



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

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**Procesos biológicos de sulfatorreducción en  
biopelículas para la precipitación de metales**

Tesis que presenta

**Marisol Gallegos García**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Aplicadas**

Con Opción Terminal en

**Ciencias Ambientales**

Director de tesis

**Dr. Elías Razo Flores**

Co-director: **Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2009

La tesis "**Procesos biológicos de sulfatorreducción en biopelículas para la precipitación de metales**" presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por Marisol Gallegos García y aprobada el 26 de enero de 2009 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.



---

Dr. Elías Razo Flores  
(Director)



---

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García  
(Co-directora)



---

Dr. José René Rangel Méndez  
(Asesor)



---

Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre  
(Asesor)



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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 002 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de enero del año 2009, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre</b>	<b>Presidente</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. José René Rangel Méndez</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

DOCTORA EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

**Marisol Gallegos García**

sobre la Tesis intitulada:

*Procesos biológicos de sulfatorreducción en biopelículas para la precipitación de metales*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Elías Razo Flores**

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

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

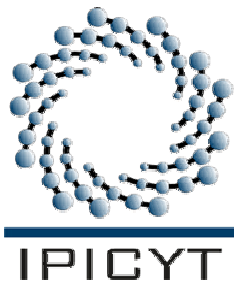
Dándose por terminado el acto a las 14:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de enero de 2009.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



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



Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de Dr. Elías Razo Flores y la Co-dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**175108**). La investigación de esta tesis fue financiada como parte del proyecto SEP-CONACyT-46506, otorgado al Dr. Elías Razo Flores.

El posgrado en Ciencias Aplicadas, con la 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 mis padres, hermanas y esposo con todo mi cariño y admiración  
Sabido que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo quiero  
que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a  
conseguirlo fue su apoyo.

A mis amigos y maestros por su amistad, apoyo y enseñanzas, en especial a Blanca  
Magdalena, Gustavo, Guillermo Andrade, José Luís, Bernardo, Berenice, Miguel Ángel,  
Ciria, Cesar, Nahomy, Miguel Ángel, Angélica y a la Dra. Sonia L. Arriaga.

## **Agradecimientos**

Esta tesis esta dedicada a mi director de tesis Dr. Elías Razo Flores y Co-directora Dra. Maria de Lourdes Berenice Celis García por su confianza, paciencia, ayuda, enseñanzas y motivación. Sobre todo por el haberme dado la oportunidad de aprender nuevos campos de trabajo para enriquecer mis conocimientos a lo largo de esta tesis.

Al Dr. José René Rangel Méndez por su contribución y su disponibilidad durante todo mi trabajo doctoral para la realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torres por su contribución y su disponibilidad para la revisión de la tesis

Por su apoyo técnico, quiero agradecer a la M en C. Dulce Isela de Fátima Patida Gutiérrez y al M en C. Guillermo Vídriales Escobar.

# Índice

Hoja de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	vi
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Nomenclatura	xiv
Resumen	xv
Abstract	xvi
<b>Capítulo 1. Procesos biológicos de sulfatorreducción para la precipitación de metales: Estado del arte</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción	1
1.1.1 Proceso biológico de sulfatorreducción	
1.2 Tecnologías anaerobias de aplicación potencial para la precipitación de metales	9
1.2.1 Reactor UASB	12
1.2.2 Reactores de lecho fluidificado	13
1.2.3 Formación de biopelículas anaerobias	14
1.3 Estructura de la tesis	16
1.4 Referencias bibliográficas	16
<b>Capítulo 2. Materiales y Métodos</b>	<b>20</b>
2.1 Materiales	20
2.1.1 Reactor UASB	20
2.1.2 Reactor LFI	21
2.1.3 Medios de cultivo	21
2.1.3.1 Medio basal de alimentación del reactor UASB	21
2.1.3.2 Medio basal de alimentación del reactor LFI	22
2.1.3.3 Medio basal para determinar la actividad específica	22
2.1.3.4 Solución de elementos traza	22
2.2 Métodos	23
2.2.1 Actividad metanogénica	23
2.2.2 Actividad sulfatorreductora del lodo granular	23
2.2.3 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula	24
2.2.5 Análisis	25
2.3 Cálculos	27
2.3.1 Eficiencia de remoción de DQO	27
2.3.2 Eficiencia de conversión de sulfato	28
2.3.3 Cantidad de DQO utilizada para sulfatorreducción	28
2.3.4 Cantidad de DQO utilizada para metanogénesis	28
2.3.5 Cálculo de las actividades metanogénica y sulfatorreductora	28
2.3.6 Balance de masa de los sulfuros metálicos precipitados	29

