (LFI) sin ser operado en lote por largo tiempo.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Analizar la influencia que tiene el sustrato sobre el desarrollo de diferentes grupos filogenéticos de microorganismos durante la formación de la biopelícula, a partir de diferentes inóculos, y cómo esto repercute en el desempeño del reactor operado bajo las mismas condiciones.

Evaluar el desarrollo de la biopelícula determinando la actividad de las BSR oxidadoras incompletas y completas.

Identificar mediante técnicas moleculares los diferentes grupos filogenéticos de microorganismos presentes en los lodos granulares (inóculos) y en las biopelículas formadas.

#### **3.3 Hipótesis**

El arranque de un reactor de biopelícula operado en lote requiere de largos tiempos de operación en lote (45-50 días), entonces se espera disminuir el periodo de arranque de dicho reactor de biopelícula si se opera en continuo.

Si, existen bacterias sulfatorreductoras, que pueden emplear diferentes sustratos orgánicos de cadena corta, entonces se espera obtener diferentes tipos de biopelículas microbianas con miembros de bacterias sulfatorreductoras cuando se emplean sustratos orgánicos de cadena corta.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Reactor de lecho fluidificado inverso (LFI)

Los experimentos en régimen continuo se realizaron en un reactor de lecho fluidificado inverso cuyas características son las siguientes: 86 cm de altura, 40 mm diámetro interno, y volumen activo de 1.385 L. Se utilizó un separador de fases que sirve también para ajustar el nivel del líquido. En la Figura 4.1 se ilustra el diagrama del reactor LFI empleado.

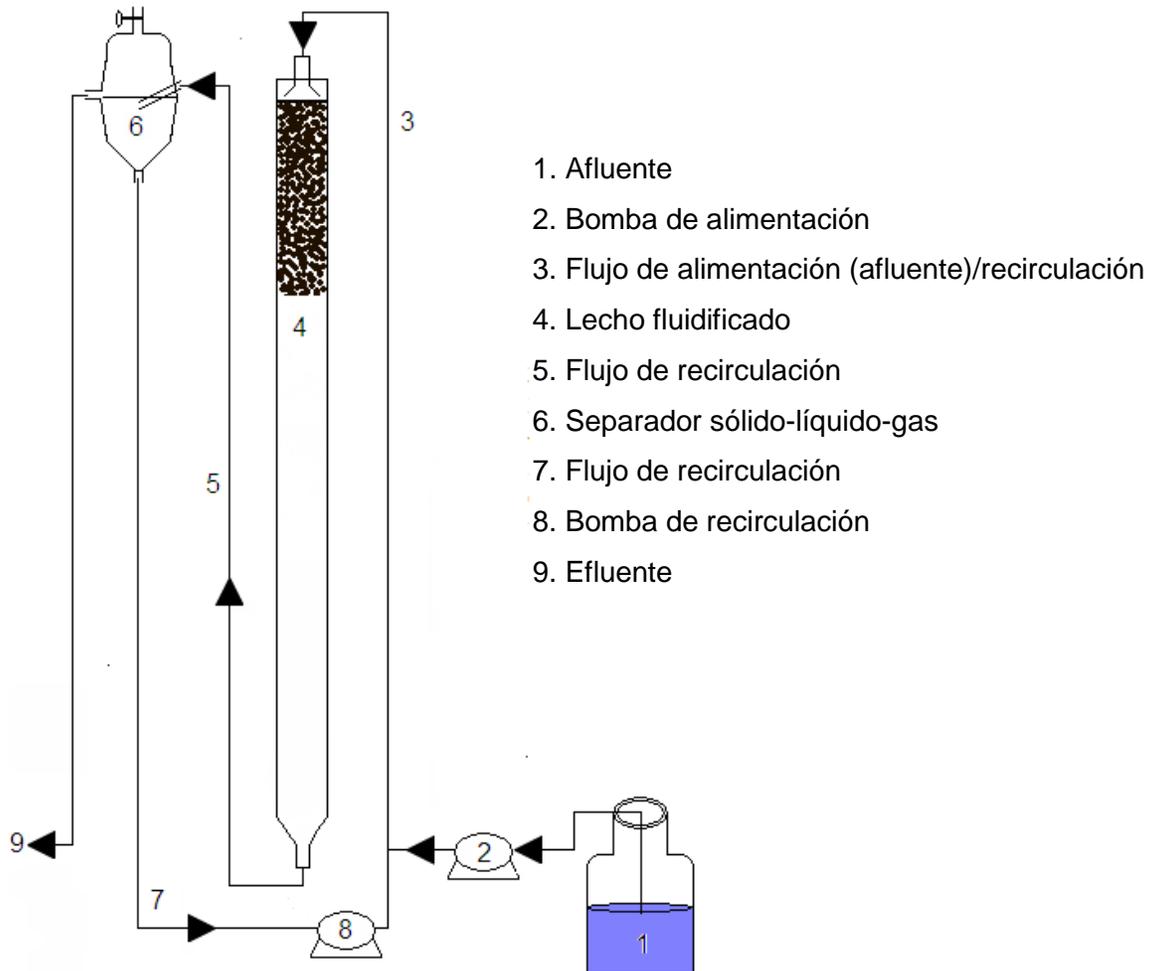


Figura 4.1 Diagrama del reactor anaerobio de lecho fluidificado inverso (LFI).

Se usaron bombas peristálticas marca MasterFlex para la alimentación y recirculación del efluente. El soporte acarreador empleado fue polietileno de baja densidad (diámetro promedio 500 micrómetros y densidad aparente de 400 Kg/m<sup>3</sup>). El soporte que se añadió al reactor ocupaba 25% del volumen de la columna. Antes de su adición, el soporte se acondicionó poniéndolo en un matraz de 1 L que contenía 0.5 L de agua destilada, 0.2 g de extracto de levadura y 0.2 g de peptona de caseína. Se mantuvo en agitación por 48 h con un agitador magnético a velocidad moderada. Una vez acondicionado, el soporte se añadió por la parte superior del reactor para después ser inoculado con lodo granular disgregado.

En este reactor se realizaron cuatro experimentos independientes (I, II, III y IV). Cada experimento se inició con soporte limpio y éste se fluidificó a lo largo de la columna por recirculación del efluente con un flujo de 200 mL/min, para alcanzar una velocidad superficial de 9.5 m/h. La velocidad de recirculación mantuvo condiciones de mezclado dentro del reactor.

#### **4.1.2. Condiciones de operación del reactor LFI**

En cada experimento (I, II, III y IV) el reactor se llenó con medio basal (Sección 4.1.4.2) y 0.5 g DQO/L de la mezcla de sustratos que se muestran en la Tabla 4.1 y se adicionó sulfato de sodio como aceptor de electrones. El reactor en cada experimento (I, II, III y IV) se operó en lote por 48 h después de ser inoculado, y posteriormente se operó en continuo con los sustratos que se muestran en la Tabla 4.1. La fluidificación del soporte en el reactor se mantuvo mediante recirculación del líquido para tener una expansión del lecho aproximadamente de 40-50% del volumen de la columna. El reactor se inoculó con la fuente de biomasa descrita en la sección 4.1.3. Se utilizaron 26 mL de lodo de una maltera para el experimento I, 31 mL de lodo de una industria dulcera para el experimento II y III, y 26 mL de una industria papelera en el experimento IV; esto con la finalidad de tener en cada experimento una concentración de 1.6 g SSV/L. La carga de DQO y sulfato expresadas en g DQO/L-d y g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d del afluente,

relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, TRH y pH del afluente se muestran en la Tabla 4.1 para cada experimento.

Tabla 4.1 Condiciones operacionales del reactor LFI en los experimentos I, II, III y IV.

	I	II	III	IV
Inóculo*	Maltera	Dulcera	Dulcera	Papelera
Sustrato	Ac-Lac	Ac-Glu	Ac-Lac	Ac-Lac
Relación	70:30	70:30	70:30	70:30
Carga orgánica (g DQO/L-d)	0.62 ± 0.2	0.96 ± 0.06	0.88 ± 0.06	0.94 ± 0.07
Carga de sulfato (g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L-d)	1.13 ± 0.3	1.4 ± 0.08	1.4 ± 0.07	1.4 ± 0.1
DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.55	0.68	0.62	0.67
TRH (d)	1.1	1	1	1
pH afluente	6 ± 0.05	6.5 ± 0.08	6	6
Tiempo de operación (d)	44	30	31	33

\* Lodo granular obtenido de reactores UASB de las industrias referidas.

Ac- Acético, Lac- Láctico, Glu- Glucosa

### 4.1.3 Fuente de biomasa

#### 4.1.3.1 Inóculo para el experimento I

El reactor LFI se inoculó con lodo granular proveniente de una planta de tratamiento de efluentes de una industria maltera (LM) que se mantuvo bajo condiciones de sulfatorreducción en un reactor UASB por más de 100 d. El lodo estuvo almacenado a 4°C y posteriormente se aclimató en un frasco de 2 L a temperatura ambiente durante un periodo de 2 semanas con 1 g DQO/L de mezcla glucosa-acetato-lactato-etanol-propionato en relación (1:1:1:1:1). El lodo granular contenía 0.088 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV) por gramo de lodo en base húmeda. El lodo se disgregó haciéndolo pasar varias veces por una jeringa bajo una corriente de gas N<sub>2</sub> (99%), y se tomaron 26 mL de lodo para inocular el reactor y obtener una concentración de 1.6 g SSV/L.

#### **4.1.3.2 Inóculo para los experimentos II y III**

En los experimentos II y III se utilizó como inóculo lodo granular proveniente de la planta de tratamiento anaerobia de la industria dulcera Ricolino. Este lodo, en lo sucesivo lodo Ricolino (LR), estuvo bajo condiciones de sulfatorreducción en un reactor UASB durante aproximadamente 100 d para el experimento II y 15 días para el experimento III respectivamente, con 1 g DQO/L de una mezcla glucosa-acetato-lactato-etanol-propionato en relación (1:1:1:1:1). El lodo granular contenía 0.07 g sólidos suspendidos volátiles (SSV) por gramo de lodo en base húmeda. El lodo se disgregó como se mencionó anteriormente y se tomaron 31 mL para inocular el reactor y obtener una concentración de 1.6 g SSV/L.

#### **4.1.3.3 Inóculo para el experimento IV**

En el experimento IV se utilizó lodo granular sulfatorreductor proveniente de una industria papelera (Eerbeek), Holanda. Este lodo, en lo sucesivo lodo Eerbeek (LE), estuvo almacenado a 4°C y posteriormente se aclimató en un frasco de 1 L a temperatura ambiente durante un periodo de 1 semana con 1 g DQO/L de mezcla glucosa-acetato-lactato-etanol-propionato en relación (1:1:1:1:1) y bajo condiciones de sulfatorreducción. El lodo granular contenía 0.087 g sólidos suspendidos volátiles (SSV) por gramo de lodo en base húmeda. El lodo se disgregó como se mencionó en la sección 4.1.3.1 y se tomaron 26 mL para inocular el reactor y obtener una concentración de 1.6 g SSV/L.

#### **4.1.4 Medios de cultivo**

##### **4.1.4.1 Medio de alimentación del reactor UASB**

El reactor UASB que se usó para mantener el inóculo en condiciones de sulfatorreducción se alimentó con el siguiente medio (mg/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (300),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (15),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (200),  $\text{KCl}$  (250),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (150), extracto de levadura (20) y 1 mL/L de solución de elementos traza. Este medio también contenía 1.85 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ /L, y el sustrato o fuente de carbono se adicionó en una

concentración de 1 g DQO/L a partir de una mezcla de glucosa-acetato-lactato-etanol-propionato en relación (1:1:1:1:1) para tener una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.8. El pH del medio se ajustó a 7 con bicarbonato de sodio.

#### **4.1.4.2 Medio de alimentación del reactor LFI**

El reactor LFI se alimentó con medio líquido basal cuya composición fue la siguiente (mg/L):  $NH_4Cl$  (300),  $KH_2PO_4$  (200),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (10),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (150), extracto de levadura (10) y 1 mL/L de solución de elementos traza. Al medio basal de alimentación se le adicionaron los sustratos correspondientes para cada uno de los experimentos (Tabla 4.1) y sulfato de sodio como fuente de sulfato. El pH del medio se ajustó a 6 con bicarbonato de sodio.

#### **4.1.4.3 Medio basal para determinar la actividad sulfatorreductora, fermentativa y metanogénica**

El medio basal empleado para determinar las actividades sulfatorreductora y fermentativa estaba compuesto por (mg/L):  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (703),  $K_2HPO_4$  (600),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (83),  $NaHCO_3$  (1000), extracto de levadura (20),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (10) y  $NH_4Cl$  (280). El pH del medio se ajustó a 7.0 con bicarbonato de sodio o HCl.

Para la actividad metanogénica, el medio mineral se preparó idéntico al anterior pero con la adición de 1 mL/L de solución de elementos traza.

#### **4.1.4.4 Solución de elementos traza**

La solución de elementos traza tenía la siguiente composición (mg/L):  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  (1500),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (100), EDTA (500),  $H_3BO_3$  (62),  $ZnCl_2$  (70),  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  (36),  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  (40),  $NiCl_3 \cdot 6H_2O$  (24),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (70),  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (20), HCl 36% (1 mL),  $Na_2SeO_3$  (100) y resazurina (500) como indicador de condiciones redox.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Actividad sulfatorreductora del lodo granular**

La actividad sulfatorreductora específica (ASR) se define como la máxima capacidad de reducción de sulfato por la biomasa y se determina utilizando la velocidad de producción de sulfuro o la remoción de sulfato expresada como DQO, bajo condiciones óptimas de crecimiento, con respecto al contenido de sólidos suspendidos volátiles en el lodo (g DQO H<sub>2</sub>S/g SSV-día). Esta actividad se realizó en botellas serológicas de 60 mL de capacidad que contenían 50 mL de medio mineral (Sección 4.1.4.3) y lodo granular a una concentración de 1 g SSV/L. Esta actividad se ensayó con acetato, lactato o etanol con una concentración de 1 g DQO/L y sulfato de sodio como aceptor de electrones para tener una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.7. Las botellas se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio, la atmósfera se intercambió con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 v/v) por 1 min para tener condiciones anaerobias; para equilibrar la fase gaseosa de las botellas a la presión atmosférica, el exceso de gas se purgó mediante una manguera conectada a un recipiente con agua. Las botellas se incubaron a 35 ± 2°C. Se utilizó ácido 2-bromoetanosulfónico (BESA) 6330 mg/L para inhibir la actividad metanogénica en las botellas que contenían acetato. Se usó un control para corregir la producción de sulfuro debido a la respiración endógena que consistía en una botella serológica con la misma concentración de SSV y medio basal pero sin sustrato. La cantidad de sulfuro disuelto en las botellas se determinó durante un periodo de 72 h a intervalos de tiempo de 2 a 3 h en un espectrofotómetro de acuerdo a la técnica descrita por Cord-Ruwisch (1985) (Sección 4.3.4). La actividad sulfatorreductora se calculó con la pendiente obtenida durante la fase exponencial al graficar la concentración de sulfuro total producido contra el tiempo y la concentración de SSV en la botella.

### **4.2.2 Actividad metanogénica del lodo granular**

La actividad metanogénica específica (AM) se define como la velocidad de producción de metano por el lodo granular, expresado como DQO bajo

condiciones óptimas y respecto al contenido de sólidos suspendidos volátiles en el lodo (g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-día). Para determinar la actividad metanogénica del lodo granular se emplearon botellas serológicas de 60 mL de capacidad con 30 mL de medio basal (Sección 4.1.4.3) y una concentración de 1 g SSV/L, se utilizó acetato como sustrato con una concentración de 1.5 g DQO/L. Las botellas se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio. La atmósfera de las botellas se intercambiaba con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 v/v) por 1 min para tener condiciones anaerobias y el exceso de gas se purgó en un recipiente con agua, mediante una aguja conectada a una manguera. Las botellas se incubaron a 35 ± 2°C durante 72 h, después de este tiempo se decantó el medio de las botellas y se repuso con medio mineral nuevo y sustrato (acetato) a una concentración de 1 g DQO/L. Se realizó nuevamente el intercambio de atmósfera como se mencionó anteriormente y las botellas se mantuvieron en incubación a 35 ± 2°C. Se realizó un control, en el que la botella contenía las mismas cantidades de inóculo y medio mineral pero sin sustrato, para corregir la producción de metano por respiración endógena. La cantidad de metano producido en las botellas se determinó por desplazamiento de volumen de una solución de NaOH al 3%, a intervalos de tiempo entre 2 y 3 h durante un periodo de 72 h. La actividad metanogénica se calculó a partir de la pendiente del volumen acumulado de metano producido a través del tiempo y dividida entre la concentración de SSV en la botella.

#### **4.2.3 Actividad fermentativa del lodo granular**

Para determinar la actividad fermentativa específica (AF) del lodo granular se emplearon botellas serológicas de 60 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio basal (Sección 4.1.4.3) y lodo granular a una concentración de 1 g SSV/L, se utilizó glucosa como sustrato con una concentración de 1 g DQO/L. Se usó ácido 2-bromoetanosulfónico (BESA) 6330 mg/L para inhibir la posible actividad metanogénica en las botellas. La atmósfera se intercambiaba con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 v/v) por 1 min para tener condiciones anaerobias; para equilibrar la fase gaseosa de las botellas a la presión atmosférica, el exceso de gas se purgó mediante una manguera conectada a un recipiente con agua. Se incubó a 35 ± 2°C. La cantidad

de CO<sub>2</sub> producido en las botellas se determinó por desplazamiento de volumen de una solución de NaCl saturada (300 g/L) a diferentes intervalos de tiempo durante un periodo de 3-5 d. La actividad fermentativa se calculó graficando la pendiente del volumen acumulado de dióxido de carbono producido a través del tiempo y dividida entre la concentración de SSV en la botella.

#### **4.2.4 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula**

La actividad sulfatorreductora específica de la biopelícula se determinó mediante la velocidad de producción de sulfuro y los sólidos volátiles inmovilizados (SVI) en el soporte. Esta actividad se determinó a diferentes tiempos de operación del reactor. Se utilizaron botellas serológicas de 60 mL de capacidad con 53 mL de medio basal (Sección 4.1.4.3). Los sustratos que se usaron de manera individual fueron: acetato, lactato o etanol para los experimentos I, III y IV, y acetato, glucosa o etanol para el experimento II con una concentración de 1 g DQO/L y sulfato de sodio como aceptor de electrones para tener una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.7. Como inóculo se tomaron 5 mL de soporte del reactor y las botellas se sellaron de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.1 y se incubaron a 30°C con agitación a 120 rpm por un periodo de 72 h. La producción de sulfuro se siguió de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.1. Al concluir se determinaron los sólidos volátiles adheridos al soporte (Sección 4.3.1) y la actividad sulfatorreductora de la biopelícula se calculó mediante la pendiente de la curva de producción de sulfuro (concentración de sulfuro vs. tiempo) y el contenido de sólidos volátiles adheridos al soporte en cada botella.

#### **4.2.5 Actividad metanogénica de la biopelícula**

La actividad metanogénica específica de la biopelícula al final de la operación del reactor, se realizó por duplicado en botellas serológicas de 60 mL, las cuales contenían 30 mL de medio basal (Sección 4.1.4.3), como inóculo se utilizaron 5 mL de soporte del reactor por botella. Como sustrato se utilizó ácido acético a una concentración de 1 g DQO/L y se ajustó el pH del medio a 7. Las botellas se

sellaron de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.2 y se incubaron a 30°C con agitación a 120 rpm por un periodo de 72 h. La producción de metano se siguió de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.2. Al concluir se determinaron los sólidos volátiles adheridos al soporte (Sección 4.3.1) y la actividad metanogénica se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar el volumen acumulado de metano producido contra. el tiempo y dividida entre la concentración de SSV en la botella.

#### **4.2.6 Actividad fermentativa de la biopelícula**

La actividad fermentativa específica de la biopelícula al final de la operación del LFI se realizó por duplicado en botellas serológicas de 60 mL, las cuales contenían 30 mL de medio basal (Sección 4.1.4.3), como inóculo se utilizaron 5 mL de soporte del reactor por botella. Como sustrato se utilizó glucosa a una concentración de 1 g DQO/L. Se utilizó ácido 2-bromoetanosulfónico (BESA) a una concentración de 6330 mg/L para inhibir la posible actividad metanogénica en las botellas y se ajustó el pH del medio a 7. Las botellas se sellaron de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.3 y se incubaron a 30°C con agitación a 120 rpm por un periodo de 3-5 d. Al concluir se determinaron los sólidos volátiles adheridos al soporte (Sección 4.3.1) y la actividad fermentativa se calculó a partir de la pendiente obtenida de la curva de producción de dióxido de carbono producido a través del tiempo y dividida entre la concentración de SSV en la botella.

#### **4.2.7 Análisis de la comunidad microbiana**

Para llevar a cabo el análisis de la comunidad microbiana se realizó la extracción de ADN de los lodos granulares que se usaron como inóculos, así como el ADN de las muestras de biopelículas que se tomaron a diferentes intervalos de tiempo durante la operación del reactor LFI en los experimentos I, II, III y IV (sección 4.2.7.1 y 4.2.7.2). Posteriormente se realizó la amplificación parcial del gen bacteriano ARNr 16S mediante el uso de la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) (sección 4.2.7.3), y por último se empleó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (sección 4.2.7.4).