2.4 Referencias bibliográficas	30
<b>Capítulo 3. Competencia por sustrato durante el desarrollo de biomasa sulfato reductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB</b>	<b>31</b>
3.1 Resumen	31
3.2 Introducción	32
3.3 Materiales y métodos	34
3.3.1 Condiciones de operación del reactor UASB	34
3.3.2 Medios de cultivo	36
3.3.3 Ensayos de actividad específica anaerobia	36
3.3.4 Análisis	36
3.4 Resultados y discusión	36
3.4.1 Desempeño del reactor UASB	36
3.4.2 Competencia entre los organismos metanogénicos y BSR	39
3.4.3 Actividad específica de los diferentes sustratos	41
3.5 Conclusiones	43
3.6 Referencias bibliográficas	44
<b>Capítulo 4. Precipitación y recuperación de sulfuros metálicos de un agua residual ácida conteniendo metales en un reactor sulfurogénico de lecho fluidificado inverso.</b>	<b>46</b>
4.1 Resumen	46
4.2 Introducción	47
4.3 Materiales y métodos	49
4.3.1 Operación del reactor LFI	49
4.3.2 Medios de cultivo	50
4.3.3 Ensayos de actividad específica anaerobia	51
4.3.4 Análisis	51
4.4 Resultados	51
4.4.1 Remoción de DQO y sulfato	51
4.4.2 Remoción de hierro, zinc y cadmio	54
4.4.3 Actividad sulfatorreductora específica de la biopelícula	57
4.5 Discusión	59
4.5.1 Recuperación de sulfuros metálicos	62
4.5.2 Desempeño de la biopelícula	65
4.6 Conclusiones	65
4.7 Referencias bibliográficas	66
<b>Capítulo 5. Formación de una biopelícula sulfatorreductora de oxidación completa del sustrato para el tratamiento de un efluente sintético con sulfato</b>	<b>68</b>
5.1 Resumen	68
5.2 Introducción	69
5.3 Materiales y métodos	73
5.3.1 Operación del reactor LFI	73
5.3.2 Medios de cultivo	74
5.3.3 Ensayos de actividad específica anaerobia	75
5.3.4 Análisis	75



5.4 Resultados	75
5.4.1 Desempeño del reactor LFI en los experimentos I, II y III	75
5.4.2 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula	81
5.4.3 Reducción del pH en el experimento III	82
5.4.4 Consumo de acetato en el periodo experimental IIIa, b y c	84
5.5 Discusión	85
5.5.1 Velocidad de sulfuro producido y acetato consumido	85
5.5.2 Desempeño de la biopelícula	86
5.5.3 Desempeño del reactor LFI con reducción del pH (periodos IIIa-c)	89
5.6 Conclusiones	91
5.7 Referencias bibliográficas	91
<b>Capítulo 6. Conclusiones generales y perspectivas</b>	<b>94</b>
6.1 Referencias bibliográficas	
<b>Anexo 1</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>99</b>
<b>Anexo 3</b>	<b>100</b>
<b>Anexo 4</b>	<b>101</b>
<b>Currículo vitae</b>	<b>103</b>
<b>Lista de publicaciones</b>	<b>104</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1.1	Ventajas y desventajas de la fuente de carbono y donadores de electrones para la reducción biológica del sulfuro.	7
Tabla 1.2	Efecto de inhibición del sulfuro disuelto (SD) y no disociado (H <sub>2</sub> S) en el crecimiento y utilización del sustrato por las BSR que utilizan etanol y acetato.	8
Tabla 1.3	Ventajas y desventajas de diversos tipos de reactores aplicados en la sulfatorreducción.	10
Tabla 1.4	Precipitación de metales mediante el proceso de sulfatorreducción con diferentes tipos de reactores, materia orgánica y pH en el afluente.	11
Tabla 3.1	Reacciones metabólicas involucradas en la degradación de la materia orgánica en sistemas metanogénicos y sulfatorreductores.	33
Tabla 3.2	Características del afluente y condiciones de operación aplicadas al reactor UASB en las etapas metanogénica y sulfatorreductora.	35
Tabla 3.3	Desempeño del reactor UASB operado en continuo bajo condiciones metanogénicas y de sulfatorreducción.	38
Tabla 3.4	Evolución de las actividades específicas del lodo granular con respecto al tiempo de operación del reactor UASB. Actividad específica metanogénica (AM) y sulfatorreductora (ASR).	42
Tabla 4.1	Condiciones de operación en continuo para la sulfatorreducción y precipitación de metales en el reactor LFI operado a temperatura ambiente (18–26°C).	50
Tabla 4.2	Eficiencias del tratamiento durante la operación en continuo del reactor LFI para la reducción de sulfato y precipitación de metales.	53
Tabla 4.3	Balance de masa de los sulfuros metálicos precipitados y recuperados del reactor LFI en base a periodos de 7 días.	56
Tabla 5.1	Reacciones de sulfatorreducción involucradas en la degradación de la materia orgánica.	70
Tabla 5.2	Donadores de electrones utilizados por diversos géneros de BSR.	72
Tabla 5.3	Condiciones de operación en continuo para el desarrollo de una biopelícula sulfatorreductora de oxidación completa del sustrato en el reactor LFI.	74
Tabla 5.4	Desempeño del reactor LFI operando en continuo bajo condiciones sulfatorreductoras.	78
Tabla 5.5	Balance de acetato consumido y lactato por sulfato reducción, durante los 21 días de operación del reactor LFI en cada experimento	80

## Índice de Figuras

Figura 1.1	Esquema de la degradación anaerobia de la materia orgánica por BSR, organismos metanogénicos y acetogénicos (Lens et al., 2000).	2
Figura 1.2	Ciclo biológico del azufre (Pfening y Widdel, 1981).	3
Figura 2.1	Diagrama del reactor de lecho de lodo de flujo ascendente (UASB). a) alimentación; b) bomba peristáltica; c) afluente; d) cama de lodo; e) efluente; f) salida de gas hacia el medidor de biogás.	20
Figura 2.2	Diagrama del reactor de lecho fluidificado inverso (LFI). a) alimentación; b) afluente; c) lecho fluidificado; d) separador sólido-líquido y ajustador de nivel del agua; e) sello hidráulico; f) efluente; g) recirculación de líquido; h) bombas peristálticas; i) equalizador de flujo.	21
Figura 3.1	Desempeño del reactor UASB con respecto al tiempo de operación. Velocidad de la carga orgánica alimentada ( $\Delta$ ), velocidad de consumo de la carga orgánica ( $\blacklozenge$ ).	37
Figura 3.2	Desempeño del reactor UASB con respecto al tiempo de operación, velocidad de producción de sulfuro ( $\circ$ ), eficiencia de conversión de sulfato ( $\blacksquare$ ).	37
Figura 3.3	Velocidad de consumo de la carga orgánica utilizada por los organismos metanogénicos ( $\square$ ) y bacterias sulfatorreductoras ( $\blacksquare$ ).	40
Figura 4.1	Desempeño del reactor LFI. A: velocidad de carga de DQO ( $\blacksquare$ ), velocidad de remoción de DQO ( $\blacktriangle$ ), temperatura ( $\circ$ ), B: pH afluente ( $--$ ), pH efluente ( $\blacklozenge$ ), alcalinidad por bicarbonato ( $\circ$ ), C: velocidad de producción de $H_2S$ ( $\diamond$ ), y eficiencia de remoción de sulfato ( $\bullet$ ). Ver la Tabla 4.1 para las condiciones de operación.	52
Figura 4.2	Velocidad de carga aplicada al reactor LFI, Fe ( $\Delta$ ), Zn ( $\diamond$ ) y Cd ( $\circ$ ) soluble, eficiencias de remoción de Fe ( $\blacktriangle$ ), Zn ( $\blacklozenge$ ) y Cd ( $\bullet$ ) durante la operación.	55
Figura 4.3	A: Imágenes por microscopia electrónica de barrido de los sulfuros metálicos recuperados en el reactor LFI, durante la adición de Fe (panel izquierdo); Fe y Zn (panel medio); Fe, Zn y Cd (panel derecho). B: diagrama de difracción de rayos-X de los precipitados.	57
Figura 4.4	Inmovilización de las bacterias sulfatorreductoras en el soporte, A: 40 días, B: 141 días, C: 194 días, D: 304 días de operación del reactor LFI. El tamaño de la barra es $2\ \mu m$ .	58
Figura 4.5	Velocidad de producción de $H_2S$ , actividad específica y la biomasa adherida al soporte a diferentes tiempos de operación del reactor LFI en continuo.	59
Figura 4.6	Diagrama de Pourbaix (Eh vs. pH). A: para el sistema Fe-C- $H_2O$ . Las fases sólidas son $Fe(OH)_3$ , $FeCO_3$ , y $Fe(S)$ ; carbono Total = $3.8 \times 10^{-6}$ M; concentración de Fe (II) = $5.7 \times 10^{-3}$ M. B: Sistema	64