#### **4.2.7.1 Extracción de ADN genómico del lodo granular**

La extracción de ADN del lodo granular que se utilizó como inóculo en los experimentos I, II, III y IV se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Wisotzkey *et al.* (1990) y Sekiguchi *et al.* (1998), los cuales se optimizaron para aplicarse a las muestras. Se colocaron 400  $\mu$ L de lodo granular en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 7000g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante líquido, el lodo se disgregó machacándolo con la ayuda de una punta estéril con el orificio sellado, simulando un pequeño mortero. Se resuspendió en 500  $\mu$ L de solución salina de fosfatos 1X (10 mM, pH 7.5) y se centrifugó a 7000g durante 10 min. El sobrenadante se decantó y de nuevo se añadieron 500  $\mu$ L de solución salina de fosfatos 1X (10 mM, pH 7.5) y se centrifugó a 7000g durante 10 min. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de buffer de extracción (10 mM Tris/HCl, pH 7.5; 50 mM EDTA; 0.5 M NaCl) y se colocó en un baño sónico durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 10  $\mu$ L de RNAsa (stock 20 mg/mL) y se mezcló, 20  $\mu$ L de lisozima (stock 20 mg/mL) y 15  $\mu$ L de proteinasa K (stock 20 mg/mL), se mezcló y se incubó a 37°C en agitación a 350 rpm por 2 h. A continuación se adicionaron 100  $\mu$ L de solución SDS (10%) y 200  $\mu$ L de acetato de sodio (5M, pH 8) y se incubó a 60°C por 10 min. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1 v/v), se mezcló y centrifugó a 7000g por 10 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo estéril de 1.5 mL y como se observó que la interface estaba muy turbia (color café) se le adicionaron 200  $\mu$ L de acetato de sodio (5M, pH 8) y se incubó a 60°C por 10 min, posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1 v/v), se mezcló y centrifugó a 7000g por 10 min (esto se repitió hasta que la interface que se forma fue color blanco). Una vez que la interface era color blanco, el sobrenadante se recuperó en un tubo estéril y se adicionó un volumen de etanol frío (-20°C), la muestra se colocó a -20°C durante 2 h. Después se centrifugó a 7000g a 4°C por 20 min. El pellet se lavó con etanol (100%) invirtiendo el tubo

suavemente, se centrifugó a 7000g por 1 min, el sobrenadante se decantó y se volvió a lavar el pellet con etanol-agua (70/30 v/v), se centrifugó de nuevo a 7000g por 1 min. El sobrenadante se decantó y el pellet se secó a 60°C por 20 min y se resuspendió en 50 µL de agua milliQ estéril y se almacenó a -20°C. El análisis de integridad del ADN se realizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### **4.2.7.2 Extracción de ADN genómico de la biopelícula**

El ADN total de la biopelícula se extrajo de muestras de soporte del reactor LFI tomadas a diferentes intervalos de tiempo para revelar los cambios en la comunidad microbiana a través de tiempo. Las muestras fueron almacenadas a -20°C. La extracción de ADN de la biopelícula se realizó de acuerdo al protocolo de Wisotzkey *et al.* (1990) modificado. Se partió de 3 mL de muestra de soporte contenida en un tubo tipo Falcon de 15 mL; se centrifugó a 3500g por 10-15 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 0.5 mL de EDTA-salino pH 8.0. Se añadieron 20 µL de lisozima (10 µL/µL) y se incubó a 37°C con agitación durante 1h, después se adicionaron 15 µL de RNAsa (0.5 mg/mL) y se incubó a 37°C con agitación por 1h, posteriormente se añadieron 25 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó a 37°C con agitación por 1 h. A continuación se añadieron 600 µL de SDS (10%) y 1200 µL de acetato de sodio (5M, pH 8) y se incubaron a 60°C por 10 min. Se añadió un volumen de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), se mezcló y centrifugó a 7000g por 5 min. El sobrenadante resultante se recuperó y se transfirió a tubos limpios donde se añadieron 2 volúmenes de etanol 100% y se incubó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 3500g por 15 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Como la pastilla que se observó era grande se lavó con 3 mL de etanol-agua (70/30 v/v) y se centrifugó a 3500g por 5 min. El sobrenadante se eliminó y se secó la pastilla a 60°C durante 30 min aproximadamente. El ADN se resuspendió en agua mili Q entre (50-100 µL) y se pasó a tubos estériles de 1.5 mL. El análisis de integridad del ADN se realizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### 4.2.7.3 Amplificación del ADN por PCR

Las muestras de ADN genómico se utilizaron como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para las muestras de lodo granular se realizaron diluciones 1:40 y para las muestras de ADN extraído del soporte se realizaron diluciones 1:10 del extracto de ADN. Los fragmentos de genes bacterianos del ARNr 16S correspondientes a las posiciones 341-926 (de acuerdo al sistema de numeración de *E. coli*) se amplificaron usando el par de oligos 357F-GC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), y el oligo 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3'). El oligo 357F-GC tenía en el extremo 5' un nucleótido de 40 pares de bases rico en GC, la secuencia de GC era (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCAGGGGGG (Kaksonen *et al.*, 2004b). La amplificación de PCR se realizó en volúmenes de 50  $\mu$ L que contenían: 2  $\mu$ L de ADN molde, 1  $\mu$ L de cada oligo (10 pM), 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5  $\mu$ L de buffer de reacción (10X), 1  $\mu$ L de dNTP's (10 mM de cada uno, dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y 0.2  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (5U/  $\mu$ L, abm Inc). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min seguido por 10 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento de los primers a 65°C por 45 s (disminuyendo la temperatura 1°C en cada ciclo) y extensión de primer a 72°C por 45 s. Además, 25 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C por 1 min y 72°C por 45 s con una extensión final a 72°C por 7 min. La presencia de producto de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para evaluar el tamaño de la secuencia y pureza previo al análisis de DGGE.

#### 4.2.7.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

El DGGE es una técnica de huella o rastreo molecular donde comunidades microbianas complejas pueden analizarse de manera rápida. En el DGGE fragmentos de ADN de la misma longitud pero con diferentes secuencias de pares de bases pueden separarse dependiendo de su punto de desnaturalización (Muyzer *et al.*, 1993). Por lo tanto, para analizar la comunidad microbiana presente

en los lodos granulares y en las biopelículas de los experimentos I, II, III y IV se empleó esta técnica.

El DGGE se realizó utilizando un sistema de detección de mutación universal Dcode™ (BioRad, Hercules, California, USA). Las muestras de PCR (alícuotas de 80 µL) se cargaron en un gel de poliacrilamida al 8% de 1mm de espesor con un gradiente lineal desnaturalizante (formamida y urea) de 30 a 60%. La electroforesis se llevó a cabo aplicando un voltaje de 70V al gel sumergido en buffer TAE 1X (20 mM Tris-acetate; acetato de sodio 10 mM; EDTA 0.5 mM, pH 8) por 20 h a 60°C. Después de la electroforesis el gel se tiñó por 1 h utilizando SYBR (Safe DNA gel stain 1X), se lavó con agua MilliQ por 10 min y se documentó con un transiluminador UV (BioRad, Hercules, California, USA). Las bandas dominantes se cortaron del gel y se eluyeron en 20 µL de agua MilliQ a 4°C durante toda la noche. El DNA eluido se amplificó por PCR utilizando el par de oligos 357F y 907R. Los productos de PCR de la amplificación se enviaron para secuenciación al servicio de secuenciación del CINVESTAV (Irapuato, Gto).

#### **4.2.7.5 Análisis de secuencias y filogenia**

Todas las secuencias que se obtuvieron en este trabajo se compararon con la base de datos usando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para identificar las secuencias más cercanas. El Blast realiza un alineamiento con una base de datos y reporta un análisis de similitud que orienta acerca de la filiación taxonómica más próxima de la secuencia lanzada, e indica el parámetro de similitud dado en porcentaje y una lista con los taxos más afines según el alineamiento recopilado.

Para construir el árbol filogenético se usó el paquete Phyl-MEGA, y se realizó un alineamiento con ClustalX. El método que se usó fue Neighbor-joining con bootstrap de 1000 para obtener el árbol con la máxima confiabilidad.

### **4.3 Análisis**

#### **4.3.1 Cuantificación de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos volátiles inmovilizados (SVI)**

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos fijos en el lodo granular se determinaron por el método gravimétrico de acuerdo a lo descrito en los métodos estándar (APHA, 1998). Se pusieron a peso constante dos cápsulas de porcelana durante 1 h a 550°C y enseguida se agregaron de 2 a 3 g de lodo granular en base húmeda. Los sólidos suspendidos totales se midieron después de dejar secar las cápsulas a 105°C durante 12 h, el contenido de sólidos suspendidos fijos se midió después de 30 min a 550°C para calcinar el residuo seco. Los sólidos suspendidos volátiles se calcularon mediante la diferencia entre los sólidos totales y los sólidos fijos.

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el efluente se determinaron pasando 10 mL de muestra del efluente a través de un filtro de fibra de vidrio a peso constante y dejándolo secar a 105°C por 1 h, posteriormente la muestra se calcinó durante 20 min a 550°C. El contenido de sólidos suspendidos volátiles se calculó de la diferencia de los sólidos totales y sólidos fijos.

Los sólidos volátiles adheridos al soporte se reportan como sólidos volátiles inmovilizados (SVI) por volumen de soporte (g SVI/L soporte). Para determinar los SVI, el líquido de las botellas serológicas empleadas para la actividad sulfato reductora se filtró mediante un filtro de fibra de vidrio a peso constante, posteriormente se adicionaron 10 mL de agua destilada a la botella con soporte y se colocó en un sonicador durante 1 h. Se extrajo el líquido de la botella y se filtró nuevamente, esta operación se repitió hasta que no se observaron residuos de biomasa en el soporte. Los filtros se secaron y calcinaron de la misma forma que para la determinación de los sólidos suspendidos en el efluente.

#### **4.3.2 Cuantificación de sulfato y ácidos grasos volátiles (AGV)**

El sulfato y los ácidos grasos volátiles (AGV), acetato y lactato así como la glucosa se determinaron en un sistema de electroforesis capilar marca Agilent

1600A. Las muestras se centrifugaron a 7000g durante 5 minutos y se filtraron con una membrana de 0.22 µm y 13 mm de diámetro. Se utilizó un capilar de 50µm de diámetro interno y 72 cm de longitud. La muestra se inyectó con una presión de 50 mbar por 4 segundos. El voltaje aplicado fue de -30kV y la temperatura utilizada para el capilar fue de 20°C. La señal fue detectada a una longitud de onda de 300 nm con una referencia de 245 nm. El tiempo de análisis fue de 7 min. El agua que se empleó para los análisis fue desionizada para evitar la intervención de otros posibles iones presentes en el agua y que pudieran afectar los resultados. Se construyó una curva estándar para los aniones de interés utilizando sulfato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio y glucosa, todos con una pureza de 99%. Se usaron concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm para cada uno de los aniones. A partir de la curva estándar se determinó la concentración de sulfato, acetato, lactato y glucosa, de las muestras del afluente y efluente. El control del sistema, captura y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el uso del software ChemStation B.01.03 (204).

#### 4.3.3 Cuantificación de sulfuro disuelto

La producción de sulfuro se determinó por el método yodométrico (APHA, 1998) haciendo reaccionar el yodo con el sulfuro en un medio ácido. Este método se basa en la capacidad del yodo como oxidante débil con un reductor fuerte como el sulfuro en medio ácido. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 10 mL de agua destilada, 10 mL de una solución de yodo 0.025 N previamente valorada y 5 mL de muestra (efluente); posteriormente se adicionaron 5 gotas de solución de almidón (1%), la mezcla se homogenizó perfectamente y se tituló con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.025 N. Este método es confiable para concentraciones mayores a 1 mg/L. La concentración de sulfuro se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{mgS^{2-}}{L} = \frac{(N_y * Y) - (N_T * T) * F}{V_m} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde:

$N_y$  = Normalidad del yodo  
 $Y$  = Volumen de yodo (mL)  
 $N_T$  = Normalidad del tiosulfato de sodio (mL)  
 $T$  = Volumen de tiosulfato gastado (mL)  
 $V_m$  = Volumen de la muestra (mL)  
 $F$  = Factor de conversión (16,000)

#### **4.3.4 Cuantificación del sulfuro por el método Cord-Ruwisch**

En un tubo Hach se adicionaron 4 mL de una solución que contenía sulfato de cobre (5 mM) y HCl (50 mM), posteriormente con una jeringa de 1 mL se adicionó 0.1 mL de muestra y se agitó en un vortex por 3 segundos e inmediatamente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic) a una longitud de onda de 480 nm. Se realizó una curva estándar de sulfuro de sodio desde 0 hasta 20 mM y con la ecuación de la recta obtenida se cuantificó la concentración de sulfuro en milimol por litro.

#### **4.3.5 Determinación del pH**

El pH del afluente y efluente se determinaron utilizando un potenciómetro marca Thermo Orion modelo 720 A y un electrodo marca Thermo Orion modelo 8256. Antes de medir el pH el equipo se calibró con soluciones de pH 4.1, 7.0 y 10.1.

#### **4.3.6 Cuantificación de la alcalinidad**

Para determinar la alcalinidad se utilizó el método volumétrico empleando 10 mL de muestra y mediante un potenciómetro y un electrodo la muestra se tituló con una solución de HCl 0.1 N hasta llegar a un pH de 5.8 (alcalinidad del bicarbonato), se registró el volumen gastado y se continuó valorando la muestra hasta alcanzar un pH de 4.3 (alcalinidad total), de igual manera se anotó el volumen total de ácido gastado. Los cálculos para la determinación de la alcalinidad total expresada en mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  son los siguientes:

$$\frac{mgCaCO_3}{L} = \frac{(V_{4.3} * EQ * N)}{Vm} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

donde:

$V_{4.3}$  = Volumen del ácido gastado para llegar a pH 4.3 (mL)

EQ = Peso equivalente del  $CaCO_3$  (50000 eq)

N = Normalidad del HCl

$V_m$  = Volumen de la muestra (mL)

Para la determinación de la alcalinidad de bicarbonato se realizaron los cálculos con la siguiente ecuación:

$$\frac{mgCaCO_3}{L} = \frac{(V_{5.8} * EQ * N)}{Vm} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

donde:

$V_{5.8}$  = Volumen del ácido gastado para llegar a pH 5.8 (mL)

EQ = Peso equivalente del  $CaCO_3$  (50000 eq)

N = Normalidad del HCl

$V_m$  = Volumen de la muestra (mL)

#### 4.3.7 Cuantificación del carbono orgánico total (COT)

EL COT es una medida que se usa para cuantificar la cantidad de materia orgánica de manera similar que la DQO (demanda química de oxígeno), debido a esto y por los posibles errores en la preparación de los reactivos para determinar la DQO de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 1998), se optó por usar el analizador de COT. En el afluente y el efluente se determinó el COT mediante un analizador marca Shimadzu. El instrumento convierte el carbono de la muestra en dióxido de carbono ( $CO_2$ ) mediante combustión catalítica a  $680^\circ C$ . El  $CO_2$  que se forma se mide por medio de un detector infrarrojo no dispersivo. Se utilizó aire comprimido a una presión de 800 psi. La cantidad de  $CO_2$  es directamente proporcional a la concentración de carbono en la muestra. El volumen de las muestras que se emplearon fue de 20 mL, se centrifugaron a 3200 rpm durante 10

min y se filtraron en una membrana de 0.45 µm antes de la determinación. Los resultados se expresaron en mg COT/L y solo se utilizaron para corroborar la cantidad de materia orgánica que se estaba suministrando al reactor, ya que mediante el equipo de electroforesis capilar y con el uso de las equivalencias teóricas de los sustratos se reportaron los resultados en términos de DQO.

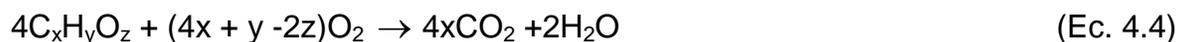
#### **4.3.8 Cuantificación de la concentración de ADN**

La cuantificación de la concentración del extracto de ADN se determinó mediante el uso de un colorante fluorescente que se une al ADN de doble cadena (PicoGreen®), y su posterior cuantificación se realizó en un fluorómetro Tecan modelo Genios. Se construyó una curva estándar de ADN con concentraciones de 1, 5, 10, 25 y 50 ng ADN/µL. La solución de ensayo para cuantificar el ADN de las muestras fue PicoGreen® (1:400) en TE1X. Para analizar cada muestra se añadieron 198 µL de solución de ensayo más 2 µL de muestra de extracto de ADN en cada pozo de la placa del fluorómetro. A partir de la curva estándar se determinó la concentración de ADN de los lodos granulares y biopelículas de los experimentos III y IV.

#### **4.4. Cálculos**

##### **4.4.1 Equivalencia teórica de las diferentes fuentes de carbono en términos de DQO**

Las equivalencias teóricas de DQO de los compuestos utilizados como sustratos se obtuvieron de la ecuación descrita por Tarvin y Buswell (1934), y se usaron para reportar la concentración del afluente y efluente (obtenidos del equipo de electroforesis capilar) en términos de DQO.



Las equivalencias teóricas de los sustratos utilizados fueron las siguientes:

$$\text{Ácido láctico (C}_3\text{H}_6\text{O}_3\text{): } \frac{1.0666gDQO}{gC_3H_6O_3}$$

$$\text{Glucosa (C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{): } \frac{1.0666gDQO}{gC_6H_{12}O_6}$$

$$\text{Ácido acético (C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{): } \frac{1.067gDQO}{gC_2H_4O_2}$$

#### 4.4.2 Porcentaje de remoción de DQO

$$\%DQO_{remv} = \left( \frac{DQO_{afl} - DQO_{efl}}{DQO_{afl}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 4.5})$$

donde:

$DQO_{afl}$  = Concentración de DQO en el afluente (g DQO/L)

$DQO_{efl}$  = Concentración de DQO en el efluente (g DQO/L)

#### 4.4.3 Porcentaje de remoción de sulfato

$$\%SO_4^{2-}_{remv} = \left( \frac{SO_4^{2-}_{afl} - SO_4^{2-}_{efl}}{SO_4^{2-}_{afl}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 4.6})$$

donde:

$SO_4^{2-}_{afl}$  = Concentración de sulfato en el afluente (ppm)

$SO_4^{2-}_{efl}$  = Concentración de sulfato en el efluente (ppm)

#### 4.4.4 Determinación de la actividad metanogénica, fermentativa y sulfatorreductora

Para la determinación de las actividades se graficaron los valores obtenidos de metano ( $CH_4$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) con respecto al tiempo. De la curva obtenida se tomó la máxima pendiente y se dividió entre la concentración de SSV contenidos en cada botella.

$$AM = \frac{mCH_4}{V_B * SSV * f_{cM}} \quad (\text{Ec. 4.7})$$

$$AF = \frac{mCO_2}{V_B * SSV * f_{cF}} \quad (\text{Ec. 4.8})$$

$$ASR = \frac{mH_2S}{V_B * SSV * f_{cS}} \quad (\text{Ec. 4.9})$$

donde:

AM = Actividad metanogénica (g DQO CH<sub>4</sub>/g SSV d)

mCH<sub>4</sub> = Velocidad de producción de metano (L/d)

f<sub>cM</sub> = Factor de conversión de CH<sub>4</sub> a DQO = 0.35 L CH<sub>4</sub>/g DQO a condiciones estándar de temperatura (273 K) y presión (1 atm).

AF = Actividad fermentativa (g DQO CO<sub>2</sub>/g SSV d)

mCO<sub>2</sub> = Velocidad de producción de CO<sub>2</sub> (L/d)

f<sub>cF</sub> = Factor de conversión de CO<sub>2</sub> a g DQO = 0.7 L CO<sub>2</sub>/g DQO a condiciones estándar temperatura (273 K) y presión (1 atm).

ASR = Actividad sulfatorreductora (g DQO H<sub>2</sub>S/g SSV d)

mH<sub>2</sub>S = velocidad de producción de sulfuro de hidrógeno (g H<sub>2</sub>S/L d)

f<sub>cS</sub> = Factor de conversión de H<sub>2</sub>S a g DQO= 0.5 g H<sub>2</sub>S/g DQO

V<sub>B</sub> = Volumen del líquido en la botella (L)

SSV = Concentración de SSV en la botella

#### 4.4.5 Porcentaje de remoción de sustratos

El porcentaje de remoción de glucosa, lactato y acetato en base a g de DQO se muestran en las Ec. 4.10, 4.11 y 4.12

$$\% Gluc_{remv} = \left( \frac{Gluc_{afI} - Gluc_{efl}}{Gluc_{afI}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 4.10})$$

donde:

Gluc<sub>afI</sub> = Concentración de glucosa en el afluente (g glucosa/L)

Gluc<sub>efl</sub> = Concentración de glucosa en el efluente (g glucosa/L)

$$\% Lac_{remv} = \left( \frac{Lac_{afl} - Lac_{efl}}{Lac_{afl}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 4.11})$$

donde:

$Lac_{afl}$  = Concentración de lactato en el afluente (g lactato/L)

$Lac_{efl}$  = Concentración de lactato en el efluente (g lactato/L)

$$\% Ac_{remv} = \left( \frac{(Ac_{afl} + Ac_{lac}) - Ac_{efl}}{Ac_{afl} + Ac_{lac}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 4.12})$$

donde:

$Ac_{afl}$  = Concentración de acetato en el afluente (g acetato/L)

$Ac_{lac}$  = Concentración de acetato producido por la oxidación incompleta de glucosa o lactato (g acetato/L)

$Ac_{efl}$  = Concentración de acetato en el efluente (g acetato/L)

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de los inóculos

En la determinación de los SSV de los lodos granulares que se utilizaron como inóculos en los experimentos I, II, III y IV descritos en la sección 4.1.3, se obtuvo que el lodo de la maltera y el lodo Eerbeck tenían aproximadamente la misma cantidad de sólidos suspendidos volátiles 0.088 y 0.087 g SSV/g lodo respectivamente, y el lodo Ricolino tenía 0.07 g SSV/g lodo (Tabla 5.1).

La concentración de SSV en cada lodo sirvió para calcular la concentración de biomasa que se inoculó en las botellas serológicas para determinar la actividad sulfatorreductora (ASR), metanogénica (AM) y fermentativa (AF) de los lodos granulares.

Tabla 5.1 Sólidos suspendidos volátiles de los inóculos.

Lodo granular	SSV (g/g lodo)
Maltera	0.088
Ricolino	0.07
Eerbeck	0.087

La AM tuvo por objetivo conocer la capacidad que tenían los diferentes lodos granulares para producir metano a partir de acetato, la actividad fermentativa tuvo como propósito conocer si existían microorganismos en los lodos que convirtieran los sustratos hasta dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), y la ASR tuvo como finalidad identificar que sustratos consumían en mayor proporción las BSR presentes en la biomasa.

Los resultados que se obtuvieron de las actividades metanogénicas (AM) para el lodo proveniente de la industria maltera, Ricolino y Eerbeck fueron 0.46, 0.35 y 0.15 g DQO- $\text{CH}_4$ /g SSV-d, respectivamente (Tabla 5.2).

Por otra parte, los valores que se obtuvieron en las actividades fermentativas (AF) para los lodos de la maltera, Ricolino y Eerbeck fueron 0.11, 0.05 y 0.08 g DQO- $\text{CO}_2$ /g SSV-d, respectivamente (Tabla 5.2), indicando la existencia de

microorganismos fermentativos en el lodo granular de la maltera después de estar bajo condiciones de sulfatorreducción, no obstante para el lodo Ricolino y Erbeck la AF fue despreciable.

En la Tabla 5.2 se muestra que para un mismo lodo se obtuvieron actividades sulfatorreductoras (ASR) similares con lactato o etanol, esto debido a que los lodos estuvieron bajo condiciones de aclimatación sulfurogénica con una mezcla de estos sustratos, y probablemente en estos lodos se encontraban bacterias sulfatorreductoras capaces de utilizar ambos sustratos como fuente de carbono. No obstante, aunque la glucosa estuvo presente en la mezcla de aclimatación, el resultado de la ASR con este sustrato indicó que las BSR prefieren lactato y etanol.

Tabla 5.2 Actividad metanogénica, sulfatorreductora y fermentativa de los lodos granulares.