	Fe-S-H <sub>2</sub> O. Las fases sólidas son FeS y FeS <sub>2</sub> . Concentración de sulfuro = $7.2 \times 10^{-3}$ M y la concentración de Fe (II) = $5.7 \times 10^{-3}$ M (25°C). Diagramas construidos con la ayuda del software HSC Chemistry 4.1 (Outokumpu, Research Oy, Finlandia).	
Figura 5.1	Ruta metabólica de oxidación del sustrato orgánico. A: oxidación incompleta del sustrato hasta acetato; B: oxidación completa del acetato hasta CO <sub>2</sub> en base a la modificación del ciclo el ácido cítrico.	71
Figura 5.2	Desempeño del reactor LFI durante 21 días de operación, A: Eficiencia de remoción de DQO total en los experimentos I (▲), II (■) y III (◆); porcentaje de DQO utilizada por las BSR en los experimentos I (Δ), II (□) y III (◇). B: velocidad de sulfuro producido en el experimentos I (▲), II (■) y III (◇). C: velocidad de acetato consumido en los experimentos I (▲), II (■) y III (◇).	77
Figura 5.3	Velocidad de producción de sulfuro utilizando acetato como sustrato (-Δ-). Concentración de sulfuro producido con acetato (□) y lactato (■) en las pruebas en lote después de 21 días de operación del reactor en cada prueba.	81
Figura 5.4	Perfil de la cantidad de biomasa adherida a los 21 días de operación del reactor LFI en cada experimento, medida como sólidos volátiles inmovilizados por litro de soporte.	82
Figura 5.5	Desempeño del reactor LFI operado por 89 días más, a partir de los 21 días iniciales, con una relación acetato/lactato en base a DQO de 90/10. A: Velocidad de carga de DQO (■), velocidad de consumo de DQO utilizada por las BSR (□). B: pH afluente (--), pH efluente (◆), alcalinidad por bicarbonato (○), C: velocidad de producción de H <sub>2</sub> S (◇) y eficiencia de remoción de sulfato (●).	83
Figura 5.6	Desempeño del reactor LFI con respecto al consumo de acetato. El reactor se operó por 89 días más después de los 21 días iniciales con una relación de acetato:lactato (como DQO) de 90/10. Acetato en el afluente más el generado por la oxidación incompleta del lactato (○); acetato total consumido (◆) expresados como g DQO/L-d; porcentaje de acetato consumido vía sulfatorreducción (▲).	85
Figura A.1.1	Fotografía del aspecto visual del reactor de lecho fluidificado inverso (LFI). A: antes de la adición de metales; B: después de la adición de metales.	97
Figura A.2.1	Diagrama de Pourbaix (Eh vs. pH). A: para el sistema Zn-C-H <sub>2</sub> O. Las fases sólidas son Zn(OH) <sub>2</sub> , ZnCO <sub>3</sub> y Zn(S); CT= $3.8 \times 10^{-6}$ M, la concentración de Zn(II) = $3.46 \times 10^{-3}$ M. B: sistema Cd-N-C-H <sub>2</sub> O. Las fases sólidas son CdCO <sub>3</sub> , y CdS; CT= $3.8 \times 10^{-6}$ M, la concentración de Cd(II) = $1.78 \times 10^{-4}$ M. Condiciones del medio de alimentación del reactor LFI. Diagramas construidos con la ayuda del software HSC Chemistry 4.1 (Outokumpu, Research Oy, Finlandia).	98
Figura A.2.2	Diagrama de Pourbaix (Eh vs. pH). A: para el sistema Zn-S-H <sub>2</sub> O.	99

Las fases sólidas son ZnS y Zn(OH)<sub>2</sub>. La concentración de sulfuro fue de  $7.2 \times 10^{-3} \text{ M}$  y la concentración de Zn(II) =  $3.46 \times 10^{-3} \text{ M}$  (25°C). B: sistema Cd-S-N-H<sub>2</sub>O. Las fases sólidas son CdS y Cd(OH)<sub>2</sub>. La concentración de sulfuro fue de  $7.2 \times 10^{-3} \text{ M}$  y la concentración de Cd(II) =  $1.78 \times 10^{-4} \text{ M}$  (25°C). Condiciones dentro del reactor LFI. Diagramas construidos con la ayuda del software HSC *Chemistry 4.1* (Outokumpu, Research Oy, Finlandia).

## NOMENCLATURA

<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>UASB</b>	Upflow anaerobic sludge blanket (lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente)
<b>LFI</b>	Lecho fluidificado inverso
<b>FBR</b>	Reactor de lecho fluidificado
<b>BSR</b>	Bacterias sulfatorreductoras
<b>AM</b>	Actividad específica metanogénica
<b>ASR</b>	Actividad específica sulfatorreductora
<b>ECS</b>	Eficiencia de conversión de sulfato
<b>TRH</b>	Tiempo de residencia hidráulica
<b>CH<sub>4</sub></b>	Metano
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Sulfato
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro de hidrógeno
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles
<b>SVI</b>	Sólidos volátiles inmovilizados
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>Eh</b>	Potencial oxido-reducción

**Marisol Gallegos García (2009) Procesos biológicos de sulfatorreducción en biopelículas para la precipitación de metales. Tesis Doctoral. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