Lodo granular	AM g DQO-CH <sub>4</sub> /g SSV-d		ASR g DQO-H <sub>2</sub> S/g SSV-d			AF g DQO-CO <sub>2</sub> /g SSV-d
	Acetato	Acetato	Lactato	Etanol	Glucosa	Glucosa
Maltera	0.46	0.26	0.80	0.80	ND	0.11
Ricolino (Exp II)	0.35	0.08	ND	2.91	0.53	0.05
Ricolino (Exp. III)	0.35	0.11	2.38	2.10	ND	0.05
Eerbeck	0.15	0.03	2.96	2.12	ND	0.08

ND- No se determinó

Los valores de actividad metanogénica que se obtuvieron para el lodo de la maltera y lodo Ricolino se encuentran dentro de lo reportado en la literatura que está alrededor de 0.3-0.6 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d para una actividad metanogénica acetoclástica (Colleran *et al.*, 1992; Omil *et al.*, 1997), mientras que el valor de la AM para el lodo Eerbeck se encuentra por debajo de lo reportado. Estos resultados indicaron que los microorganismos metanogénicos siguieron presentes en los lodos granulares de la maltera y Ricolino aún después de haber estado sometidos a condiciones sulfatorreductoras.

Por otro lado, en las pruebas de las ASR efectuadas con acetato para el lodo de la maltera y Ricolino (inóculos del experimento I y III), se obtuvieron valores de 0.26 y 0.11 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d, respectivamente siendo similares al valor reportado por Gallegos (2009) de 0.15 g DQO/g SSV-d para un lodo granular que estuvo bajo condiciones sulfurogénicas en un reactor UASB aproximadamente 194 días. Sin embargo, los valores de ASR con acetato indicaron que había muy poca actividad de las BSR para utilizar este sustrato.

Por otra parte, con lactato, etanol, y glucosa se obtuvieron valores de ASR más altos, desde 0.53 hasta 2.96 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d que se encuentran dentro de lo reportado en la literatura de 0.45 y 2.1 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d a partir de ácidos grasos volátiles como acetato, propionato y butirato (Visser *et al.*, 1993; Omil *et al.*, 1996).

Los resultados de las ASR en los lodos granulares (inóculos) revelaron que es posible utilizar estos sustratos para llevar a cabo el desarrollo de BSR. Sin embargo, los valores de las actividades obtenidas dependen de los diferentes grupos de microorganismos que se encuentran en el lodo granular, debido a que en un reactor sulfatorreductor pueden coexistir diferentes grupos bacterianos como bacterias acidogénicas, acetogénicas productoras de hidrógeno, BSR que utilizan hidrógeno, BSR que utilizan acetato y BSR que utilizan ácidos grasos más complejos, entre otros. Dichos grupos pueden formar relaciones simbióticas de acuerdo al abastecimiento del sustrato. En el estudio realizado por Wang *et al.* (2008) utilizaron un reactor sulfurogénico alimentado con etanol y ácido láctico, y observaron que estos sustratos pudieron ser convertidos rápidamente por BSR que utilizan ácidos grasos y por acetógenos que producen hidrógeno, produciendo más ácido acético el cual es un sustrato benéfico para los microorganismos metanogénicos.

## **5.2 Resultados del desempeño del LFI en los experimentos I, II, III y IV**

Los experimentos I, II, III y IV se efectuaron en el reactor LFI por periodos cortos de tiempo de 44, 30, 31 y 33 días, respectivamente. Sin embargo, con el

propósito de analizar los resultados de los cuatro experimentos en un tiempo de operación similar, para el experimento I solo se consideraron los valores obtenidos hasta el día 34.

Durante la operación de los reactores se siguieron a través del tiempo la concentración de SSV en el efluente, el porcentaje de remoción de DQO y sulfato, la producción de sulfuro ( $H_2S$ ), el pH y la alcalinidad. Los promedios se muestran en la Tabla 5.3, y se obtuvieron considerando que en los últimos días de operación de los reactores se había alcanzado un proceso pseudo estable. En los experimentos II, III y IV se tomaron solamente los valores obtenidos en los últimos 7 días, y se consideró que de esta forma el desempeño del reactor se debía en mayor parte a la biomasa adherida al soporte. Para el experimento I, los promedios que se muestran en la Tabla 5.3 se calcularon con los valores que se obtuvieron del día 28 al día 34 (7 días).

En esta sección solo se presentan los resultados obtenidos durante la operación del reactor en cada experimento y más adelante se discute el desempeño general de los reactores (sección 5.3).

### **5.2.1 Desempeño del reactor en el experimento I**

En este experimento el reactor LFI se inoculó con lodo de la maltera y se alimentó con una mezcla de lactato-acetato (Tabla 4.1). La Figura 5.1 muestra el desempeño del reactor en el experimento I respecto al tiempo de operación.

Durante la realización del experimento I se tuvieron problemas operacionales con las bombas peristálticas como el taponamiento en la manguera de alimentación, lo cual impidió que entrara afluente al reactor. Debido a estos problemas se tuvieron fluctuaciones en el TRH desde el inicio del arranque hasta el día 28 (Figura 5.1A) y además, el reactor operó en lote por algunos días; a partir del día 29 el sistema permaneció 14 días en continuo. Sin embargo como se mencionó anteriormente, los resultados se consideraron hasta el día 34.

En la Figura 5.1A se observa que durante los primeros 20 días de operación del reactor existió un lavado de la biomasa, y una vez que se logró estabilizar el TRH (después del día 27) la cantidad de sólidos suspendidos volátiles en el

efluente se estabilizó y fue menor a 50 mg SSV/L, esto indicó que la biopelícula era estable y los SSV que se encontraban en el efluente eran resultado del proceso natural de las biopelículas. Es decir, los SSV en el efluente fueron resultado del desprendimiento de biomasa adherida al soporte, provocadas por las fuerzas de corte (abrasión y erosión) causadas por el flujo de recirculación y desprendimiento de células muertas de la biopelícula.

El porcentaje de remoción de DQO durante los primeros 27 días del experimento I no se muestra (Figura 5.1B), ya que el sistema se comportó fluctuante por los problemas operacionales mencionados anteriormente. A partir del día 28 y hasta el día 34 se obtuvo un promedio de eficiencia de remoción de DQO de 34.5% (Tabla 5.3); que se atribuye principalmente a la biomasa adherida al soporte (biopelícula), ya que como se observa en la Figura 5.1A a partir del día 20 los SSV en el efluente fueron bajos. En los días 37 y 38 de la operación del LFI las bombas de recirculación y alimentación se apagaron por motivos de luz del Instituto, y por lo tanto, la operación del reactor se detuvo. Una vez que se volvió a operar el reactor, el porcentaje de remoción de DQO fue del 70% (día 39) debido a que el sistema había permanecido en lote; sin embargo, este porcentaje disminuyó a través del tiempo y no permaneció constante al final de la operación por lo que hasta el día 44 la remoción de DQO fue de 53% (Figura 5.1B). Más adelante se presentarán los porcentajes de remoción de lactato y acetato (Tabla 5.4) y se discutirán los resultados (sección 5.4).

La producción de sulfuro en el día 8 de operación del reactor alcanzó una concentración de 120 mg H<sub>2</sub>S/L; sin embargo, durante los siguientes 15 días fue menor de 60 mg H<sub>2</sub>S/L (Figura 5.1C); la disminución en la producción de sulfuro podría atribuirse a los problemas ocasionados por las bombas peristálticas durante la operación del reactor que influyeron en el TRH del sistema, así como a la salida de biomasa suspendida que contribuía a la producción de sulfuro. No obstante, a partir del día 28 se observó el incremento en la producción de sulfuro a través del tiempo, teniendo en el día 34 una concentración de 146 mg H<sub>2</sub>S/L. La máxima producción de sulfuro, 193 mg H<sub>2</sub>S/L, se logró al final de la operación del

reactor (día 44), mientras que el mayor porcentaje de remoción de sulfato (56%) se obtuvo en el día 42.

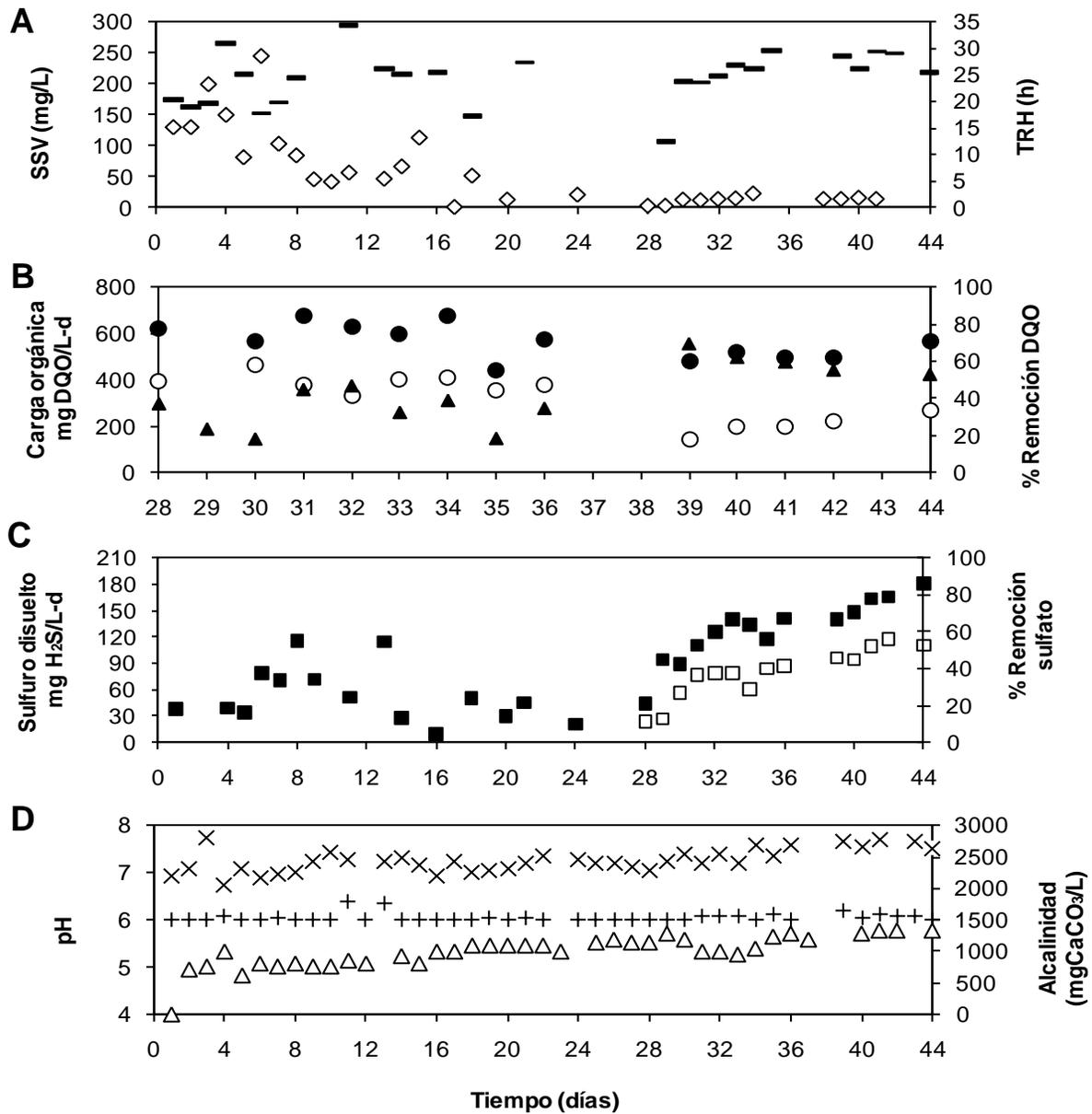


Figura 5.1 Desempeño del reactor LFI en el experimento I. Sustratos utilizados: acetato-lactato (70:30). A: Tiempo de residencia hidráulica (-), sólidos suspendidos volátiles en el efluente (◇); B: carga orgánica, afluente (●), efluente (○), porcentaje de remoción de DQO (▲); C: sulfuro producido (■), porcentaje de remoción de sulfato (□); D: pH afluente (+), pH efluente (x), alcalinidad total (Δ).

Por otra parte, en las Figuras 5.1B y 5.1C se observa que el incremento en el porcentaje de remoción de sulfato y producción de sulfuro a partir del día 28 y hasta el día 44, concuerda con el incremento en el porcentaje de remoción de DQO durante ese mismo periodo. Estos resultados indican que la oxidación de la materia orgánica (DQO) estaba asociada con la remoción del sulfato y producción de sulfuro.

Como se observa en la Figura 5.1D, la producción máxima de alcalinidad fue de 1440 mg CaCO<sub>3</sub>/L al final del experimento I. No obstante, desde el arranque del reactor y a pesar de los problemas operacionales, la oxidación de la materia orgánica produjo alcalinidad (iones bicarbonato), ocasionando que se incrementará el pH del medio a un valor de 7. La Ec. 1.8 muestra la oxidación incompleta de lactato hasta acetato por las BSR, con la producción de iones bicarbonato.

### **5.2.2 Desempeño del reactor en el experimento II**

En este experimento el reactor LFI se inoculó con lodo Ricolino y se alimentó con una mezcla de glucosa-acetato (Tabla 4.1). El desempeño del reactor LFI se muestra en la Figura 5.2.

Durante los primeros 5 días del arranque del reactor se presentaron problemas de operación con las bombas peristálticas similares al experimento I; sin embargo, estos problemas se superaron ya que se cambió la bomba de alimentación y se logró un TRH constante (Figura 5.2A).

De manera similar que en el experimento I, en este experimento ocurrió un lavado de biomasa durante los primeros 12 días de operación del LFI como se muestra en la Figura 5.2A, por lo que la cantidad de sólidos suspendidos volátiles en el efluente fue menor a 50 mg SSV/L a partir del día 15 (Figura 5.2A). Sin embargo, la cantidad de SSV incrementó a 82 mg SSV/L en el día 20, pero a partir del día 24 la concentración de SSV en el efluente disminuyó a través del tiempo teniendo al final de la operación del reactor (día 30) una concentración de 24 mg SSV/L.

Por otra parte, durante los primeros 22 días de este experimento el porcentaje de remoción de DQO fue entre 30 y 40% (Figura 5.2B) que se atribuye a la biomasa suspendida y adherida en el soporte. Por otro lado, el porcentaje de remoción promedio de DQO atribuido principalmente a la biomasa inmovilizada (día 24 al día 30) fue de 53.4% (Tabla 5.3). Estos resultados mostraron que se obtuvo un mayor porcentaje de remoción de DQO en los últimos 7 días de operación del LFI. Más adelante se presentarán los porcentajes de remoción de lactato y acetato (Tabla 5.4) y se discutirán los resultados (sección 5.4).

La producción de sulfuro en el día 8 fue 57 mg H<sub>2</sub>S/L (Figura 5.2C), y a través del tiempo no se observó un aumento importante en la producción de H<sub>2</sub>S como sucedió en el experimento I, ya que al final de la operación del reactor (día 30) se tuvo una producción máxima de 80 mg H<sub>2</sub>S/L y un porcentaje de remoción de sulfato de 17% (Figura 5.2C). No obstante, es importante señalar que la mayor producción de sulfuro se obtuvo principalmente por la biomasa inmovilizada en el soporte, tal como se observó con el porcentaje de remoción de DQO.

Por otra parte, debido a que se obtuvo un mayor porcentaje de remoción de DQO contra la producción de sulfuro, esto indicó que un porcentaje de la degradación de la materia orgánica se llevo a cabo por microorganismos no sulfatorreductores.

El pH del efluente fue 6.5, y la producción de alcalinidad fue 624 mg CaCO<sub>3</sub>/L al final del experimento (Figura 5.2D).

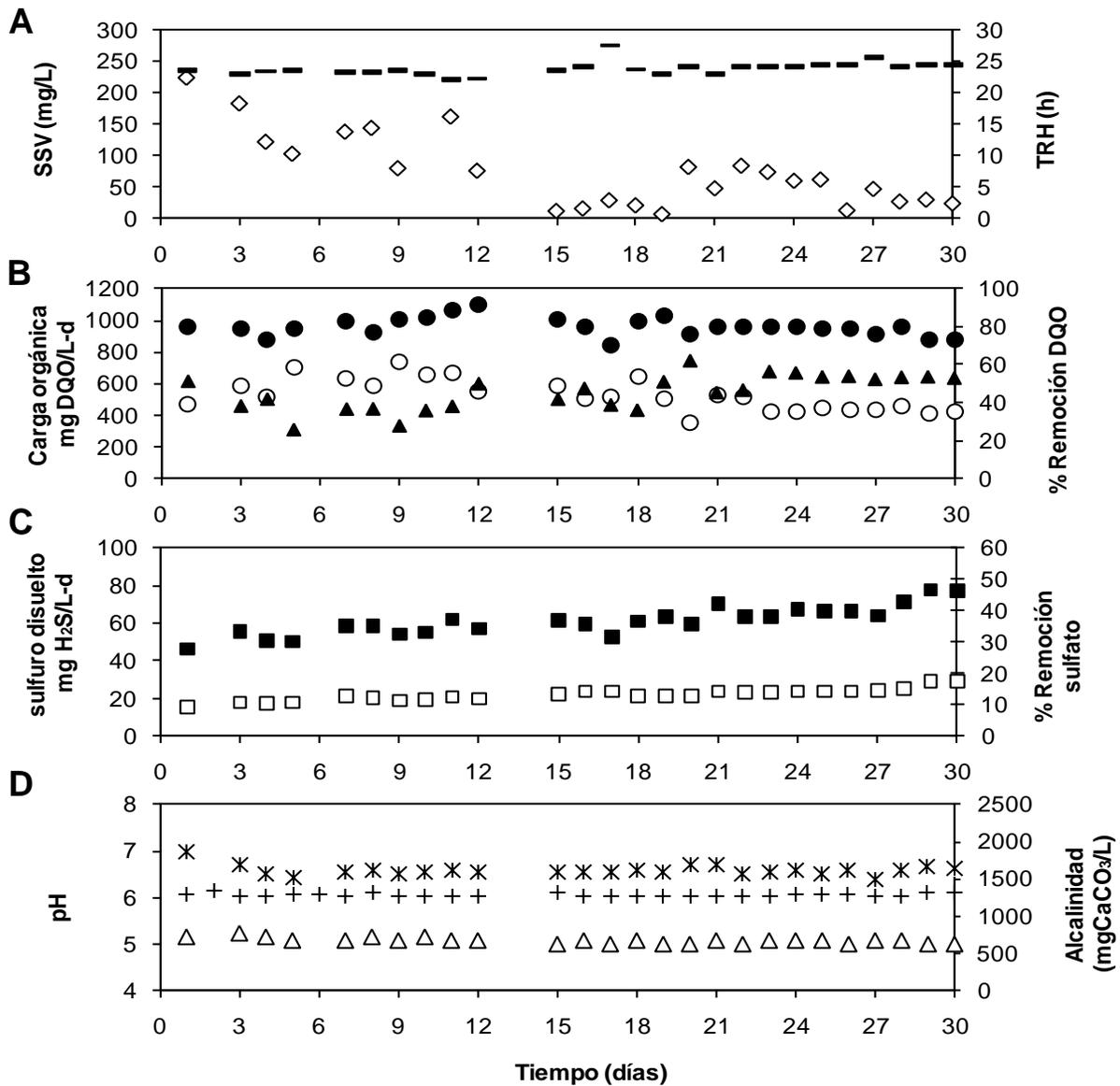


Figura 5.2 Desempeño del reactor LFI en el experimento II. Sustratos utilizados: acetato-glucosa (70:30). A: Tiempo de residencia hidráulica (-), sólidos suspendidos volátiles en el efluente ( $\diamond$ ); B: carga orgánica, afluente ( $\bullet$ ), efluente ( $\circ$ ), porcentaje de remoción de DQO ( $\blacktriangle$ ); C: sulfuro producido ( $\blacksquare$ ), porcentaje de remoción de sulfato ( $\square$ ); D: pH afluente (+), pH efluente (\*), alcalinidad total ( $\triangle$ ).

### 5.2.3 Desempeño del reactor en el experimento III

En este experimento el reactor se inoculó con lodo Ricolino de igual manera que el experimento II, sin embargo la mezcla de sustratos que se usó fue lactato-acetato (Tabla 4.1).

El TRH en este experimento (Figura 5.3A) se mantuvo constante debido a que no existieron problemas de operación como sucedió en los experimentos I y II. A partir del día 23 y hasta el final del experimento (día 31) la cantidad de sólidos suspendidos volátiles en el efluente fue bajo con 55 mg SSV/L, que coincide con los SSV del día 20 y 24 de los experimentos I y II, respectivamente.

El porcentaje de remoción de DQO durante los primeros 21 días osciló entre 40 y 60% (Figura 5.3B); durante los días 24 al 27 se observó que el porcentaje de remoción permaneció constante (40%); en el día 28 incrementó, y al final de la operación del reactor (día 31) se obtuvo un 69 % de remoción de DQO. Por otro lado, el promedio de remoción atribuido principalmente a la biomasa inmovilizada (valores del día 25 al 31) fue 49%, esto debido a que la mayoría de la biomasa suspendida (plantónica) con la que se inóculo el reactor ya se había lavado del sistema en este periodo. Más adelante se presentarán los porcentajes de remoción de lactato y acetato (Tabla 5.4) y se discutirán los resultados (sección 5.4).

La producción de sulfuro en el reactor comenzó con 35 mg H<sub>2</sub>S/L e incrementó gradualmente a través del tiempo hasta 69 mg H<sub>2</sub>S/L en el día 29 (Figura 5.3C). Este comportamiento fue similar al que se obtuvo en el experimento II que comenzó con 45 mg H<sub>2</sub>S/L y terminó con una producción de 80 mg H<sub>2</sub>S/L, lo cual podría atribuirse a que en ambos experimentos (II y III) se utilizó el mismo inóculo (Lodo Ricolino). Por otra parte, en ambos experimentos la producción de sulfuro inicial se debía a la presencia de biomasa plantónica así como a la adherida al soporte, mientras que la producción de sulfuro al final del experimento fue principalmente por la biomasa inmovilizada en el soporte, debido a que la biomasa plantónica con que se inóculo el reactor se lavó durante los primeros 21 días como se mencionó anteriormente.

El porcentaje de remoción de sulfato que se obtuvo al final de este experimento fue 12.5%, similar al que se tuvo al final del experimento II de 17%. Estos resultados indicaron que a pesar de que en los experimentos II y III se utilizó el mismo inóculo pero diferente sustrato, el porcentaje de remoción de sulfato fue similar.

Por otro lado, el pH del efluente y la alcalinidad producida al final del experimento III con lactato como sustrato fueron 6.9 y 967 mg CaCO<sub>3</sub>/L, respectivamente (Figura 5.3D).

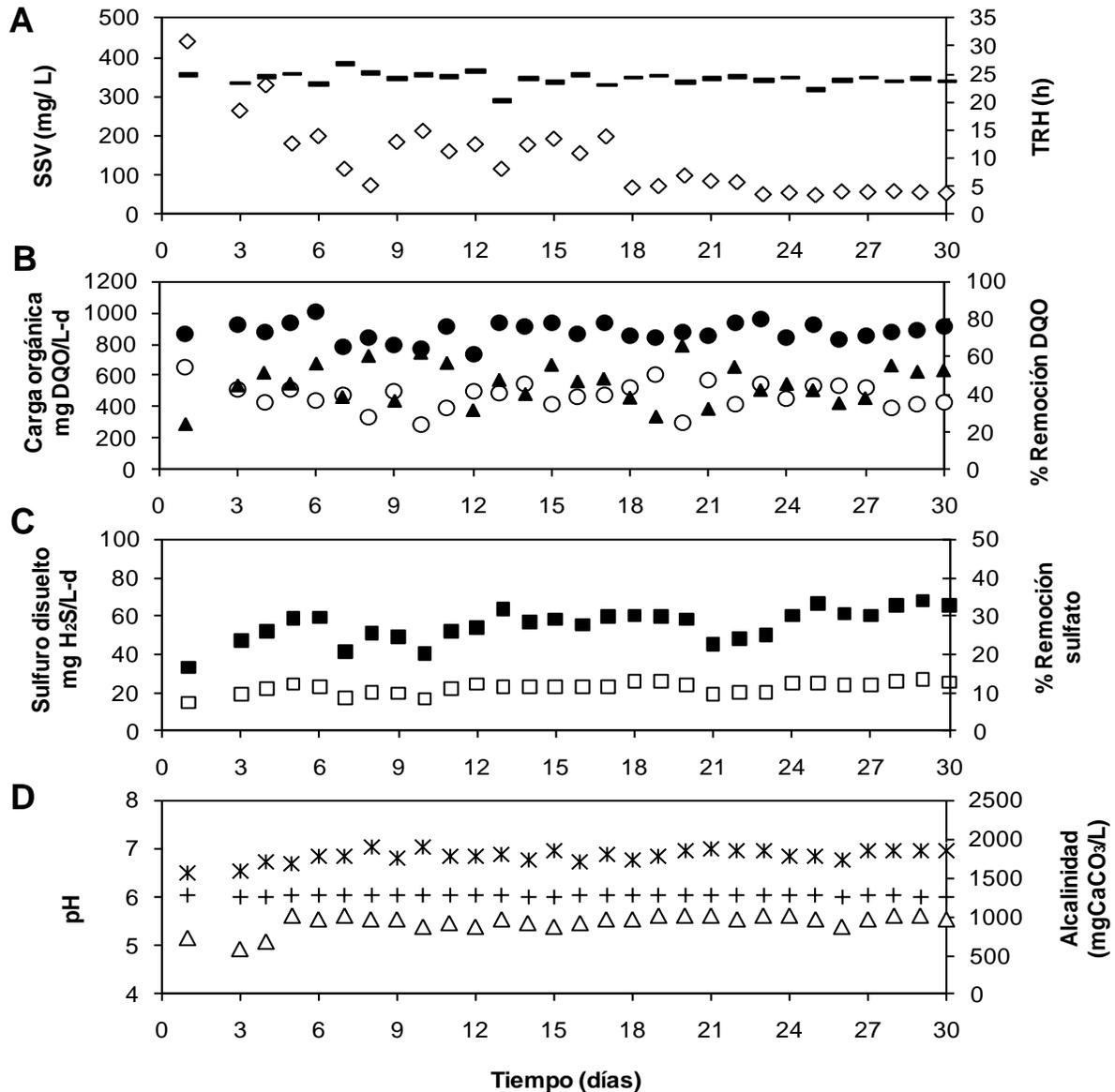


Figura 5.3 Desempeño del reactor LFI en el experimento III. Sustratos utilizados: acetato-lactato (70:30). A: Tiempo de residencia hidráulica (-), sólidos suspendidos volátiles en el efluente (◇); B: carga orgánica, afluente (●), efluente (○), porcentaje de remoción de DQO (▲); C: sulfuro producido (■), porcentaje de remoción de sulfato (□); D: pH afluente (+), pH efluente (\*), alcalinidad total (Δ).

#### 5.2.4 Desempeño del reactor en el experimento IV

En este experimento el reactor se inoculó con lodo proveniente de la papelera Eerbeck y se alimentó con una mezcla de lactato-acetato (Tabla 4.1). El desempeño del reactor se muestra en la Figura 5.4.

El TRH y los sólidos suspendidos volátiles del experimento IV se muestran en la Figura 5.4A. En este experimento el TRH se mantuvo constante de igual manera que en el experimento III, y la cantidad de SSV en el efluente a partir del día 23 y hasta el final de la operación del reactor (día 34) osciló entre 30-70 mg SSV/L. No obstante, en el día 13 existió un lavado de biomasa debido a que en el efluente se tuvieron 315 mg SSV/L, y se observó que este acontecimiento influyó en la disminución de la producción de sulfuro que se obtuvo a partir del día 13 (Figura 5.4C).

Por otra parte, el porcentaje de remoción de DQO durante los primeros 23 días fluctuó entre 35 y 70% (Figura 5.4B); sin embargo, este porcentaje fue por la acción de biomasa suspendida así como de biomasa inmovilizada en el soporte, mientras que el promedio de remoción de DQO principalmente por la biopelícula fue de 55% (día 27 al día 33). Más adelante se presentarán los porcentajes de remoción de lactato y acetato (Tabla 5.4) y se discutirán los resultados (sección 5.4).

Respecto a la producción de sulfuro, durante los primeros 12 días de operación la concentración fue aproximadamente 100 mg H<sub>2</sub>S/L; no obstante, esta concentración solo se mantuvo hasta el día 13 (Figura 5.4C), lo cual mostró que la producción era a causa de la biomasa planctónica que estaba en el reactor ya que en el día 13 se presentó un lavado de biomasa como se mencionó anteriormente (Figura 5.4A). A partir del día 14 la producción de sulfuro disminuyó a través del tiempo manteniendo la concentración entre 50 y 60 mg H<sub>2</sub>S/L; al final del experimento (día 34) la concentración de sulfuro fue de 54 mg H<sub>2</sub>S/L.

De manera similar que la producción de sulfuro, el porcentaje de remoción de sulfato fluctuó durante los primeros 12 días entre 20 y 25%, y a partir del día 13 disminuyó hasta el final del experimento donde se tuvo 11% de remoción. Por otro

lado, el promedio de remoción de sulfato atribuido en mayor parte a la biopelícula fue 11.2% (Tabla 5.3).

El pH y alcalinidad producida al final del experimento fueron 6.85 y 940 mg CaCO<sub>3</sub>/L respectivamente (Figura 5.4D).

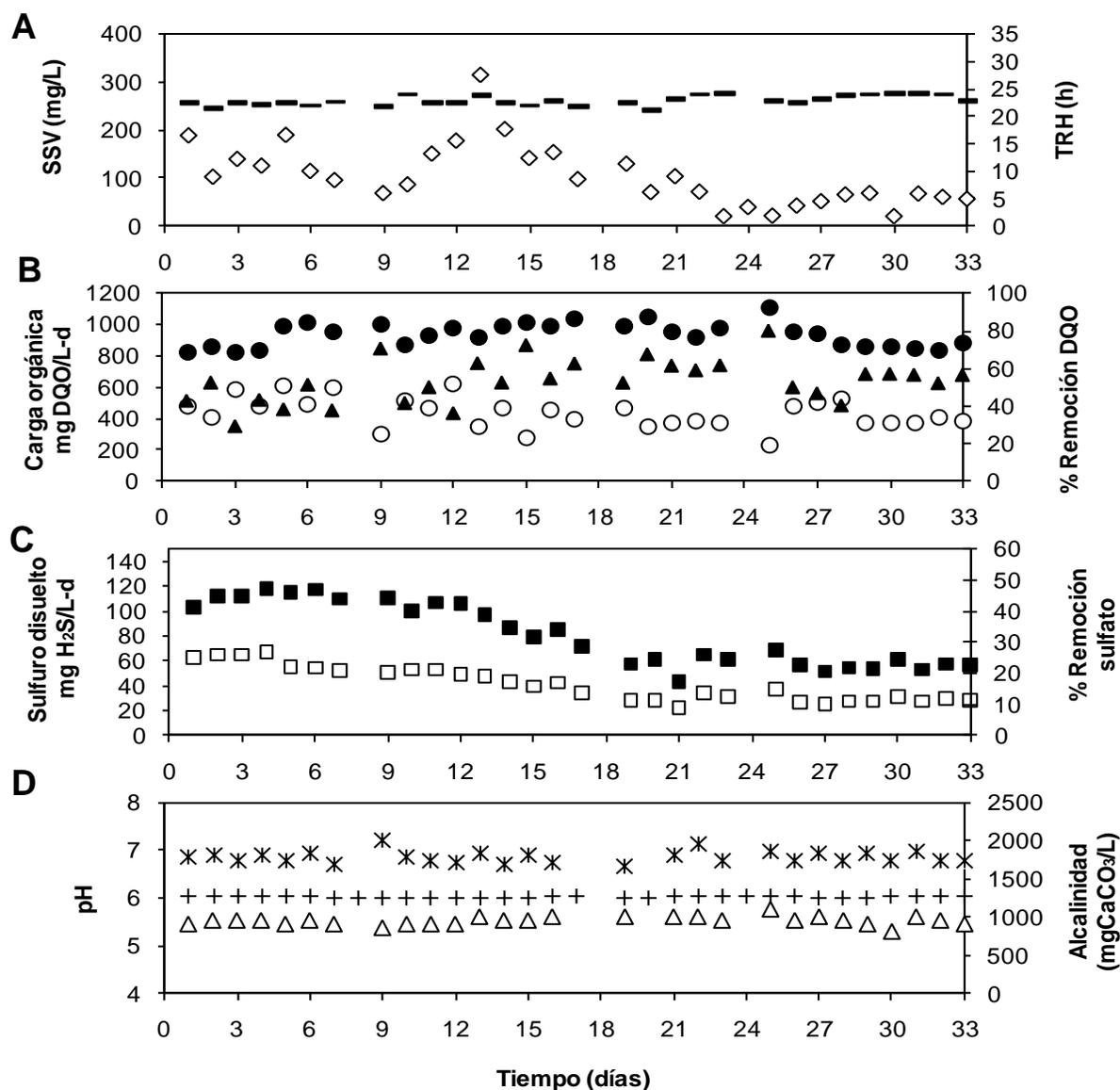


Figura 5.4 Desempeño del reactor LFI en el experimento IV. Sustratos utilizados: acetato-lactato (70:30). A: Tiempo de residencia hidráulica (-), sólidos suspendidos volátiles en el efluente ( $\diamond$ ), B: carga orgánica, afluente ( $\bullet$ ), efluente ( $\circ$ ), porcentaje de remoción de DQO ( $\blacktriangle$ ), C: sulfuro producido ( $\blacksquare$ ), porcentaje de remoción de sulfato ( $\square$ ), D: pH afluente (+), pH efluente ( $\ast$ ), alcalinidad total ( $\Delta$ ).

### 5.3 Discusión general del desempeño de los reactores

Al término de la operación del reactor en los experimentos II, III y IV se observó que el promedio de remoción de DQO durante los últimos 7 días fueron similares de 53, 49 y 52%, respectivamente, así como la remoción de sulfato de 15, 12.5 y 11.2 %, respectivamente, mientras que para el experimento I el porcentaje de remoción de DQO fue 34.5% y el porcentaje de remoción de sulfato fue de 27% (Tabla 5.3).

Por otra parte, la producción de sulfuro promedio (últimos 7 días de operación del reactor) fue similar para los experimentos II, III y IV de 70, 64.4 y 55 mg H<sub>2</sub>S/L-d respectivamente, mientras que para el experimento I fue mayor con 105 mg H<sub>2</sub>S/L-d (día 28 al día 34) (Tabla 5.3).

Se realizó un análisis de varianza simple para comparar la velocidad de producción de sulfuro, porcentaje de remoción de sulfato y porcentaje de remoción de DQO obtenidos en los cuatro experimentos durante los últimos 7 días. El resultado de dicho análisis permitió corroborar que la diferencia en la velocidad de producción de sulfuro, el porcentaje de remoción de DQO y el porcentaje de remoción de sulfato en el experimento I es significativamente diferente con respecto a los experimentos II, III y IV (ANEXO 1).

La máxima concentración de sulfuro producido por la biopelícula (193 mg H<sub>2</sub>S/L) se obtuvo en el experimento I después de 44 días de operación del reactor, y durante el día 34 la producción de sulfuro fue 145 mg H<sub>2</sub>S/L, esto mostró que la biopelícula se desarrolló en un corto tiempo sin necesidad de operar el reactor en lote por más de 40 días para lograr la adhesión de los microorganismos al soporte.

La producción de sulfuro que se obtuvo en el experimento I (día 34) fue mayor que la reportada por otros autores; por ejemplo Celis-García *et al.* (2007) reportaron una producción de sulfuro de 106 mg H<sub>2</sub>S/L después de 52 días de operar en continuo un reactor fluidificado inverso alimentado con ácidos grasos, que previamente se había operado en lote por 45 días para permitir la colonización del material acarreador. Por otro lado, Nagpal *et al.* (2000) obtuvieron concentraciones entre 40-100 mg H<sub>2</sub>S/L durante aproximadamente 500 días de operación en continuo en un reactor fluidificado alimentado con etanol.

Por otra parte, la producción de sulfuro máxima en el experimento II fue 80 mg H<sub>2</sub>S/L a los 30 días de operación en continuo, la cual es mayor que la reportada por Celis *et al.* (2009) con un reactor LFI alimentado con etanol y lactato que se operó previamente en lote por 45 días, y a los 65 días de operación en continuo obtuvieron una concentración de 69 mg H<sub>2</sub>S/L.

Otros autores como Sahinkaya *et al.* (2007a) reportaron que a los 120 días de operación en continuo en un reactor fluidificado alimentado con etanol tuvieron aproximadamente 50 mg H<sub>2</sub>S/L. En contraste, en este trabajo (experimento III) se obtuvo una concentración de sulfuro de 61 mg H<sub>2</sub>S/L en el día 31 de operación en continuo, mientras que en el experimento IV se obtuvo una concentración de 53 mg H<sub>2</sub>S/L en el día 33.

Los valores de concentración de sulfuro que se obtuvieron en los experimentos I, II, III y IV comparados con trabajos reportados en la literatura, indicaron que la estrategia de arrancar el reactor en continuo sin haber sido operado en lote por largo tiempo es útil, ya que se logró la formación temprana de biopelícula.

Por otra parte Gallegos (2009) reportó que después de 21 días de operar en continuo un reactor fluidificado inverso alimentado con acetato (que representaba el 90% de la DQO alimentada) obtuvo una concentración de sulfuro de 155 mg H<sub>2</sub>S/L. Por otro lado, McMahon y Daugulis (2008) reportaron una alta productividad volumétrica con un mínimo periodo de arranque en un reactor de lecho empacado alimentado con lactato, utilizando como inóculo una relación 95:5 de *Desulfovibrio desulfuricans*: consorcio de BSR logrando tener una producción de sulfuro de 317 mg H<sub>2</sub>S/L a los 8.3 días de operar en continuo el reactor.

#### **5.4 Consumo de los sustratos en los experimentos I, II, III y IV**

Para determinar si existió o no consumo de acetato en el reactor se realizó el balance de acetato, donde se consideró la cantidad de acetato alimentado, el acetato generado por las BSR que oxidan incompletamente el lactato y glucosa hasta acetato, y el acetato residual en el efluente. El acetato producido por la

oxidación incompleta del lactato y glucosa se calculó mediante las ecuaciones 1.8 y 1.9.

Por otro lado, los porcentajes de remoción de DQO como acetato, lactato y glucosa vía sulfatorreducción para cada experimento, se determinaron a partir de la cantidad de sulfato removido en los experimentos y las concentraciones de lactato, acetato y glucosa en el efluente.

Para cada experimento, los balances de acetato, lactato y glucosa se realizaron considerando el periodo que se indica en la Tabla 5.3. En la Tabla 5.4 se muestran los resultados del balance de los sustratos consumidos por BSR, por archaeas metanogénicas acetoclásticas y por otros microorganismos de la biopelícula. Por otra parte, en la sección de análisis de la comunidad microbiana se discutirá acerca de los microorganismos que se encontraron en las biopelículas de los experimentos I, II, III y IV responsables de la oxidación de los sustratos.

En cada experimento se observó que la concentración de acetato a la salida fue menor respecto a la entrada. Además, se pudo observar que la velocidad de consumo promedio de acetato para el experimento I fue 144 mg DQO/L-d, y fue muy similar en los experimentos II, III y IV de 397, 363 y 390 mg DQO/L-d respectivamente.

A pesar de que en los experimentos II y III se usó el mismo inóculo (Lodo Ricolino) pero diferentes sustratos, se observó que los promedios de remoción de DQO fueron similares como se muestra en la Tabla 5.3 con 53.4 y 49.5%, respectivamente. De igual manera, el porcentaje de remoción de sulfato y producción de sulfuro fueron similares en ambos experimentos (Tabla 5.3). No obstante, la alcalinidad que se produjo en el experimento III por la oxidación del lactato fue mayor que la que se obtuvo en el experimento II por la oxidación de glucosa. Este resultado indicó que el sustrato sí influye sobre los microorganismos presentes en un inóculo para adherirse al soporte y formar la biopelícula, lo cual conlleva a que la comunidad microbiana de las biopelículas de los experimentos II y III sean diferentes.

Por otro lado, en los experimentos II y III (mismo inóculo pero diferente sustrato) el porcentaje de consumo de acetato fue de 47.9 y 44.8%,

respectivamente; sin embargo, este consumo se atribuye principalmente a microorganismos no sulfatorreductores presentes en la biopelícula, capaces de utilizar el acetato pero no sulfato como aceptor de electrones. Por otra parte, en el experimento II existió consumo de acetato por microorganismos metanogénicos (2.3%) a diferencia del experimento III donde no se obtuvo actividad metanogénica.

En el experimento IV donde se inoculó con el lodo Eerbeek se tuvo 48.4% de consumo de acetato, pero de igual manera que en los experimentos II y III el consumo total fue principalmente por microorganismos no sulfatorreductores ya que 46.4% fue por otros microorganismos y el resto (2%) por microorganismos metanogénicos. Por otra parte, en el experimento I donde se inóculo con el lodo de la maltera se tuvo un consumo de acetato de 25.6% que fue menor que el de los experimentos II, III y IV, sin embargo en este experimento se observó un consumo de acetato por bacterias sulfatorreductoras de 6.3%, el resto (19.3%) se consumió por otros microorganismos (16.8%) y por metanogénicos (2.5%). De los resultados anteriores, solo en el experimento I parte del sulfuro producido fue debido a la oxidación del acetato, mientras que en los experimentos II, III y IV el sulfuro producido fue únicamente resultado de la oxidación incompleta de lactato y glucosa.

La glucosa, en el experimento II, y el lactato, en los experimentos III y IV, fueron consumidos 100%. Sin embargo, el consumo vía sulfatorreducción fue de 49.5% de glucosa en el experimento II, y de 57.4 y 57.5% de lactato en los experimentos III y IV, respectivamente. Esto indicó que en la biopelícula formada existieron microorganismos que compitieron con las BSR por los sustratos (glucosa y lactato), donde el consumo de sustratos por otros microorganismos fue de 50.5% de glucosa en el experimento II, y de 42.6 y 42.5% de lactato en los experimentos II y III, respectivamente.

Tabla 5.3 Promedio del desempeño del reactor LFI en los experimentos I, II, III y IV.

Parámetros	I n= 7	II n= 7	III n= 7	IV n= 7
Periodo (d)	28-34	24-30	25-31	27-33
Eficiencia de remoción DQO (%)	34.5 ± 10.7	53.4 ± 1.1	49.5 ± 11.4	52.2 ± 6.5
Eficiencia de remoción de sulfato (%)	27.3 ± 11.3	15.3 ± 1.4	12.5 ± 0.5	11.2 ± 0.8
Sulfuro disuelto (mg/L-d)	105.7 ± 33.3	70.1 ± 5.5	64.4 ± 3	55.3 ± 3.2
Alcalinidad total (mg CaCO3/L)	1110.9 ± 134.1	651.4 ± 25.6	966.8 ± 51.3	940 ± 67.1
pH efluente	7.3 ± 0.2	6.5 ± 0.08	6.9 ± 0.07	6.85 ± 0.1

Tabla 5.4 Balance de lactato, acetato y glucosa en los experimentos I, II, III y IV.

	I n= 7	II n= 7	III n= 7	IV n= 7
Acetato <sub>total</sub> : Acetato <sub>Afl</sub> + Acetato producido por lactato (mg DQO/L-d)	538.65 ± 135.6	857.11 ± 51.1	806.6 ± 30.5	808.4 ± 31.2
Acetato consumido (mg DQO/L-d)	144.1 ± 84.1	397.6 ± 21.8	363.5 ± 110.2	390.6 ± 53.1
Acetato removido (%)	6.3 <sup>a</sup> , 16.8 <sup>b</sup> , 2.5 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> , 45.6 <sup>b</sup> , 2.3 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> y 44.8 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> , 46.4 <sup>b</sup> , 2 <sup>c</sup>
Lactato consumido (mg DQO/L-d)	226.8 ± 74.7	-	224.5 ± 13.7	192.7 ± 4.7
Lactato removido (%)	77.6 <sup>a</sup> y 16.5 <sup>b</sup>	-	57.4 <sup>a</sup> y 42.6 <sup>b</sup>	57.5 <sup>a</sup> y 42.5 <sup>b</sup>
Glucosa consumida (mg DQO/L-d)	-	284.9 ± 12.6	-	-
Glucosa removida (%)	-	49.5 <sup>a</sup> y 50.5 <sup>b</sup>	-	-

<sup>a</sup> Por sulfatorreducción, <sup>b</sup> Por otros microorganismos, <sup>c</sup> Por metanogénesis.

Por otro lado, en el experimento I se observó que el porcentaje de consumo de lactato fue 94.1%, no obstante en este experimento se observó que el 77.6% se consumió por sulfatorreducción y un 16.5% se consumió por otros microorganismos (Tabla 5.4); los resultados del experimento I indicaron que en la biopelícula que se formó existió una menor competencia de otros microorganismos con las BSR por el sustrato. De acuerdo con estos resultados, pudo observarse que es de relevancia el tipo de inóculo que se utiliza para la formación de biopelícula sulfatorreductora en un reactor anaerobio.