**Resumen**

La contaminación ambiental por metales pesados es un asunto de importancia debido a su impacto en la salud pública, el medio ambiente y finalmente en la economía. La sulfato reducción se ha convertido en una alternativa para el tratamiento de aguas residuales que contienen metales. El objetivo general de este trabajo fue estudiar la aplicación de procesos biológicos de sulfatorreducción en reactores de biopelícula para la precipitación y recuperación de sulfuros metálicos en una sola etapa. En primera instancia se estudió la competencia entre los microorganismos sulfatorreductores y metanogénicos en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) que fue operado en continuo durante más de 240 días, para desarrollar biomasa sulfatorreductora a partir de un lodo granular de origen metanogénico. La demanda química de oxígeno (DQO) removida por sulfatorreducción fue de 20% y la concentración total del sulfuro alcanzada fue de 310 mg/L. Los valores de actividad sulfatorreductora y metanogénica (0.29 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d y 0.35 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d, respectivamente) corroboraron el desarrollo de bacterias sulfatorreductoras (BSR). La presencia de BSR que oxidan incompletamente el sustrato a acetato, permitió que los organismos metanogénicos no estuvieran limitados por sustrato y, consecuentemente, no fueran completamente desplazados por las BSR al final de la operación del reactor. Posteriormente, se propuso un reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) para la precipitación y recuperación de metales. El reactor LFI se operó en continuo durante 320 días y se obtuvieron eficiencias de precipitación de Fe, Zn y Cd mayores a 99.0%. Los sulfuros metálicos recuperados ascendieron al 90% de la masa teórica esperada predominando la pirita (FeS), esfalerita (ZnS) y greenockita (CdS). La carga de metales no afectó el desempeño del reactor aún a valores de pH tan bajos como 5.0. La remoción de DQO fue de 54%, lo cual sugirió la oxidación incompleta del sustrato por las BSR inmovilizadas en la biopelícula, esto fue corroborado por la acumulación de acetato en el efluente y la nula producción de alcalinidad. Finalmente, se estudió el desarrollo de una biopelícula sulfatorreductora capaz de oxidar completamente el sustrato orgánico. Para tal efecto, se utilizó la presión de selección por sustrato realizando tres diferentes pruebas en un reactor LFI alimentado con una mezcla acetato/lactato con las siguientes proporciones en base a DQO: 50/50, 80/20 y 90/10 durante 21 días. El mejor desempeño en base a eficiencia de remoción de DQO (71%) y velocidad de producción de sulfuro con acetato (2.9 mg H<sub>2</sub>S/L-h) se logró con la biopelícula desarrollada a una proporción acetato/lactato de 90/10. Una vez seleccionada la biopelícula el reactor LFI se operó en continuo durante 110 días, al disminuir el pH de la alimentación hasta 4.0 no se observó ningún efecto inhibitorio sobre las BSR tal como lo demostró el desempeño del reactor con una eficiencia de remoción de DQO y sulfato de 80 y 42%, respectivamente. La alcalinidad producida por la oxidación del sustrato neutralizó el pH del afluente manteniendo un pH de 7.0 dentro del reactor. Este trabajo es el primero en reportar la precipitación y recuperación de metales en forma de sulfuros metálicos en una sola etapa y el desarrollo en tiempos cortos de biopelículas sulfatorreductoras capaces de oxidar completamente los sustratos.

**Marisol Gallegos García (2009). Sulfate reducing biological processes in biofilms for metal precipitation. Ph.D. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

**Abstract**

The environment contamination by heavy metals is an important matter due to its negative impact over the public health, the environment and the economy. Sulfate reduction has become an alternative for the treatment of wastewaters that contain heavy metals. The general objective of this work was to study the application of biological sulfate reduction processes in biofilm reactors for metal precipitation and recovery of the metal sulfides in one step. First of all, the competence between methanogens and sulfate reducers was studied in an UASB reactor that was operated for over 240 days, for the development of sulfate reducing biomass from a methanogenic granular sludge. The chemical oxygen demand (COD) removed by sulfate reduction was 20% and the total sulfide concentration reached in the reactor was 310 mg/L. The specific sulfate reducing and methanogenic activities of the granular sludge pointed out to the development of sulfate reducing bacteria (SRB). The presence of SRB that oxidize incompletely the substrate to acetate, allowed the permanence of methanogens that were not limited by substrate, and in consequence were not completely displaced by the SRB at the end of reactor operation. Afterwards, a down-flow fluidized bed reactor (DFFB) was proposed for the precipitation and recovery of metals. The DFFB reactor was operated continuously during 320 days and precipitation efficiencies over 99.0% of Fe, Zn and Cd were obtained. The recovered metal sulfides amounted to 90% of the theoretical mass expected to be precipitated; pyrite (FeS), sphalerite (ZnS) and greenockite (CdS) predominated in the precipitate. The metal loading rate did not affect the reactor performance even at pH values as low as 5.0. The COD removal efficiency was close to 54%, which suggested an incomplete substrate oxidation by the immobilized SRB, this was confirmed by the high concentration of acetate in the effluent and the absence of alkalinity production. Finally, the development of a sulfate reducing biofilm able to oxidize completely the substrate was studied. To achieve this, a selection pressure by substrate was used; three different assays were carried out in the DFFB reactor that was fed with a mixture of acetate/lactate with the following ratios on a COD basis: 50/50, 80/20 and 90/10 during 21 days. The best biofilm performance in terms of COD removal efficiency (71%) and sulfide production rate (2.9 mg H<sub>2</sub>S/L-h) was obtained with the biofilm developed in the experiment with the 90/10 acetate/lactate ratio. With this biofilm, the reactor was operated continuously 110 days. When the pH in the fed was decreased to 4.0, any inhibitory effect was observed over the SRB, as the reactor performance showed which achieved COD and sulfate removal efficiencies of 80 and 42%, respectively. The alkalinity produced by the complete oxidation of the substrate neutralized the influent pH, and maintained a pH of 7.0 within the reactor. This work is the first to report the precipitation and recovery of metals as metal sulfides in one step and the development, in a short period of time, of a SRB biofilm able to oxidize completely the substrate.