Acorde al esquema de la degradación anaerobia (Figura 1.1), el consumo de glucosa en el experimento II pudo llevarse a cabo por microorganismos fermentativos produciendo  $H_2$ ,  $CO_2$  y acetato. Sin embargo, la glucosa también pudo ser transformada a ácidos grasos volátiles, los cuales fueron utilizados por BSR y microorganismos acetogénicos. No obstante, debido a que la biopelícula es una comunidad microbiana compleja, pudieron llevarse a cabo diferentes reacciones oxidativas y fermentativas como las que se muestran en la Tabla 1.1. Por otra parte, de acuerdo a la Figura 1.1, microorganismos acetogénicos pueden utilizar lactato convirtiéndolo a  $H_2$ ,  $CO_2$  y acetato, por lo tanto, podría atribuirse a estos microorganismos el consumo de lactato en los experimentos I, III y IV.

Por otro lado se observó que existió consumo de acetato en los cuatro experimentos. Sin embargo, solo en el experimento I, donde se utilizó el lodo de la maltera, se consumió 6.3% de acetato por sulfatorreducción lo cual no se observó en los experimentos donde se inoculó con el lodo Ricolino o con el lodo Eerbeek. De acuerdo a esto, en la biopelícula del experimento I existió una mayor cantidad de BSR capaces de utilizar el acetato, lo cual se atribuye a los microorganismos presentes en el inóculo del experimento I.

Debido a que en los cuatro experimentos hubo consumo de acetato por microorganismos no sulfatorreductores, en las biopelículas de los experimentos I, II y IV se atribuye un porcentaje de consumo de acetato a microorganismos metanogénicos acetoclásticos, ya que se observó actividad metanogénica en las biopelículas de estos experimentos como se discute en la sección 5.7. En el experimento III no se observó actividad metanogénica como sucedió en los

experimentos I, II y IV, por lo tanto, microorganismos metanogénicos no contribuyeron al consumo de acetato en el experimento III y, el consumo de acetato podría atribuirse a microorganismos acetotróficos.

Los resultados de los experimentos I, II, III y IV indicaron que microorganismos que estaban presentes en los lodos granulares (inóculos) capaces de consumir acetato pero no sulfato lograron adherirse al soporte y ser parte de la biopelícula. Estos resultados concuerdan con Celis *et al.* (2009) que reportaron una diversidad de microorganismos anaerobios facultativos y obligados no sulfatorreductores en la biopelícula de un reactor LFI inoculado con un lodo granular. Por otro lado, un estudio realizado por McMahon y Daugulis (2008) demostraron la importancia del inóculo en el desempeño de un reactor, ellos compararon la capacidad de inmovilización de un cultivo puro y un consorcio de BSR y observaron que *D. desulfuricans* tiene menor capacidad de inmovilización comparada con un consorcio de BSR. Por otra parte, Nagpal *et al.* (2000) usaron un cultivo de BSR que oxida acetato (*Desulfobacter posgatei*) como inóculo en un reactor fluidificado y observaron que existió poca actividad sulfatorreductora en botellas serológicas, sin embargo en el reactor el consumo de acetato fue insignificante. En otro trabajo realizado por Laanbroek *et al.* (1984) estudiaron la competencia entre las BSR que oxidan completamente el sustrato (*Desulfobacter*) y las BSR que oxidan incompletamente el sustrato (*Desulfovibrio*), en un quimiostato con limitación de sustrato y observaron que *Desulfovibrio* llegaba a ser la estirpe dominante aunque las BSR como *Desulfobacter* (consumidor de acetato) estuvieran presentes.

Por otra parte, en los experimentos II, III y IV el consumo de acetato (aproximadamente 50%) por microorganismos no sulfatorreductores evitó la acumulación excesiva de acetato en el sistema impidiendo la disminución del pH en el efluente. No obstante, el acetato es el responsable de la DQO residual en el efluente como se ha reportado por diferentes autores como Silva *et al.* (2002) y de igual manera por Gallegos *et al.* (2009), Celis *et al.* (2009), Sahinkaya *et al.* (2007a), y Kaksonen *et al.* (2004a). Por otro lado, Celis *et al.* (2009) reportaron la acumulación de acetato por oxidación incompleta de los sustratos etanol y lactato,

en un reactor LFI debido a la presencia de BSR (género *Desulfovibrio*) que oxidan incompletamente el sustrato hasta acetato.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en los experimentos realizados, es posible que en el soporte se hayan adherido BSR capaces de oxidar el acetato, sin embargo, el consumo de acetato por sulfatorreducción en los experimentos II, III y IV no llegó a ser apreciable tal como sucedió en el estudio reportado por Nagpal *et al.* (2000) en donde a pesar de usar una especie de BSR que consume acetato (*Desulfobacter postgatei*) para bioaumentar un reactor de biopelícula, no observaron consumo de acetato en el reactor.

## **5.5 Velocidad de producción de sulfuro en las biopelículas de los experimentos I, II, III y IV**

Durante la operación del reactor en los experimentos I, II, III y IV, se realizaron pruebas en lote a diferentes intervalos de tiempo para determinar la velocidad de producción de H<sub>2</sub>S en el soporte, esto con la finalidad de evaluar el desempeño de la biopelícula desarrollada. Los sustratos que se utilizaron como fuente de carbono fueron acetato y lactato (1 g DQO/L) para los experimentos I, III y IV, mientras que para el experimento II los sustratos que se usaron fueron acetato y glucosa (1 g DQO/L).

### **5.5.1 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento I**

La velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento I se muestra en la Figura 5.5.

El lodo que se usó como inóculo en este experimento (lodo maltera) tuvo una velocidad de producción de sulfuro de 1.2 y 3.7 mg H<sub>2</sub>S/L-h con acetato y lactato, respectivamente. Después de 8 días de operación del reactor en continuo se observó que la velocidad de producción de sulfuro de la biopelícula con lactato como sustrato incrementó a 11.8 mg H<sub>2</sub>S/L-h, lo que indicó el enriquecimiento de microorganismos sulfatorreductores que oxidan incompletamente el sustrato. Por otro lado, la velocidad de producción de sulfuro a partir de acetato no varió

significativamente, ya que solo se tuvo una producción de 1.7 mg H<sub>2</sub>S/L-h. Hasta el día 21 la velocidad de producción de sulfuro con lactato permaneció constante, sin embargo con acetato disminuyó. Probablemente en el día 8 la velocidad de producción de sulfuro con acetato que se obtuvo fue en parte por los microorganismos planctónicos que se encontraban en la muestra, ya que en este tiempo existía una cantidad considerable de biomasa suspendida en el reactor. En el día 33 de operación del reactor, la producción de sulfuro con lactato disminuyó a 9.10 mg H<sub>2</sub>S/L-h y con acetato se tenía una producción de sulfuro de 0.89 mg H<sub>2</sub>S/L-h. Al final de la operación del reactor (día 44) se alcanzaron valores de producción de sulfuro de 10.94 y 0.6 mg H<sub>2</sub>S/L-h para lactato y acetato respectivamente. Como se observa en la Figura 5.5 la velocidad de producción de sulfuro con acetato en el día 44 disminuyó 50% con respecto a la velocidad que se obtuvo a los 8 días, no obstante al final del experimento la biomasa del reactor estaba fuertemente adherida al soporte y la cantidad de biomasa planctónica era despreciable, por lo anterior podría atribuirse que la velocidad de producción de sulfuro con acetato al final del experimento fue por la biomasa inmobilizada.

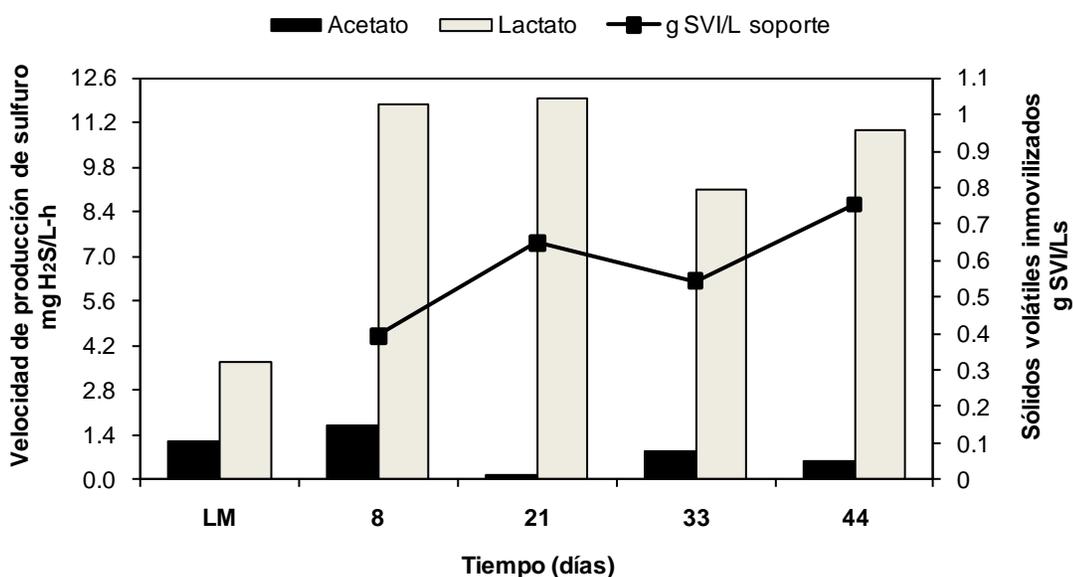


Figura 5.5 Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o lactato, y sólidos volátiles inmobilizados (g SVI/Ls) en el soporte (-■-) a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento I. Inóculo lodo Maltera, LM.

Con respecto a los sólidos volátiles inmovilizados en el soporte, se observa en la Figura 5.5 un incremento a través del tiempo ya que a los 8 días se tenían 0.4 g SVI/Ls, en el día 33 se tenían 0.55 g SVI/Ls y al final del experimento la biomasa inmovilizada en el soporte alcanzó un valor de 0.75 g SVI/Ls (día 44), lo que representa un aumento de casi el doble de SVI respecto a la concentración del día 8.

### **5.5.2 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento II**

La velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento II se muestra en la Figura 5.6. Los sustratos que se utilizaron fueron acetato y glucosa ya que éstos fueron los que se emplearon como fuente de carbono en el experimento II en continuo.

El lodo que se utilizó como inóculo en este experimento (lodo Ricolino) tuvo una velocidad de producción de sulfuro de 0.18 y 1.12 mg H<sub>2</sub>S/L-h con acetato y glucosa respectivamente, siendo menores que las que se tuvieron con el lodo de la maltera que se utilizó en el experimento I. Después de 15 días de operación en continuo, la velocidad de producción de sulfuro aumentó a 0.4 y 7.96 mg H<sub>2</sub>S/L-h con acetato y glucosa, respectivamente. Por otra parte la velocidad de producción de sulfuro con glucosa en el día 22 (8.23 mg H<sub>2</sub>S/L-h) fue prácticamente la misma respecto a la del día 15; con acetato se observó un ligero incremento teniendo una producción de sulfuro de 0.7 mg H<sub>2</sub>S/L-h lo cual mostró que en la biopelícula existió un ligero enriquecimiento de BSR que oxidan completamente el sustrato. Al final del experimento II (día 30) la velocidad de producción de sulfuro con glucosa incrementó a 10.69 mg H<sub>2</sub>S/L-h, sin embargo con acetato disminuyó a 0.21 mg H<sub>2</sub>S/L-h.

Respecto a los sólidos volátiles inmovilizados en el soporte se observó que hubo un incremento muy ligero del día 15 al 22 de 0.1 a 0.14 g SVI/Ls, sin embargo la cantidad de biomasa adherida al soporte incrementó al final del experimento (día 30) ya que se obtuvo una concentración de sólidos adheridos de 0.67 g SVI/Ls, lo cual mostró el crecimiento de la biopelícula a través del tiempo.

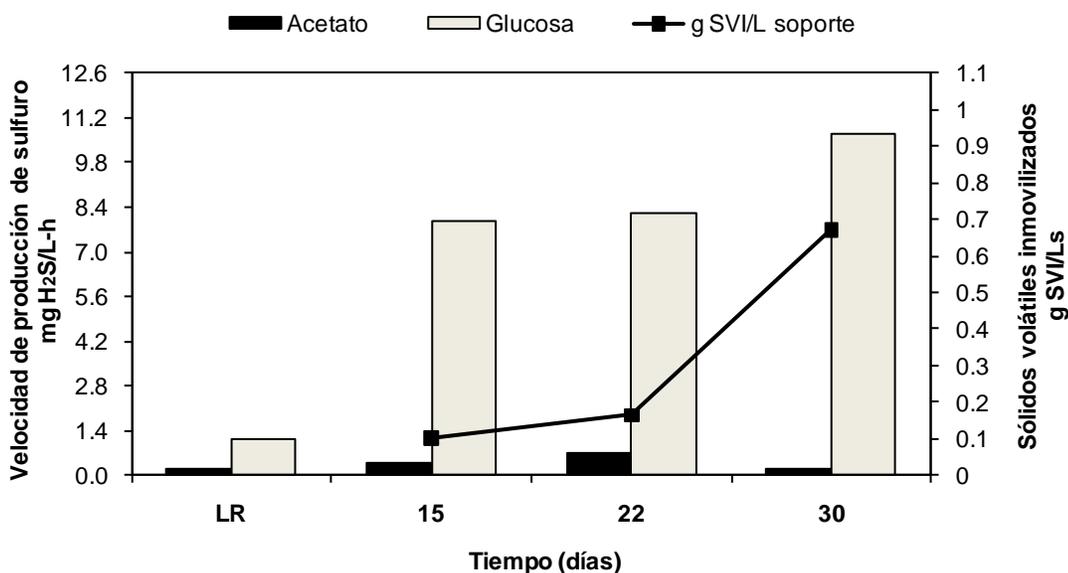


Figura 5.6 Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o glucosa, y sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls) en el soporte (-■-) a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento II. Inóculo lodo Ricolino, LR.

### 5.5.3 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento III

La velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento III se muestra en la Figura 5.7. En este experimento, de igual manera que en el experimento II el inóculo que se usó fue el lodo Ricolino.

En el día 11 de operación en continuo, la producción de sulfuro con lactato en el soporte fue menor (3.9 mg H<sub>2</sub>S/L-h) que la observada en el lodo Ricolino (5.03 mg H<sub>2</sub>S/L-h), sin embargo con acetato la producción de sulfuro incrementó a 0.43 mg H<sub>2</sub>S/L-h. Como se muestra en la Figura 5.7 la producción de sulfuro con lactato fue aumentando a través del tiempo, y al final del experimento (día 32) se obtuvo una velocidad de 8.27 mg H<sub>2</sub>S/L-h. Estos resultados mostraron que existió un enriquecimiento de microorganismos sulfatorreductores que oxidan incompletamente el sustrato. Por otra parte, la producción de sulfuro con glucosa (10.69 mg H<sub>2</sub>S/L-h) en el experimento II fue mayor que la del experimento III con lactato, probablemente la glucosa la usaron microorganismos adheridos al soporte y la fermentaron a otros productos que son usados por las BSR como butirato, propionato e H<sub>2</sub>, y por lo tanto se obtuvo una mayor producción de sulfuro al usar

glucosa como sustrato. Respecto a la velocidad de producción de sulfuro con acetato en el día 32 fue de 0.39 mg H<sub>2</sub>S/L-h, siendo el doble de lo que existía en el lodo granular Ricolino.

Con respecto a los sólidos inmovilizados en el soporte, se observó que existió un incremento a través del tiempo. Al final del experimento se obtuvo un valor de 0.5 g SVI/Ls.

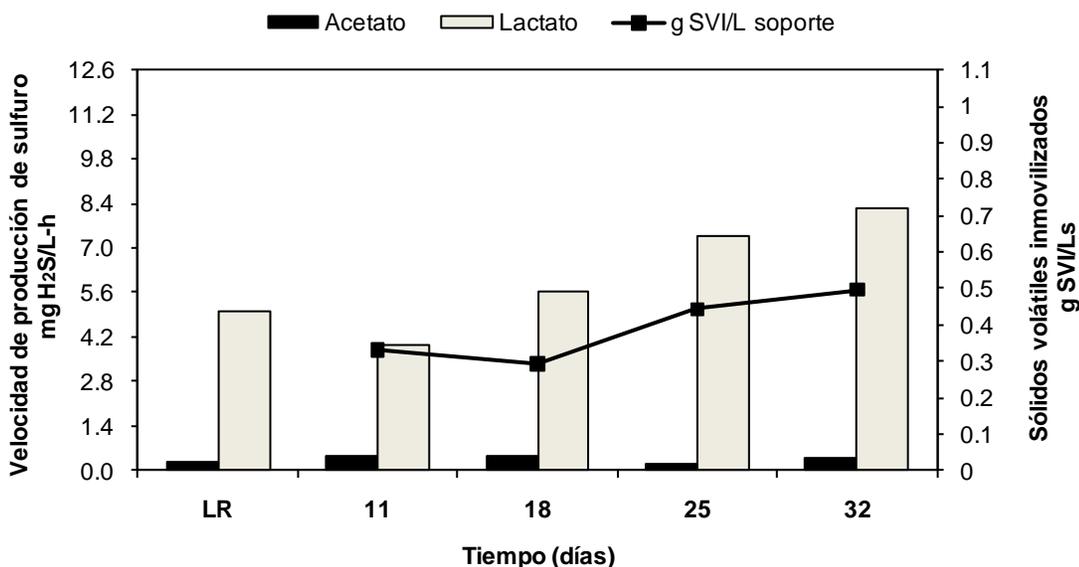


Figura 5.7 Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o lactato, y sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls) en el soporte (-■-) a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento III. Inóculo lodo Ricolino, LR.

#### 5.5.4 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento IV

La velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula del experimento IV se muestra en la Figura 5.8. El lodo que se utilizó como inóculo en este experimento fue el lodo Eerbeek (LE) y los sustratos que se utilizaron fueron acetato y lactato ya que éstos fueron los que se emplearon como fuente de carbono en el experimento IV en continuo.

En el día 11 la producción de sulfuro con lactato y acetato fue de 6.95 mg H<sub>2</sub>S/L-h y 0.12 mg H<sub>2</sub>S/L-h, respectivamente. Estos valores fueron similares a los que se obtuvieron en el inoculo (LE) de 7 y 0.07 mg H<sub>2</sub>S/L-h con lactato y acetato, respectivamente. Sin embargo, al cuantificar la producción de sulfuro con lactato

en la biopelícula se observó una disminución en la velocidad de producción de sulfuro hasta 3.54 mg H<sub>2</sub>S/L-h, en los días 19 y 27. No obstante, al final de la operación del reactor (día 34) la producción de sulfuro con lactato incrementó a 4.6 mg H<sub>2</sub>S/L-h. Estos resultados indicaron que del día 27 al día 34 ocurrió en la biopelícula un enriquecimiento de microorganismos sulfatorreductores que oxidan incompletamente el sustrato. No obstante, en este experimento al final de la operación del reactor la velocidad de producción de sulfuro fue menor a la que existía en el lodo granular, lo cual no sucedió en los experimentos I, II y III. Posiblemente las BSR presentes en el lodo Eerbeck no lograron adherirse al soporte desde un inicio como sucedió en los experimentos I, II y III.

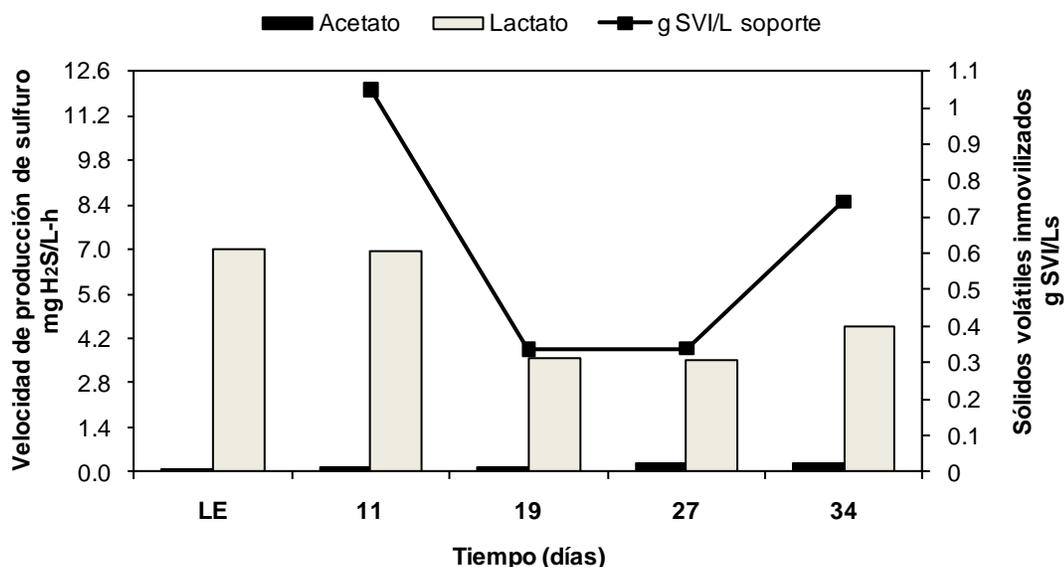


Figura 5.8 Velocidad volumétrica de producción de sulfuro con acetato o lactato, y sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls) en el soporte (-■-) a diferentes tiempos de operación del reactor durante el experimento IV. Inóculo lodo Eerbeck, LE.

Por otra parte, en la Figura 5.8 también se observa que la velocidad de producción de sulfuro con acetato en la biopelícula fue incrementando a través del tiempo. Al final del experimento (día 34) se obtuvo una producción de sulfuro con acetato de 0.29 mg H<sub>2</sub>S/L-h, que fue 4 veces mayor que la que se cuantificó en el lodo granular (lodo Eerbeck), lo cual indicó que existió un enriquecimiento de BSR

que oxidan completamente el sustrato. La consistencia que se observó en el experimento IV respecto al incremento gradual en la producción de sulfuro con acetato a través del tiempo no se presentó en los experimentos I, II y III.

En el día 11 de operación del LFI se observó que la mayor parte de la biomasa planctónica no se había lavado del reactor como ocurrió en los experimentos I, II y III, debido a esto en la muestra se cuantificó una alta cantidad de sólidos que incluyó biomasa suspendida, y que concordó con la alta velocidad de producción de sulfuro con lactato (Figura 5.8). Del día 11 al día 19 la biomasa adherida al soporte disminuyó y coincidió con la disminución de la producción de sulfuro con lactato; sin embargo, la velocidad de producción de sulfuro con acetato permaneció casi constante (Figura 5.8). No obstante, del día 27 al día 34 se observó un aumento ya que los sólidos determinados en la biopelícula incrementaron de 0.34 a 0.74 g SVI/Ls.

## **5.6 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula de los experimentos I, II, III y IV**

Las velocidades de producción de sulfuro descritas en la sección anterior se emplearon para determinar las actividades sulfatorreductoras (ASR) de las biopelículas que se obtuvieron al final de los experimentos I, II, III y IV. La Figura 5.9 muestra el valor de las ASR con los sustratos acetato, lactato o glucosa que se obtuvieron en los experimentos I, II, III y IV en los días 33, 30, 31 y 34, respectivamente.

Como se mencionó en la sección 4.1.2, los experimentos I, III y IV se inocularon con diferentes lodos granulares (lodo maltera, lodo Ricolino y lodo Eerbeek, respectivamente), y se emplearon los mismos sustratos (acetato y lactato). A pesar de que el lodo de la maltera que se usó en el experimento I tenía una menor ASR con lactato comparada con el lodo Ricolino que se utilizó en el experimento III (Tabla 6.2); en la biopelícula del experimento I se obtuvo un valor de ASR con lactato de 9.91 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d en el día 33, muy similar al que se obtuvo en el experimento III de 9.3 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d en el día 32. Por otra

parte, a pesar de que los inóculos que se utilizaron en los experimentos III y IV (lodo Ricolino y lodo Eerbeck, respectivamente) tenían la misma ASR con lactato, se observó que la biopelícula del experimento IV presentó una ASR mucho menor con lactato (3.44 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d) que la que se obtuvo en el experimento III (9.3 g DQO-H<sub>2</sub>S/ g SVI-d). Por lo anterior, en el experimento IV donde se usó el lodo Eerbeck como inóculo, existió un menor enriquecimiento de BSR que utilizan lactato en contraste con los experimentos I y III donde se usaron los inóculos maltera y Ricolino, respectivamente.

Por otro lado, en los experimentos II y III donde se utilizó el mismo inóculo (lodo Ricolino) pero diferente sustrato, se observó que en la biopelícula del experimento III se obtuvo una mayor actividad sulfatorreductora con lactato (9.28 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d) que en el experimento II con glucosa (8.4 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d). Este resultado concuerda con lo esperado, debido a que se ha reportado en la literatura que el lactato es un sustrato que pueden utilizar diferentes especies de BSR (Gibson, 1990). Por otra parte, se observó que en el experimento III donde se utilizaron los sustratos acetato-lactato, la biopelícula que se formó presentó una mayor ASR con acetato de 0.44 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d, mientras que en el experimento II donde se utilizaron los sustratos acetato-glucosa se obtuvo la menor ASR (0.17 DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d).

En la Figura 5.9 se observa que en los experimentos II, III y IV los valores de las ASR con acetato en las biopelículas fueron 0.17, 0.44 y 0.22 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d, respectivamente, mientras que en la biopelícula del experimento I se obtuvo un valor de 0.97 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d con acetato, lo cual indica que en la biopelícula del experimento I existió un mayor enriquecimiento de BSR capaces de utilizar el acetato como sustrato, en contraste con el desempeño de las biopelículas en los experimentos II, III y IV. Dicho enriquecimiento fue posible ya que en el inóculo del experimento I (lodo maltera) la ASR con acetato fue mucho mayor que la que se obtuvo en los inóculos de los experimentos II, III y IV (Tabla 5.2). De aquí la importancia de conocer las características metabólicas del inóculo que se usará para arrancar un reactor de biopelícula.

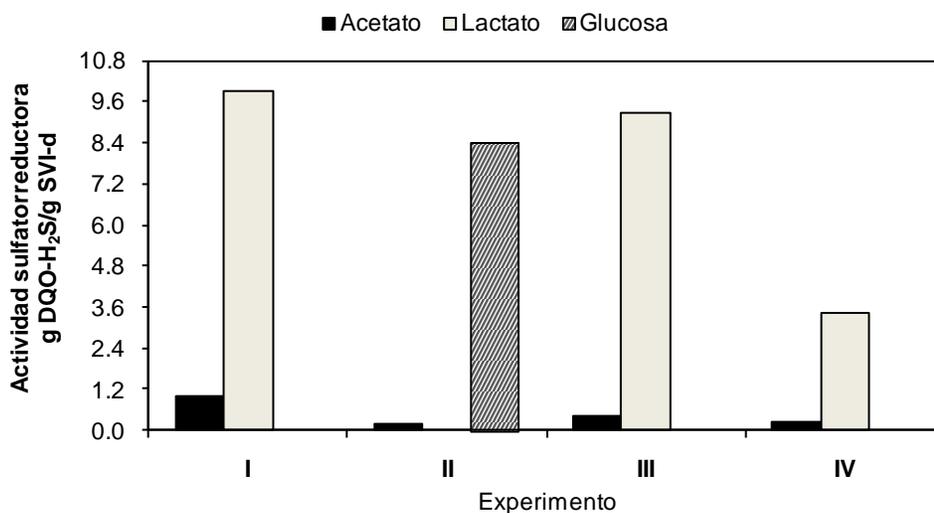


Figura 5.9 Actividad sulfatorreductora con lactato, glucosa o acetato de los experimentos I, II, III y IV.

A pesar de que la ASR con acetato fue mínima al final de los experimentos II, III y IV no se observó en el reactor un consumo de acetato por sulfatorreducción. Esto concordó con el estudio realizado por Nagpal *et al.* (2000) donde no observaron un consumo de acetato por SR en el reactor y lo atribuyeron a diferentes causas como: la concentración de acetato, la inhibición por sulfuro de las BSR que consumen acetato o la competencia entre oxidadores incompletos y oxidadores completos que se encuentran en el reactor.

Los resultados referidos a las actividades sulfatorreductoras con lactato y glucosa que se obtuvieron en los experimentos I, II, III y IV se encuentran dentro del rango de valores reportados por otros autores para un reactor LFI sulfurogénico. Por ejemplo Celis *et al.* (2009) reportaron una ASR de 6 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d con lactato como sustrato y una ASR de 12 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d con etanol a los 35 días aproximadamente de operar en continuo un reactor LFI. Mientras que Gallegos *et al.* (2009) reportaron una ASR de 8.5 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d con etanol a los 35 días de operar en continuo un reactor similar. No obstante, en el trabajo reportado por Celis *et al.* (2009) operaron el reactor en lote durante 45 días, y en el trabajo de Gallegos *et al.* (2009) se partió de una biopelícula ya formada. Por lo tanto, los resultados de las ASR que se obtuvieron en los

experimentos I, II, III y IV indicaron que fue posible formar una biopelícula con actividad metabólica sulfatorreductora en un LFI sin requerir de largos tiempos de operación en lote del reactor.

### **5.7 Actividad metanogénica y fermentativa en la biopelícula de los experimentos I, II, III y IV**

Se determinó la actividad metanogénica y fermentativa en los lodos utilizados como inóculos y en la biopelícula al final de los experimentos I, II, III y IV con el propósito de verificar la posible presencia de microorganismos metanogénicos y fermentativos. En la Tabla 5.5 se muestran los resultados de las actividades metanogénicas y fermentativas de los lodos granulares y biopelículas.

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en los experimentos I, II, III y IV, la actividad fermentativa (AF) en la biopelícula presentó un incremento considerable respecto a la actividad que existía en el lodo granular (Tabla 5.5). La actividad fermentativa en la biopelícula de los experimentos I, II y III fue similar 3.51, 3.42 y 3.28 g DQO-CO<sub>2</sub>/g SSV-d, respectivamente; mientras que en el experimento IV el valor que se obtuvo fue menor (0.80 g DQO-CO<sub>2</sub>/g SSV-d). Los resultados de las AF mostraron que en los diferentes lodos granulares existía la presencia de microorganismos fermentativos; sin embargo el incremento en la actividad fermentativa del soporte señala que hubo un enriquecimiento de las bacterias fermentativas en la biopelícula.

El lodo granular que tuvo la mayor actividad metanogénica fue el lodo de la maltera que se utilizó en el experimento I con una actividad metanogénica de 0.46 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d. Por otra parte, el lodo Ricolino que se utilizó en los experimentos II y III tuvo una actividad metanogénica de 0.35 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d. Mientras que el lodo proveniente de la papelera Eerbeek presentó una actividad metanogénica de 0.15 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d (Tabla 5.5).

Tabla 5.5 Actividad metanogénica y fermentativa de lodos granulares y biopelículas de los experimentos I, II, III y IV.

	AM				AF			
	(g DQO-CH <sub>4</sub> /g SSV-d)				(g DQO-CO <sub>2</sub> /g SSV-d)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
LG	0.46	0.35	0.35	0.15	0.11	0.05	0.05	0.08
Biopelícula	0.18	0.16	0	0.12	3.51	3.42	3.28	0.80

LG- Lodo granular

Los resultados de las AM de las biopelículas de los experimentos I, II y IV (Tabla 5.5) mostraron que los microorganismos metanogénicos que estaban presentes en los diferentes lodos granulares (inóculos) formaron parte de la comunidad microbiana de las biopelículas. Lo anterior reveló que en los experimentos I, II y IV un porcentaje de consumo de acetato en el reactor fue por la presencia de microorganismos metanogénicos. Por otro lado, en el experimento III no se tuvo actividad metanogénica en la biopelícula y, esto demostró que los microorganismos metanogénicos que utilizan acetato como sustrato no estaban presentes en la biopelícula del experimento III y no fueron los responsables del consumo de acetato en el reactor.

De manera similar que en los experimentos I, II, III y IV de este trabajo, en los estudios realizados por Shahinkaya *et al.* (2007b) y Steed *et al.* (2000) reportaron que existió remoción de acetato no acoplada al proceso de sulfatorreducción ni al proceso de metanogénesis, y atribuyeron el consumo de acetato a otros microorganismos, no obstante en dichos trabajos no se proporciona el nombre de los microorganismos que consumieron el acetato. Por otro lado, el resultado de la actividad metanogénica que se obtuvo en la biopelícula del experimento III concuerdan con lo reportado por Gallegos *et al.* (2009), donde observaron que la presencia de microorganismos metanogénicos fue despreciable en un reactor LFI bajo condiciones sulfurogénicas. Asimismo, Celis *et al.* (2009) reportaron que no existió actividad metanogénica en la biopelícula de un reactor de lecho fluidificado

inverso que se operó en condiciones sulfatorreductoras durante 130 días en régimen continuo.

### **5.8 Sólidos volátiles inmovilizados al final de los experimentos I, II, III y IV**

Debido a que los reactores de lecho fluidificado se basan en el desarrollo de biopelículas sobre un soporte para retener una alta concentración de biomasa, y por lo tanto operar a cortos tiempos de residencia hidráulica (TRH); en este trabajo se cuantificó la biomasa que se tenía adherida al soporte durante el transcurso de los cuatro experimentos.

En la Figura 5.10 se muestra la cantidad de sólidos volátiles inmovilizados en los experimentos I, II, III y IV a tiempos similares de operación del reactor LFI (día 33, 30, 31 y 34 respectivamente).

Los sólidos inmovilizados en el soporte durante el experimento I incrementaron a través del tiempo teniendo 0.55 g SVI/L<sub>s</sub> en el día 33. En el experimento II la máxima cantidad de SVI en el soporte fue 0.67g SVI/L<sub>s</sub> en el día 30. En el experimento III la cantidad de biomasa inmovilizada incrementó a través del tiempo teniendo 0.49 g SVI/L<sub>s</sub> en el día 32, y en el experimento IV la cantidad de biomasa inmovilizada fue 0.74 a los 34 días.

Como se observa en la Figura 5.10 la mayor cantidad de sólidos volátiles inmovilizados se obtuvo en los experimentos II y IV (día 30 y 34 respectivamente). No obstante, a pesar de que en el experimento IV se tenía una mayor cantidad de sólidos inmovilizados que en el experimento II, en la biopelícula del experimento IV se obtuvo una menor ASR (Figura 5.9), esto indica que en la biopelícula del experimento IV se obtuvo una mayor producción de sustancias exopoliméricas (EPS) y una mayor cantidad de microorganismos no sulfatorreductores que contribuyeron a tener una alta cantidad de sólidos volátiles inmovilizados, lo cual podría atribuirse a las especies microbianas del inóculo (lodo Eerbeek) que lograron adherirse al soporte y a su capacidad para producir (EPS).

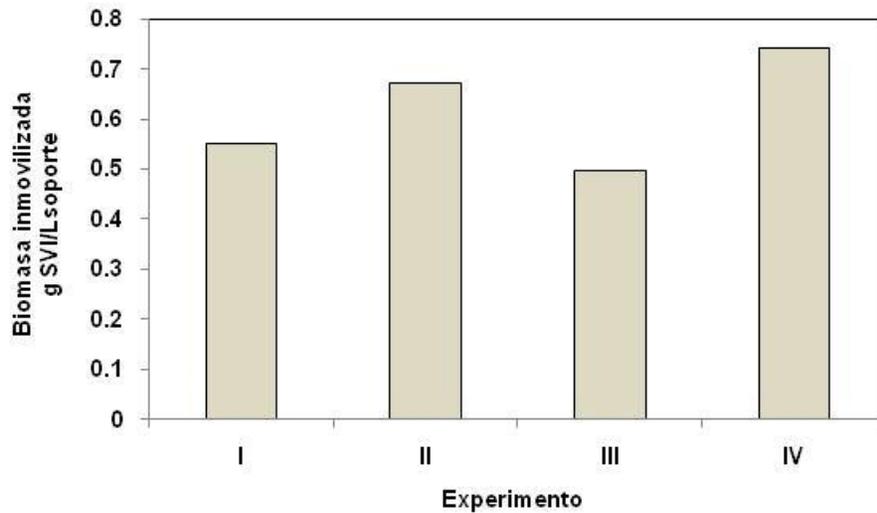


Figura 5.10 Cantidad de biomasa inmovilizada en el soporte al término de la operación del reactor LFI en cada experimento.

Se ha reportado que la mayoría de las bacterias son capaces de producir polisacáridos que se depositan por fuera de la pared celular (cápsula) o como excreciones extracelulares (EPS); sin embargo, algunas especies bacterianas se muestran limitadas en el tipo de polímeros que pueden sintetizar mientras que otros géneros son capaces de producir EPS con un rango amplio de componentes diferentes (Davey y O'toole, 2000). Por otra parte, McMahon y Daugulis (2008) demostraron que la composición microbiana del inóculo juega un papel importante en el desempeño del reactor debido a los componentes cinéticos de las especies y a su potencial de inmovilización, es decir, a su predisposición para adherirse y formar biopelícula.

Por otro lado, en los experimentos donde se utilizó el mismo inóculo (lodo Ricolino) pero diferente sustrato (acetato-glucosa para el experimento II, y acetato-lactato para el experimento III), se observó que en la biopelícula del experimento II se obtuvo una mayor cantidad de sólidos volátiles inmovilizados comparado con la cantidad de sólidos inmovilizados que se obtuvieron en el experimento III. Estos resultados demuestran que la glucosa fue un sustrato que favoreció el crecimiento de microorganismos no sulfatorreductores en la biopelícula que contribuyeron a tener una mayor cantidad de sólidos inmovilizados en el soporte. Sin embargo, por

otro lado es muy posible que en comunidades microbianas similares bajo diferentes condiciones ambientales las EPS jueguen un papel diferente (Davey y O'toole, 2000), lo cual pudo verse reflejado en la cantidad de SVI. En un estudio realizado por Gallegos-García *et al.* (2009) observaron que existió una sobre producción de EPS cuando se adicionaron metales en el afluente de un reactor LFI por lo que cuantificaron una alta cantidad de SVI.

Con respecto a la cantidad de sólidos inmovilizados, autores como Celis-García *et al.* (2008) y Celis *et al.* (2009) han reportado la operación de reactores en lote durante semanas para incrementar el contacto entre el soporte y los microorganismos suspendidos, y de esta manera promover la formación de biopelícula. Sin embargo, Cresson *et al.* (2006) reportó que la adhesión celular ocurre en las primeras horas después del contacto inicial entre el soporte y los microorganismos en un reactor metanogénico de lecho turbulento. De igual manera, Michaud *et al.* (2005) reportaron el lavado de biomasa suspendida en un reactor metanogénico, evitando así la competencia por el sustrato con los microorganismos adheridos al soporte. Asimismo, Silva *et al.* (2002) encontraron que en un reactor en régimen continuo, es importante el lavado de biomasa débilmente adherida al soporte, para de esta manera, mejorar el enriquecimiento de biomasa firmemente adherida.

Por otra parte, la cantidad de sólidos inmovilizados que se obtuvieron en los experimentos II y IV (Figura 6.10) son similares a los reportados por otros autores, por ejemplo Celis *et al.* (2009) reportaron 0.8 g SVI/L<sub>s</sub> a los 33 días de operación en continuo en un reactor fluidificado inverso que disminuyó a 0.76 g SVI/L<sub>s</sub> en el día 105 indicando que la biopelícula alcanzó un estado de madurez, sin embargo en dicho trabajo se operó el reactor en lote durante 45 días antes de poner el sistema en continuo. De igual manera Celis-García *et al.* (2008) reportaron que después de 55 días los sólidos adheridos en el soporte fueron 2.5 g SVI/L<sub>s</sub>, aunque el reactor se operó en lote por más de 30 días antes de operarse en continuo. Por otra parte Gallegos *et al.* (2009) reportaron 1.46 g SVI/L<sub>s</sub> a los 293 días de operar en continuo un reactor similar, sin embargo cabe señalar que se partió de una biopelícula formada en un LFI que permaneció 45 días en lote y 225 días en

continuo con lactato y acetato. Otros autores como McMahon y Daugulis (2008) utilizaron como inóculo una relación 95:5 de *Desulfovibrio desulfuricans*: consorcio de BSR y reportaron que a un TRH de 8.3 min en un reactor de lecho empacado, se obtiene una alta colonización del soporte, aunque no proporcionan el dato de la cantidad de sólidos inmovilizados al soporte.

## 5.9 Concentración de ADN

Para cuantificar la concentración de ADN en los lodos granulares que se usaron como inóculos, se realizó la extracción de ADN como se describe en la sección 4.2.9.

En la Tabla 5.6 se muestra la concentración de ADN presente en el lodo granular de la maltera (LM), lodo Ricolino (LR) y lodo Eerbeck (LE), así como la concentración de ADN de las biopelículas formadas durante el transcurso de los experimentos III y IV. Las muestras B31, B32, B33 y B34 corresponden a las biopelículas que se formaron a los 11, 18, 25 y 32 días de operación en continuo del reactor en el experimento III; y las muestras B41, B42, B43 y B44 corresponden a las biopelículas que se formaron a los 11, 19, 27 y 34 días de operación en continuo del reactor en el experimento IV.

El lodo granular que contenía mayor concentración de ADN fue el lodo Ricolino con 66.06 ng/ $\mu$ L, mientras que el lodo de la maltera y lodo Eerbeck contenían aproximadamente la misma concentración de ADN de 56.20 y 56.16 ng/ $\mu$ L respectivamente. Por otro lado, si se compara la concentración de ADN de los lodos granulares con la cantidad de g SSV/g lodo que se mostró anteriormente (Tabla 5.1), se observa que los lodos granulares (lodo maltera y lodo Eerbeck) que contienen la misma cantidad de SSV/g lodo, también contienen la misma cantidad de ADN. No obstante, en el lodo Ricolino donde se cuantificó una menor cantidad de g SSV/g lodo, se observó que tenía una mayor cantidad de ADN. Estos resultados indican que la cantidad de sólidos suspendidos volátiles por gramo de lodo no es proporcional a la cantidad de ADN.

Como se observa en la Tabla 5.6 la concentración de ADN en la biopelícula del experimento III fue fluctuante a través del tiempo (muestras B31 a B34), mientras que la concentración de ADN en la biopelícula del experimento IV fue incrementando (muestras B41 a B44). Por otro lado, la concentración de ADN en la biopelícula al final del experimento III fue mayor (67.54 ng/μL) que en el experimento IV (52.46 ng/μL). Estos resultados coinciden con el tipo de inóculo que se utilizó en dichos experimentos, ya que en el experimento III se utilizó el lodo Ricolino que contenía mayor concentración de ADN (66.06 ng/μL) que el lodo Eerbeck (56.16 ng/μL) que se usó en el experimento IV.

Tabla 5.6 Concentración de ADN en los lodos granulares y en las biopelículas del experimento III (B31 a B34) y IV (B41 a B44).

Muestra	Concentración (ng/μL)
B31	27.57
B32	64.68
B33	38.86
B34	67.54
B41	33.87
B42	45.56
B43	48.22
B44	52.46
LM	56.20
LR	66.06
LE	56.16

La concentración de ADN en los lodos granulares anaerobios que se utilizaron como inóculos en los experimentos I, II, III y IV concuerdan con la concentración de ADN de un lodo granular anaerobio (62 ng/μL) reportado por Celis *et al.* (2009). Por otra parte, se observó que la concentración de ADN en las biopelículas de los experimentos III y IV fueron similares a la concentración de ADN que existía en los lodos granulares. No obstante, a pesar de que la concentración de ADN en la biopelícula fue similar a la que existía en el lodo, se observó que se obtuvo una mayor ASR en las biopelículas que la que existía en los lodos granulares. De igual manera, Celis *et al.* (2009) reportaron que la

concentración de ADN extraído de una biopelícula que se formó en un reactor LFI por 130 días, fue similar a la del lodo granular que se utilizó como inóculo.

En este trabajo se observó que en el reactor LFI se obtuvo una biopelícula con una concentración de 67 y 52 ng/ $\mu$ L (experimentos III y IV) a los 30 días de operación en continuo, cuya concentración de ADN fue similar a la que obtuvieron Celis *et al.* (2009) a los 130 días de operar en continuo un LFI que previamente permaneció en lote por 45 días.

### **5.10 Análisis de la comunidad microbiana**

En la Figura 5.11 se muestran los geles de agarosa con los productos de PCR que se obtuvieron de los diferentes lodos granulares (LM, LR y LE), y de las biopelículas de los experimentos I, II, III y IV, los cuales se emplearon para llevar a cabo la técnica de DGGE. Por otro lado, la Figura 5.12 muestra el perfil de bandas obtenidas por DGGE y las 25 bandas que se re-amplificaron, para su secuenciación y su análisis filogenético. No obstante, el DNA que se encontraba en las bandas del gel no pudo eluirse de todas las bandas cortadas, por lo que solo las bandas 1, 2, 4, 7, 9, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24 y 25 fueron secuenciadas.

La Figura 5.11 muestra que los productos de PCR de las diferentes muestras (lodos granulares y biopelículas) presentaron la misma longitud de pares de bases (aproximadamente 600).

En el perfil de DGGE (Figura 5.12) cada una de las bandas corresponde a un filotipo de una población que se diferencia por su secuencia de bases y no por su longitud. Así, el patrón de bandas del lodo de la maltera (LM) se caracterizó por presentar una banda intensa y 6 bandas tenues. El lodo Ricolino (LR), también mostró una banda intensa y 4 tenues. El lodo Eerbeek (LE) mostró 4 bandas intensas y tres tenues. La distribución de las bandas en gel fue distinta para los tres casos lo que indica que cada lodo poseía una comunidad microbiana con diferentes filotipos y abundancias de ellos (intensidad de la banda). De igual manera, en el perfil de DGGE se observa que el número de bandas presentes en las muestras de las biopelículas para cada experimento cambiaron través del

tiempo, lo cual indica que la comunidad microbiana de las biopelículas al inicio y al final de la operación del reactor no fue la misma.