# **Capítulo 1. Procesos biológicos de sulfatorreducción para la precipitación de metales: Estado del arte**

## **1.1 Introducción**

Las aguas residuales municipales y de efluentes agroindustriales tienen un contenido de sulfatos de 50 a 200 mg/L; en la industria procesadora del papel, tenerías y la industria de la fermentación el contenido de sulfatos puede ser hasta de varios gramos por litro, como resultado del uso de ácido sulfúrico, un ácido muy concentrado, fuerte y relativamente barato (Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

Existen otros tipos de efluentes como son las aguas residuales ácidas provenientes de los procesos mineros que generalmente contienen altas concentraciones de sulfato, metales pesados y valores de pH entre 2 y 3 (Johnson, 2000). Este es uno de los mayores problemas que afectan a las compañías mineras, debido a la contaminación de arroyos, ríos y a las infiltraciones hacia aguas subterráneas. La presencia de metales es generada por la oxidación e hidrólisis de los sulfuros metálicos principalmente piritita ( $\text{FeS}_2$ ) provocando que el hierro, sulfato y otros productos de oxidación se solubilizan produciendo una corriente ácida muy contaminante (Johnson, 2000). La generación de estas aguas residuales ácidas puede continuar durante más de 100 años después del cierre y abandono de minas debido a que la oxidación de las capas más profundas de los residuos no es instantánea, ya que los residuos sulfurosos tienden a ser depositados en presas de jales, en terreros mineros y aguas de mina vertidas bajo condiciones de intemperismo (Szczepanska y Twardowska, 1999).

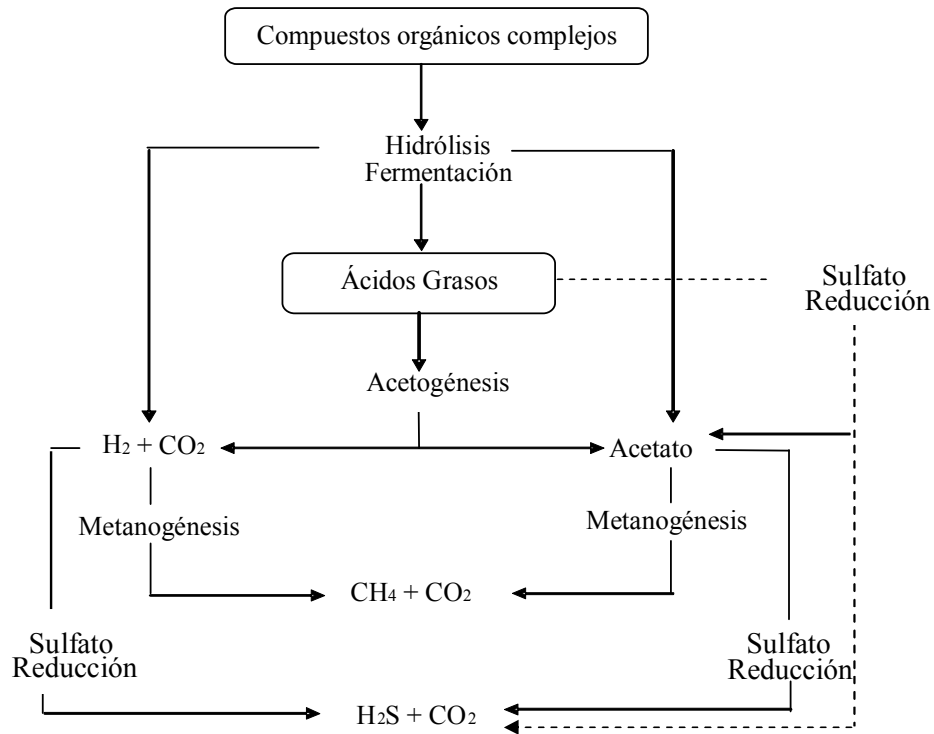
Uno de los procesos que actualmente se ha convertido en una alternativa conveniente para el tratamiento de efluentes industriales con un alto contenido de sulfatos y metales, es el proceso biológico anaerobio de sulfatorreducción que se describe a continuación.

### **1.1.1 Proceso biológico de sulfatorreducción**

En el proceso de digestión anaerobia, la materia orgánica contenida en residuos orgánicos o agua residual es transformada a biogás, el cual contiene principalmente metano y dióxido de carbono. Este proceso biológico natural es realizado por grupos o comunidades de bacterias en sistemas abiertos o cerrados conocidos como reactores, y se lleva a cabo en varias etapas como se muestra en la Figura 1.1 y se describe a continuación.

- 1) *Hidrólisis*: Desintegración de la materia orgánica compleja e insoluble. En este paso los carbohidratos, proteínas y lípidos son hidrolizados a azúcares monoméricos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga.
- 2) *Acidogénesis*: En esta etapa las bacterias acidogénicas convierten las moléculas orgánicas en ácidos grasos volátiles (AGV) tales como butírico, propiónico y acético, aunque etanol y láctico también pueden ser producidos.
- 3) *Acetogénesis*: consiste en la conversión de AGV a acetato e hidrógeno.
- 4) *Metanogénesis*: Es la formación de metano por la descarboxilación de acetato por microorganismos metanogénicos acetotróficos y por la hidrogenación de dióxido de carbono por microorganismos hidrogenotróficos.

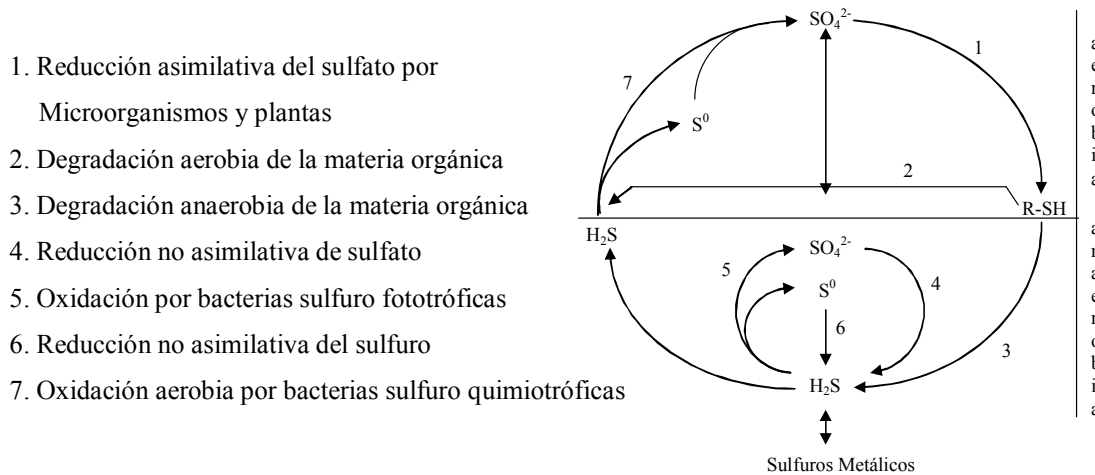
En la presencia de sulfato se lleva a cabo la sulfatorreducción, en esta etapa ocurren las reacciones de oxidación de ácidos grasos volátiles con más de dos átomos de carbono así como la oxidación de acetato por las bacterias sulfatorreductoras (BSR) acetotróficas y de hidrógeno molecular por BSR hidrogenotróficas (Visser, 1995).



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

En presencia de sulfato, los organismos metanogénicos y acetogénicos pueden competir con las BSR por sustratos como H<sub>2</sub>, acetato, propionato y otros ácidos grasos, por lo que la producción de H<sub>2</sub>S y CH<sub>4</sub> estará determinada por el resultado de esta competencia. Las propiedades cinéticas de las especies microbianas involucradas pueden usarse para predecir el resultado de la competencia por estos sustratos comunes. Los parámetros cinéticos del modelo de Monod, como la afinidad por el sustrato (K<sub>s</sub>) y la tasa de crecimiento específica (μ<sub>max</sub>) se pueden aplicar a los microorganismos que crecen en suspensión (Rinzema y Lettinga, 1988).

Una ventaja adicional de las BSR sobre los organismos metanogénicos es que las BSR tienen una mayor afinidad por el hidrógeno y por diversos compuestos. Existen algunos factores que se sabe tienen influencia en la competencia microbiana entre las BSR y los organismos metanogénicos como son la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 0.66 (teóricamente existe el suficiente sulfato en el medio para que toda la materia orgánica presente sea utilizada por las BSR), composición del inóculo, disponibilidad de nutrientes, sustrato orgánico, energía libre de reacción, condiciones de operación, la capacidad de adhesión de la bacterias, así como factores ambientales tales como pH y temperatura (Oude Elferink *et al.*, 1994; Hulshoff Pol *et al.*, 1998). El proceso de sulfatorreducción forma parte del ciclo biológico del azufre y los principales pasos se muestran esquemáticamente en la Figura 1.2.