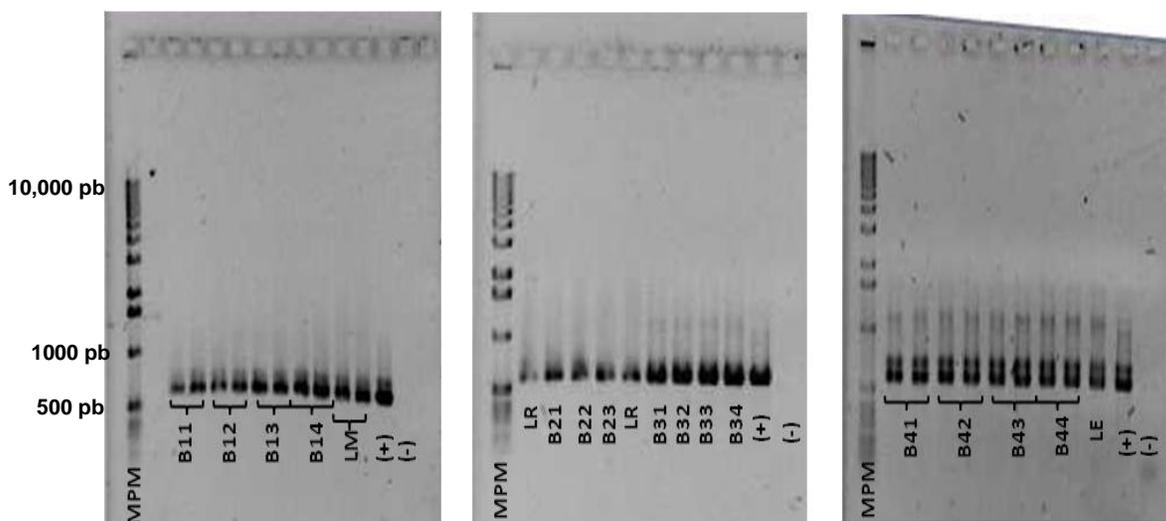


Figura 5.11 Imagen de geles de agarosa de los productos de PCR. Las bandas negras corresponden a los productos de PCR. Izquierda: Lodo granular de la maltera (LM), Centro: Lodo granular Ricolino (LR), Derecha: Lodo granular Eerbeck (LE). Biopelículas del experimento I (B11-día 8, B12-día 21, B13-día 33 y B14-día 44). Biopelículas del experimento II (B21-día 15, B22-día 22 y B23-día 30). Biopelículas del experimento III (B31-día 11, B32-día 18, B33-día 25 y B34-día 32). Biopelículas del experimento IV (B41-día 11, B42-día 19, B43-día 27 y B44- día 34). Reacción positiva (+); reacción negativa (-), marcador de peso molecular de 10 Kb, (MPM).

Por otro lado, en el perfil de DGGE se observa que la comunidad microbiana que existía en el lodo granular fue diferente a la comunidad microbiana de la biopelícula en los días 8, 15, 11 y 11 de los experimentos I, II, III y IV respectivamente, ya que en caso del experimento I donde se inoculó con el lodo de la maltera (LM) y en los experimentos II y III donde se inóculo con el lodo Ricolino (LR), se observó un mayor número de bandas definidas en las biopelículas en los primeros días de operación del reactor (B11, B21, B31) que en los lodos granulares LM y LR. En contraste, en el experimento IV donde se inoculó con lodo Eerbeck (LE) el número de bandas definidas en la biopelícula en los primeros días de operación del reactor se mantuvo con disminución de la intensidad (Figura 5.12). Lo anterior indicó que la población en las biopelículas de

los experimentos cambió respecto a la que existía en los diferentes lodos granulares, lo cual concuerda con los resultados que se mostraron anteriormente (p.ej. las ASR, AM y AF de los lodos granulares y biopelículas).

En la Figura 5.12 también se observa que en los primeros días en las biopelículas de los experimentos I, II, III y IV (B11, B21, B31 y B41) algunas de las bandas definidas permanecieron hasta el final de la operación del reactor siendo más intensas (3, 7, 9, 19, 24), mientras que otras bandas se volvieron menos intensas o desaparecieron (4, 12, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23).

En los experimentos II y III donde se usó el lodo Ricolino como inóculo se observaron diferentes bandas en el perfil de DGGE (B21-B23 y B31-B34), esto demostró que al usar un mismo inóculo pero diferente sustrato la comunidad microbiana en la biopelícula no es la misma, ya que se observó que en el experimento II donde se usó glucosa como sustrato se obtuvo un mayor número de bandas que en el experimento III donde se usó lactato como sustrato.

Debido a los inconvenientes que se tuvieron para eluir el ADN del gel de poliacrilamida, no se pudieron identificar todos los microorganismos presentes en las biopelículas de los experimentos, sin embargo logró detectarse que las biopelículas comprendieron bacterias no sulfatorreductoras que degradaban compuestos orgánicos como glucosa y ácidos grasos, por lo que se atribuye que dichas bacterias compitieron con las BSR por los sustratos en los experimentos I, II, III y IV. Las afiliaciones taxonómicas de la secuencia parcial del ARNr 16S se muestran en la Tabla 5.7.

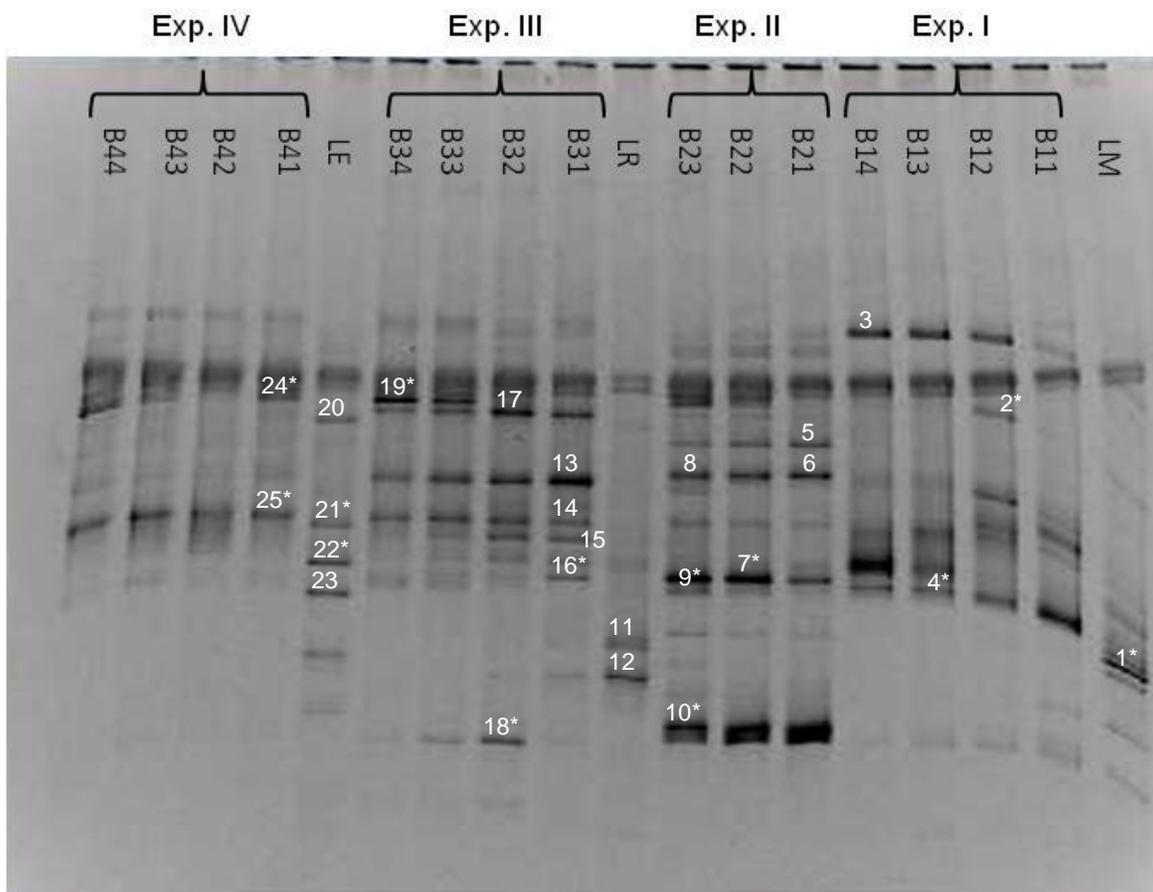


Figura 5.12 Perfil de bandas del DGGE del gen ARNr 16S de las muestras de lodos granulares y biopelículas del LFI a diferentes tiempos. El primer dígito indica el experimento 1(I), 2(II), 3(III) ó 4(IV); el segundo dígito indica el número de muestra con respecto al tiempo, 1 indica la muestra más reciente, 4 indica la muestra al final del experimento. El día exacto en que se tomó la muestra aparece después del signo =. B11=8, B12=21, B13=33, B14=44, B21=15, B22=22, B23=30, B31=11, B32=18, B33=25, B34=32, B41=11, B42=19, B43=27, B44=34. Lodo maltera (LM), lodo Ricolino (LR), lodo Eerbeek (LE). Los números en las bandas indican las bandas que se cortaron. Los asteriscos señalan las bandas que se secuenciaron.

Se ha estimado que cerca del 99% de los microorganismos presentes en la naturaleza típicamente no son cultivables usando técnicas microbiológicas convencionales que se basan en el uso de medios de cultivos, debido a que el medio de cultivo no proporciona las condiciones naturales de crecimiento o porque diferentes linajes de microorganismos son interdependientes. Durante los últimos 15 años, las técnicas moleculares basadas en ADN/ARNr 16S se han aplicado

exitosamente al estudio de la ecología microbiana y han proporcionado medios para identificar los tipos de organismos que se encuentran en comunidades microbianas sin la necesidad de ser cultivadas (Santegoeds *et al.*, 1998; Hugenholtz *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2008). Por otro lado, con la clonación y secuenciación (construcción de bibliotecas), la diversidad de comunidades microbianas presentes en digestores anaerobios se han analizado y han indicado que la mayoría de las especies encontradas en estos sistemas aún no han sido cultivadas y pueden representar nuevos filotipos de microorganismos (Talbot *et al.*, 2008). Por lo anterior, en este trabajo muchas de las bacterias en el reactor se relacionaron taxonómicamente con bacterias que aún no se han aislado o caracterizado por métodos convencionales dependientes de cultivo, es decir, son no cultivadas.

En la Figura 5.12 se observa una banda intensa (1\*) que estuvo presente en el lodo de la maltera que se usó como inóculo en el experimento I, y que mostró un 96% de similitud con la bacteria OP9 (no cultivada) que se ha reportado como parte de la comunidad microbiana de un lodo granular anaerobio (Rivière *et al.*, 2009).

En la biopelícula del experimento I, una de las bandas que se encontró a los 21 días de operación del reactor (2\*) tuvo un 100% de similitud con *Petrimonas sulfuriphila*, que es una bacteria anaerobia fermentativa que crece con lactato y utiliza azufre elemental como aceptor de electrones reduciéndolo a sulfuro (Grabowski *et al.*, 2005). De acuerdo con esto, durante el experimento I *Petrimonas sulfuriphila* fue uno de los microorganismos que compitieron con las BSR por el lactato durante los primeros 21 días de operación del reactor (Figura 5.12 carril B12). Por otro lado, una bacteria no cultivada del género *Clostridium* (banda 4\*) se encontraba en la biopelícula del reactor al final de la operación en continuo. Los microorganismos del género *Clostridium* son bacterias fermentativas capaces de utilizar una variedad de sustratos en condiciones anaerobias, y en el proceso de digestión anaerobia pueden considerarse como acetógenos; por lo tanto, el consumo de DQO por microorganismos no sulfatorreductores pudo ser debido a la presencia de estos microorganismos.

Tabla 5.7 Secuencias de la base de datos NCBI con la mayor similitud para cada banda.

Banda	Asignación taxonómica, cepa (No. de acceso a GenBank)	Identidad (%)
1	Bacteria OP9 no cultivada clon QEDP3DH03 (CU923920)	96
2	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> cepa BN3 (AY570690)	100
4	<i>Clostridium</i> sp. no cultivada aislada de DGGE de la banda LY07 (EU685807)	97
7	Bacteria no cultivada clon E6 (EF583477). (Reactor anaerobio de biomasa inmovilizada que trataba sulfonatos)	95
9	Bacteria <i>Clostridia</i> no cultivada clon B8 (EU551123)	98
10	<i>Citrobacter</i> no cultivada (GQ417271)	92
16	<i>Comamonas testosteroni</i> cepa H18 (EU887829)	98
18	<i>Spirochaeta</i> sp. Buddy (AF357916)	97
19	Bacteria no cultivada clon E16 (AY426460) (Biorreactor anaerobio que trataba agua residual de una industria papelera)	100
	Bacteria sulfatorreductora no cultivada clon 2R2C10 (EF592807)	100
21	Bacteria no cultivada clon 6E1(EF688249)	96
22	<i>Deltaproteobacteria</i> no cultivada clon QEDR2DB04 (CU922160)	96
	<i>Desulfobacteraceae</i> no cultivada clon cLaKi-StA58 (AJ582695)	93
	Bacteria sulfatorreductora STP34 (AJ006619)	93
24	Bacteria sulfatorreductora no cultivada clon 2R2C10 (EF592807)	97
25	Espiroqueta no cultivada aislada de DGGE de la banda AMFC 2-1 (EF506574)	98

Por otro lado, en la biopelícula del experimento II se detectaron microorganismos no sulfatorreductores como *Citrobacter* (no cultivada) y bacteria de la clase *Clostridia* (no cultivada) (Bandas 10\* y 9\*). Los microorganismos del genero *Citrobacter* son anaerobios facultativos, pueden usar D-glucosa y otros carbohidratos como fuente de carbono y energía, se pueden encontrar en suelos y aguas de alcantarillas entre otros. Los microorganismos del genero *Clostridium* son anaerobios obligados muy difundidos en el ambiente, la mayoría son quimiorganótrofos y algunos quiomioautótrofos, son metabólicamente muy diversos y usualmente producen mezclas de ácidos orgánicos y alcoholes a partir de carbohidratos (Holt *et al.*, 1994). Debido a la presencia de bacterias semejantes a *Citrobacter* y *Clostridia* en la biopelícula del experimento II, podría atribuirse a

estos microorganismos un porcentaje de remoción de glucosa en el experimento II. La banda 7 que se observó en el experimento II se relacionó con un clon encontrado en un reactor anaerobio de biomasa inmovilizada que trataba sulfonatos.

En la biopelícula del experimento III se identificaron microorganismos no sulfatorreductores similares a *Comamonas* y *Espiroquetas* (Bandas 16\* y 18\*). De acuerdo con Holt *et al.* (1994) microorganismos del género *Comamonas* son aerobios estrictos, no fermentativos, quimiorganótrofos y crecen en medios que contienen ácidos orgánicos. Sin embargo, este tipo de microorganismos se han encontrado durante el aislamiento de anaerobios de un digestor de una planta de biogás, y además como parte de la comunidad bacteriana en un reactor fluidificado con actividad sulfuro oxidadora (Cytryn *et al.*, 2005). Por otro lado, *Espiroquetas* son microorganismos que pueden ser anaerobios, anaerobios facultativos o aerobios; pueden usar como fuente de carbono y energía diferentes compuestos como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos o alcoholes.

En el lodo Eerbeek que se usó como inóculo para el experimento IV la banda 22\* presentó similitud del 93% con una secuencia de la familia *Desulfobacteraceae*. Microorganismos del género *Desulfobacter* son BSR que generalmente usan acetato como donador de electrones, sin embargo algunas especies pueden usar etanol y unas pocas especies usan H<sub>2</sub> o lactato (Holt *et al.*, 1994). No obstante, la banda 22\* que dió 93% de similitud con *Desulfobacteraceae* no se observó en la biopelícula del experimento IV. Por otra parte, en el lodo Eerbeek se observó la banda 21 que tuvo 96% de identidad con un clon encontrado en un lodo anaerobio.

Por otro lado, en el experimento IV se identificaron bandas que estaban presentes desde el inicio de la formación de la biopelícula y permanecieron hasta el final de la operación del reactor, estas bandas (24\* y 25\*) correspondieron a bacterias sulfatorreductoras (no cultivada) y Espiroquetas (no cultivada).

Especies del género *Clostridium* y Espiroquetas han sido previamente detectadas en lodos granulares anaerobios y en varios biorreactores anaerobios (Sekiguchi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2008), y de igual forma

se han detectado en consorcios sulfatorreductores para tratar efluentes que contienen sulfato y metales (Kaksonen *et al.*, 2004b; Boothman *et al.*, 2006). Por otro lado, diferentes especies de bacterias sulfatorreductoras han sido reportadas en reactores anaerobios por diferentes autores (Celis *et al.*, 2009; Kaksonen *et al.*, 2004b; Briones *et al.*, 2007; Shahinkaya *et al.*, 2007b).

Miembros del orden *Thermotogales* son microorganismos anaerobios obligados, fermentativos y capaces de reducir azufre elemental y/o tiosulfato. La mayoría de estos microorganismos cultivados se han aislado de ecosistemas naturales como el fondo de los océanos, manantiales y reservorios de petróleo. No obstante, también se han encontrado en reactores anaerobios bajo condiciones mesofílicas como se reportó por Briones *et al.* (2007). Por otro lado, Balk *et al.* (2002) describieron el aislamiento y caracterización de un miembro de ese grupo (*Thermotoga lettingae* cepa TMO<sup>T</sup>) de un biorreactor sulfatorreductor termofílico y observaron que este microorganismo puede fermentar una amplia variedad de sustratos orgánicos y es capaz de utilizar productos de la fermentación como acetato cuando un aceptor de electrones adecuado como azufre elemental o tiosulfato están disponibles. Debido a esta información, y porque se observó azufre elemental durante la operación del reactor LFI, es posible que miembros del orden *Thermotogales* fueron parte de la comunidad microbiana de la biopelícula de los experimentos I, II, III y IV, y fueron los responsables del consumo de acetato, no obstante esto no pudo demostrarse por los problemas que se presentaron durante la elución del ADN.

La técnica de DGGE es efectiva no solo para detectar los cambios en la comunidad microbiana sino también para identificar la afiliación filogenética de poblaciones microbianas (Lee *et al.*, 2008). Por lo tanto, los datos de los microorganismos presentes en las biopelículas de los experimentos I, II, III y IV así como de los lodos granulares maltera y Eerbeck fueron validados por análisis filogenético. La Figura 5.13 muestra el árbol filogenético que se obtuvo de las secuencias de bandas del DGGE. Por otro lado, la banda 9\* no se incluyó en el árbol filogenético porque solo tenía 455 pb. En el árbol filogenético se pueden distinguir dos grandes grupos. Uno muy diverso con poca variabilidad (parte

superior del árbol), y otro poco diverso con mayor variabilidad (parte inferior). No obstante, las bandas B7 y B16 no estuvieron relacionadas filogenéticamente a las secuencias de la base de datos proporcionada por Blast, pero se relacionaron filogenéticamente a clones encontrados en digestores anaerobios de gran escala que tratan aguas residuales de la industria papelera (número de acceso AY426460 y AY426468).

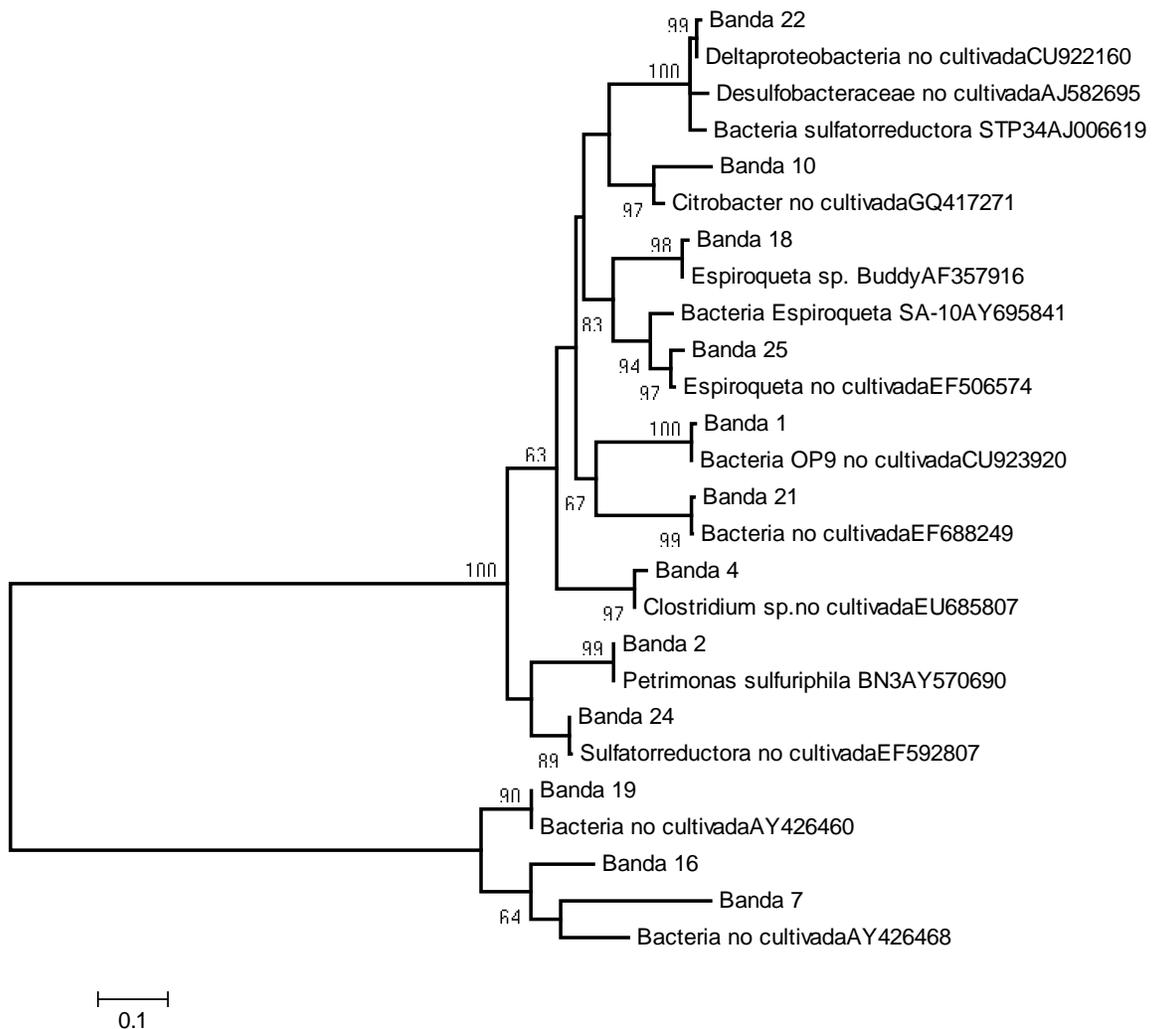


Figura 5.13 Árbol filogenético generado usando el método Neighbor-joining basado en las secuencias de genes ARNr 16S obtenidas de las bandas de DGGE. El número de sustituciones por sitio se representa en la escala. Un Bootstrap de 1000 muestra la confianza de la formación de las ramas. Datos menores de 60 no se muestran.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En los experimentos I, II, III y IV, el lavado de biomasa suspendida al inicio de la operación del reactor favoreció el crecimiento de los microorganismos adheridos al soporte, llevando así a la formación temprana de biopelícula sin operar el reactor en lote por más de 40 días.

La concentración de sulfuro que se obtuvo en los cuatro experimentos, mostró que la estrategia de arrancar el reactor en continuo sin requerir de largos tiempos de operación en lote es útil para la formación temprana de biopelícula con actividad metabólica sulfatorreductora.

De los cuatro experimentos el más adecuado para formar una biopelícula sulfatorreductora fue el experimento I, con lodo proveniente de una planta de tratamiento de efluentes de una maltera y sustratos acetato-lactato ya que se obtuvo una mayor remoción de DQO por sulfatorreducción, producción de sulfuro y alcalinidad.

Microorganismos presentes en los inóculos capaces de consumir acetato pero no sulfato lograron adherirse al soporte y ser parte de la biopelícula, evitando la acumulación excesiva de acetato en los cuatro experimentos.

Aunque el reactor se operó bajo condiciones que favorecieron la sulfatorreducción, la actividad metanogénica en la biopelícula no fue despreciable, a excepción del experimento III. Esto indicó que una parte del acetato consumido fue por microorganismos metanogénicos.

El incremento en la actividad sulfatorreductora y fermentativa del soporte en los cuatro experimentos, mostraron que hubo un enriquecimiento de bacterias sulfatorreductoras y bacterias fermentativas en la biopelícula respecto a las que había en el inóculo.

El tipo de inóculo que se usa para la formación de biopelícula sulfatorreductora es de relevancia, ya que contienen diferentes grupos tróficos de microorganismos que se adhieren al soporte tal como se demostró por el perfil de DGGE, llevando a cabo la formación de biopelículas con una comunidad microbiana diferente, donde las relaciones sintróficas y/o competitivas por el sustrato fueron diferentes respecto a las del lodo granular.

Los resultados obtenidos mostraron que al usar un mismo inóculo pero diferente sustrato, la cantidad de biomasa inmovilizada así como la alcalinidad producida debido a la oxidación de los sustratos fue diferente, lo cual demostró que al usar diferente sustrato existe un cambio en la estructura de la comunidad microbiana de la biopelícula que se forma tal como se mostró en el perfil de DGGE. Por lo tanto, aunque la composición microbiana inicial del inóculo está determinada por los microorganismos presentes, la exposición a diferentes sustratos seleccionó poblaciones más capaces de adherirse al soporte del reactor y utilizar dicho sustrato.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al entendimiento de la diversidad microbiana que existe en un reactor de biopelícula para tratar efluentes que contienen sulfato y proporciona evidencia de la formación de una biopelícula sulfatorreductora en corto tiempo durante el arranque de un reactor anaerobio al usar diferentes inóculos.

Los objetivos se cumplieron ya que se logró la formación de biopelícula sulfatorreductora en el reactor de lecho fluidificado inverso en un corto tiempo y se analizó la influencia que tiene el sustrato e inóculo en la formación de biopelícula sulfatorreductora.

A manera de recomendaciones se propone realizar estudios usando como inóculo una mezcla de los lodos maltera y Ricolino, ya que se demostró que cada uno contiene diferentes especies de microorganismos y con estos se obtuvieron las biopelículas con la mayor actividad sulfatorreductora. Asimismo, se recomienda usar en el afluente una relación acetato-lactato 90/10 porque se reportó que al usar esta mezcla se logró el desarrollo de una biopelícula sulfatorreductora capaz de oxidar completamente los sustratos (Gallegos, 2009). De la misma forma se recomienda realizar estudios microbiológicos usando herramientas moleculares y técnicas convencionales de cultivo para conocer de una manera más completa los microorganismos involucrados en el desempeño del reactor y entender los mecanismos que transcurren al usar una mezcla de lodos granulares con diferentes especies microbianas.

Como perspectiva de este trabajo se propone determinar si la biopelícula desarrollada a los 30 días de operación del reactor es lo suficientemente robusta para tolerar perturbaciones ambientales como cambios en el pH, TRH y carga orgánica para que en un futuro puedan tratarse efluentes industriales como los drenados ácidos de mina.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20<sup>th</sup>. ed. Washington D.C.
- Araki, N., Harada, H. (1994). Population dynamics of methanogenic biofilm consortium during a start-up of anaerobic fluidized bed reactor. *Water Sci. Technol.* 29, 361-368.
- Balk, M., Weijma, J., Stams, A. (2002). *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1361-1368
- Boothman, C., Hockin, S., Holmes, D.E., Gadd, G.M., Lloyd, J.R. (2006). Molecular analysis of a sulphate-reducing consortium used to treat metal-containing effluents. *BioMetals.* 19, 601-609.
- Briones, A. M., Daugherty, B. J., Angenent, L. T., Rausch, K. D., Tumbleson, M. E., Raskin, L. (2007). Microbial diversity and dynamics in multi- and single-compartment anaerobic bioreactors processing sulfate-rich waste streams. *Environ. Microbiol.* 9, 93-106.
- Buffière, P., 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, L. B., Villa-Gómez, D., Alpuche-Solís, A. G., Ortega-Morales, B. O., 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.
- Celis-García L.B., Gonzalez-Blanco G., Meraz M. (2008) Removal of sulfur inorganic compounds by a biofilm of sulfate reducing and sulfide oxidizing bacteria in a down-flow fluidized bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 260-268.
- Celis-García, L. B., Razo-Flores, E., Monroy, O. (2007). Performance of a down-flow fluidized-bed reactor under sulphate reduction conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 771-779.

- Celis-García, M.L.B. (2004). Tesis doctoral: Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes, Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la salud, Iztapalapa, México.
- Chan Choi, Y., Seog Kim, D., Joo Park, K., Koo Song S. (1995). Wastewater treatment in a pilot scale inverse fluidized bed biofilm reactor. *Biotechnol. Tech.* 9, 35-40.
- Colleran, E., Concannon, F., Golden, T., Geoghan, F., Crumlish, B., Killilea, J.E., Henry, M., Coates, J. (1992). Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Water Sci. Technol.* 25, 31-40.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbial Methods.* 4, 33-36.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z. Microbial films. (1995). *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
- Cresson R., Carrère, H., Delgenès, J.P., Bernet, N., (2006). Biofilm formation during the start-up period of an anaerobic biofilm reactor-impact of nutrient complementation. *J. Biochem. Engin.* 30, 55-62.
- Cytryn, E., Minz, D., Gelfand, I., Neori, A., Gieseke, A., De Beer, D., Van Rijn J. (2005). Sulfide-oxidizing activity and bacterial community structure in a fluidized bed reactor from a zero discharge mariculture system. *Env. Sci. Technol.* 39, 1802-1810.
- Davey, M.E., O'toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 847-867.
- Fernández, N., Díaz, E.E., Amils, R., Sanz J.L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbiol. Ecol.* 56:121-132.
- Gallegos, G.M. (2009). Tesis doctoral: Procesos biológicos de sulfatorreducción en biopelículas para la precipitación de metales. Instituto Potosino de

Investigación Científica y Tecnológica, División de Ciencias Ambientales, S.L.P, México.

- Gallegos-García, M., Celis, L.B., Rangel-Méndez, R., 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.
- Gibson, G. R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 769-797.
- Grabowski, A., Tindall, B.J., Bardin, V., Blanchet, D., Jeanthon C. (2005). *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1113-1121.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T., Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998). Minireview. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774.
- Kaksonen, A., Puhakka, J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for treatment of acid mine drainage and recovery of metals. *Eng Life Sci.* 6, 541-564.
- Kaksonen, A.H., Franzmann, P.D., 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., Puhakka, J.A. (2004b). Simple organic electron donors support diverse sulphate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acid metal- and sulphate-containing wastewater. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 47, 279-289.
- Laanbroek, H.A., Geerlings, H.J., Sijtsma. L., Veldkamp, H. (1984). Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and

- Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 329-334.
- Lee, C., Kim, J., Gu Shin, S., Hwang, S. (2008) Monitoring bacterial and archaeal community shifts in a mesophilic anaerobic batch treating a high-strength organic wastewater. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 65, 544-554.
- Lens, P.N.L., Kuenen, J.G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Wat. Sci. Tech.* 44(8), 57-66.
- Lens, P.N.L., Omil, F., Lema, J.M., Hulshoff Pol.L. W. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution- Principles and Engineering*. Lens, P.N.L y Hulshoff Pol.L. (Ed). International water Association Londres. pp. 153-174.
- Liamleam, W., Annachatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol. Advanc.* 25, 452-463.
- López-Cortés, A., Fardeau, M.L., Fauque, G., Joulian, C. and Ollivier, B. (2006). Reclassification of the sulfate-, nitrate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *oxamicus* as *Desulfovibrio oxamicus* sp. nov. comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1495-1499.
- McLeod, F.A., Guiot, S.R., Costerton, J.W. (1990). Layered structure of bacterial aggregation produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1589-1607.
- McMahon, J.L.M., Daugulis, J.A. (2008). Enhancement of biogenic sulfide production in a packed-bed bioreactor via critical inoculums design and carrier material selection. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 855-863.
- McMahon, K. D., Zheng, D., Stams, A. J. M., Mackie, R. I., 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., Delgenès, J. P. (2005). Use of the methane yield to indicate the metabolic behavior of methanogenic biofilms. *Process. Biochem.* 40, 2751-2755.

- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 695-700.
- Muyzer, G., Stams, A.J.M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 6, 441-454.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Peeva, L., Livingston, A. (2000). Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* 70, 370-380.
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J. Biotechnol.* 80, 1-33.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1996). Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process. Biochem.* 31, 699-710.
- Omil, F., Lens, P., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1998). Long-term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 677-685.
- Omil, F., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1997). Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido de sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares. *Revista Afinidad.* Tomo LIV. 353-471
- Oude Elferink, S.J.W.H., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 119-136.
- Rabus, R., Hansen, T.A., Widdel F. (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. y Stackebrandt E. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology and biochemistry.* Springer-Verlag. New York. pp. 659-768.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A. (2009). Towards the

- definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *J. ISME*. 6, 700-714.
- Sahinkaya, E., Ozkaya, B., Kaksonen, A.H., Puhakka, A.J. (2007a). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 1064-1071.
- Sahinkaya, E., Ozkaya, B., Kaksonen, A.H., Puhakka, A.J. (2007b). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at 8 and 65 °C temperatures is limited by acetate oxidation. *Water Research*. 41, 2706-2714.
- Santegoeds, C.M., Ferdelman, T.G., Muyzer, G., De Beer D. (1998). Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *App. Environ. Microbiol.* 64, 3731-3739.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H., Nakamura, K. (1998). Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiol.SGM.* 144, 2655-2665.
- Silva, A.J., Varesche, M.B., Zaiat, M. (2002). Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochem.* 37, 927–935.
- Steed, V.S., Suidan, M.T., Gupta, M., Miyahara, T., Acheson, C.M., Sayles, G.D. (2000). Development of a sulfate-reducing biological process to remove heavy metals from acid mine drainage. *Water Environ. Res.* 5, 530-535.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., Massé, D.I. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research*. 42, 513-537.
- Tarvin, D., Buswell, A. M. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. amer. Chem. soc.* 56, 1751-1755.
- Thauer, R.K., Stackebrand, E., Hamilton, A.W. (2007). Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. Barton L.L. y Hamilton

- A. Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. Cambridge University Press. pp. 1-27.
- Visser, A., Beekma, I., van der Zee, F., Stams, A.J.L., Lettinga G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 549-556.
- Wang, A., Ren, N., Wang, X., Lee, D. (2008) .Enhanced sulfate reduction with acidogenic sulfate reducing bacteria. *J. Hazard. Mater.* 154, 1060-1065.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (ed. A.J.B. Zehnder), John Wiley and Sons, New York. pp. 469-586.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, Jr. P., Fox, G. E. (1990). PCR amplification of 16S rDNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematic. *Curr. Microbiol.* 21, 325-327.
- Zellner, G., Geveke, M., De Macario, E.C., Diekmann, H. (1991). Population dynamics of biofilm development during start-up of a butyrate-degrading fluidized-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 404-409.

## ANEXO 1

### Análisis de varianza simple

Los valores de velocidad de producción de sulfuro obtenidos durante el periodo de operación en continuo de los cuatro experimentos se analizaron mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) con el software STATISTICA 7.

Este análisis permitió corroborar que la velocidad de producción de sulfuro, el porcentaje de remoción de sulfato y el porcentaje de remoción de DQO entre los cuatro experimentos presentó estadísticamente una diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95% como se muestra en el análisis estadístico adjunto.

### One-way ANOVA: Experimentos I, II, III y IV

$H_0$ : Exp I = Exp. II = Exp. III = Exp. IV (Hipótesis nula)

$H_1$ : Exp I  $\neq$  Exp. II  $\neq$  Exp. III  $\neq$  Exp. IV

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

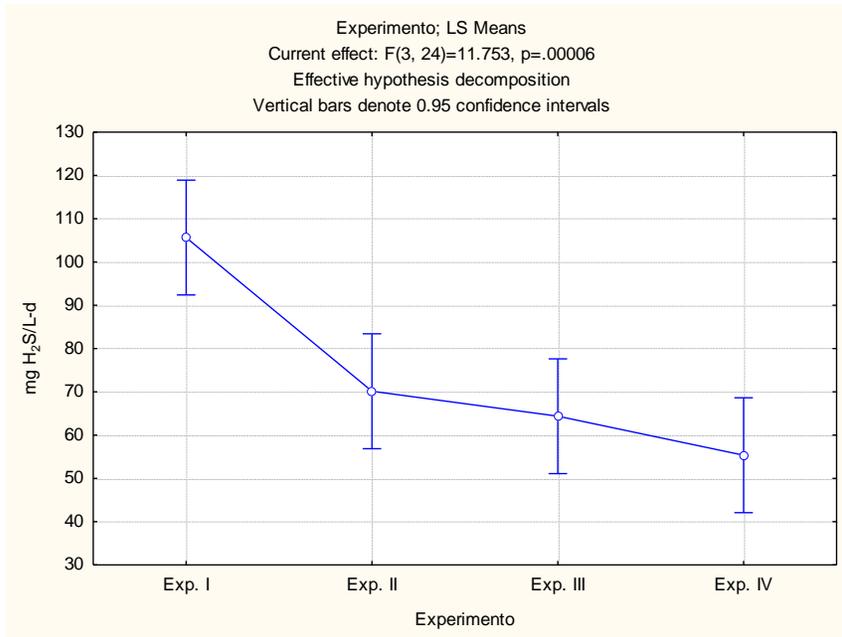
$H_1$ : Existe diferencia significativa en la velocidad de producción de sulfuro por lo menos en uno de los cuatro experimentos.

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

$\alpha = 0.05$

Univariate Tests of Significance for mg H <sub>2</sub> S/L-d (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	152837.4	1	152837.4	528.3967	0.000000
Experimento	10198.2	3	3399.4	11.7525	0.000062
Error	6941.9	24	289.2		

		Descriptive Statistics (Spreadsheet1)					
Effect	Level of Factor	N	mg H <sub>2</sub> S/L-d Mean	mg H <sub>2</sub> S/L-d Std.Dev.	mg H <sub>2</sub> S/L-d Std.Err	mg H <sub>2</sub> S/L-d -95.00%	mg H <sub>2</sub> S/L-d +95.00%
Total		28	73.8815	25.19560	4.76152	64.11168	83.6514
Experimento	Exp. I	7	105.6519	33.26686	12.57369	74.88523	136.4187
Experimento	Exp. II	7	70.1470	5.55968	2.10136	65.00519	75.2889
Experimento	Exp. III	7	64.3672	2.95850	1.11821	61.63109	67.1034
Experimento	Exp. IV	7	55.3599	3.26239	1.23307	52.34265	58.3771



**Conclusión 1:** Ya que  $p = 0.00006 < 0.05$  se cumple el criterio de rechazo de  $H_0$ :  
 Exp I = Exp. II = Exp. III = Exp. IV, por lo que se dice que al menos un experimento  
 es significativamente diferente respecto a la velocidad de producción de sulfuro.

$H_2$ : Exp I = Exp. II = Exp. III = Exp. IV (Hipótesis nula)

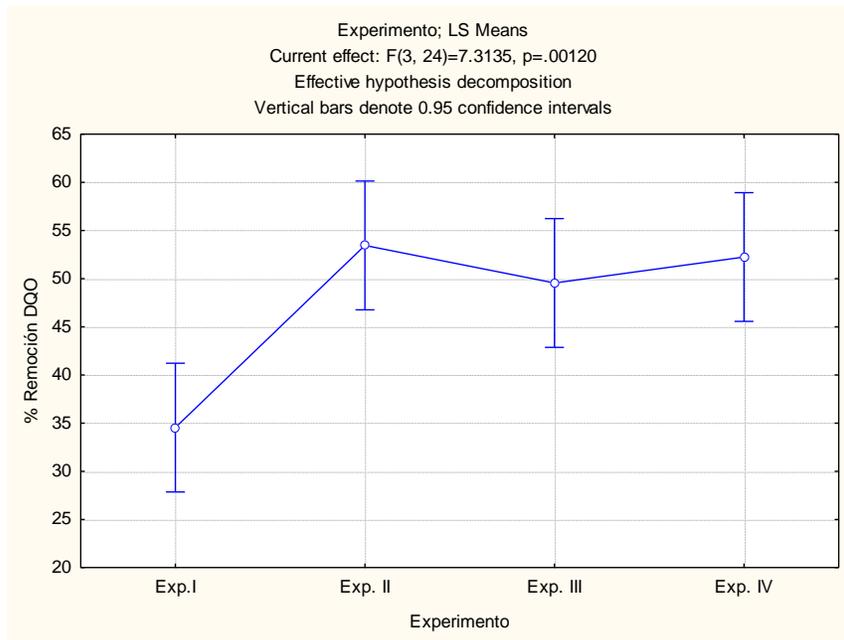
$H_3$ : Exp I  $\neq$  Exp. II  $\neq$  Exp. III  $\neq$  Exp. IV

**$H_2$ :** No existe diferencia significativa en el porcentaje de remoción de DQO entre los cuatro experimentos.

**$H_3$ :** Existe diferencia significativa en el porcentaje de remoción de DQO por lo menos en uno de los cuatro experimentos.

Univariate Tests of Significance for % Remoción DQO (Spreadsheet1)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	63025.13	1	63025.13	858.4744	0.000000
Experimento	1610.77	3	536.92	7.3135	0.001197
Error	1761.97	24	73.42		

Descriptive Statistics (Spreadsheet1)				
Effect	Level of Factor	N	% Remoción DQO Mean	% Remoción DQO Std.Dev.
Total		28	47.44362	11.17659
Experimento	Exp. I	7	34.53623	10.74794
Experimento	Exp. II	7	53.44545	1.05635
Experimento	Exp. III	7	49.54666	11.59211
Experimento	Exp. IV	7	52.24618	6.53069



**Conclusión 2:** Ya que  $p = 0.0012 < 0.05$  se cumple el criterio de rechazo de  $H_2$ :  
 Exp I = Exp. II = Exp. III = Exp. IV, por lo que se dice que al menos un experimento  
 es significativamente diferente respecto al porcentaje de remoción de DQO.

$H_4$ : Exp I = Exp. II = Exp. III = Exp. IV (Hipótesis nula)

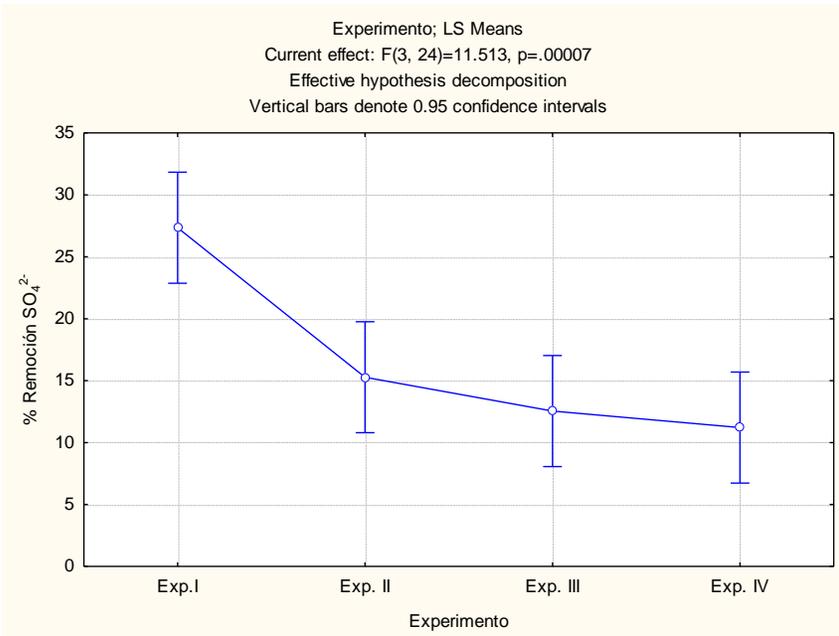
$H_5$ : Exp I  $\neq$  Exp. II  $\neq$  Exp. III  $\neq$  Exp. IV

**H<sub>4</sub>:** No existe diferencia significativa en el porcentaje de remoción de sulfato entre los cuatro experimentos.

**H<sub>5</sub>:** Existe diferencia significativa en el porcentaje de remoción de sulfato por lo menos en uno de los cuatro experimentos.

Univariate Tests of Significance for % Remoción SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7712.361	1	7712.361	233.8128	0.000000
Experimento	1139.269	3	379.756	11.5129	0.000072
Error	791.645	24	32.985		

Descriptive Statistics (Spreadsheet1)				
Effect	Level of Factor	N	% Remoción SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Mean	% Remoción SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Std.Dev.
Total		28	16.59643	8.45667
Experimento	Exp. I	7	27.34929	11.35270
Experimento	Exp. II	7	15.27773	1.44171
Experimento	Exp. III	7	12.54571	0.53984
Experimento	Exp. IV	7	11.21296	0.82886



**Conclusión 3:** Ya que  $p = 0.00007 < 0.05$  se cumple el criterio de rechazo de H<sub>4</sub>: Exp I = Exp. II = Exp. III = Exp. IV, por lo que se dice que al menos un experimento es significativamente diferente respecto al porcentaje de remoción de sulfato.