**Figura 1.2** Ciclo biológico del azufre (Pfening y Widdel, 1981).

El ciclo del azufre consiste de un número de etapas de oxidación-reducción. El sulfato es reducido a sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) vía reducción no asimilativa o reducción asimilativa del sulfato seguida por la degradación anaerobia de la materia orgánica. La principal ruta para la reducción del sulfato a sulfuro es por la reducción no asimilativa. El H<sub>2</sub>S formado puede ser oxidado por otras rutas aerobias a sulfato o azufre elemental.

El proceso biológico de sulfatorreducción se basa en la oxidación de un sustrato orgánico y la reducción del sulfato produciendo sulfuro de hidrógeno por bacterias sulfatorreductoras (Ec 1.1). Además de la producción de alcalinidad por la oxidación de la materia orgánica (Widdel 1998). Sin embargo si la cantidad de H<sup>+</sup> del medio esta en exceso el equilibrio se favorecerá hacia la formación de CO<sub>2</sub> (g) con la consecuente ausencia de alcalinidad. Por otro lado si existe la cantidad suficiente de cationes en el medio el equilibrio se desplazara hacia la formación de bicarbonatos (Ec. 1.2) ver anexo 1.



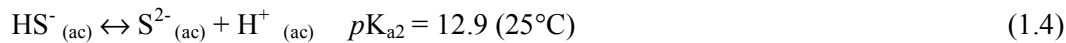
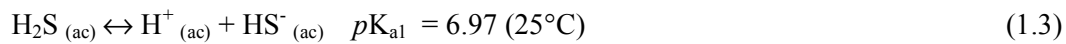
Donde CH<sub>2</sub>O = Matéria orgánica (donador de electrones)



Diferentes grupos de bacterias anaerobias estrictas las cuales son morfológicamente diversas por sus posibilidades metabólicas llevan acabo el proceso de sulfatorreducción. Las BSR pueden ser divididas en dos grupos: 1) las que oxidan completamente el sustrato a dióxido de carbono. Este grupo contiene a los géneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium*, entre otros; 2) las que oxidan incompletamente el sustrato generando acetato como producto final. La oxidación incompleta es debida a la ausencia de un mecanismo para la oxidación de la Acetil-CoA (Kaksonen y Puhakka, 2007). Este grupo contiene a los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, entre otros (Visser, 1995; Nagpal *et al.*, 2000). La mayoría de las BSR del primer grupo crecen más lentamente, con tiempos de duplicación alrededor de 15 horas, mientras que el segundo grupo tiene tiempos de duplicación cercanos a las tres horas.

Las BSR pueden oxidar varios productos intermediarios derivados de la degradación anaerobia de compuestos orgánicos complejos incluyendo el H<sub>2</sub>, ácidos carboxílicos, alcoholes, algunos azúcares y compuestos aromáticos (Visser, 1995). Muchas de las aguas residuales que contienen sulfato y metales son bajas en materia orgánica. El costo-efectividad de los bioprocesos de sulfatorreducción depende en gran medida del donador de electrones y la fuente de carbono que necesitan ser adicionados. La selección del donador de electrones dependerá de (Tabla 1.1): *i*) la habilidad de las BSR a utilizar el sustrato, *ii*) el costo del sustrato requerido por unidad de sulfato reducido, *iii*) la biodegradabilidad del sustrato y *iv*) la posible contaminación por el sustrato residual (como es el acetato) por la degradación incompleta del sustrato (Van Houten *et al.*, 1994; Dries *et al.*, 1998).

El proceso de sulfatorreducción es inhibido por el pH, cuando este favorece el predominio del H<sub>2</sub>S en el medio, que es la forma más tóxica del sulfuro ya que puede penetrar directamente la membrana celular (Oleszkiewicz *et al.*, 1989; Visser *et al.*, 1996). La concentración del H<sub>2</sub>S no ionizado depende del equilibrio químico.



Como el primer valor de  $pK_{a1}$  es cercano a 7, pequeñas variaciones en el pH en un rango de 6-8 afectarían significativamente la concentración del H<sub>2</sub>S no disociado (Oude Elferink *et al.*, 1994; Kaksonen *et al.*, 2004a).

El H<sub>2</sub>S afecta las funciones del metabolismo y puede adherirse a los sitios activos de las enzimas (Visser *et al.*, 1995) y causar desnaturalización de proteínas formando puentes sulfuro o bisulfuro de las cadenas polipeptídicas e inhibir la actividad de las bacterias. El H<sub>2</sub>S puede también afectar su asimilación y el pH intracelular (Hulshoff Pol *et al.*, 1998). Además el H<sub>2</sub>S precipita los metales necesarios de tal modo que reduce su biodisponibilidad, especialmente el hierro lo cual puede afectar significativamente el crecimiento de las BSR (Isa *et al.*, 1986). Es difícil obtener de la literatura una mayor comprensión acerca de la toxicidad del sulfuro en las BSR, ya que no siempre es considerado el efecto del pH en los diseños experimentales (O'Flaherty *et al.*, 1999).

En la Tabla 1.2 se muestran los valores obtenidos por el efecto de inhibición del sulfuro sobre BSR. Varios estudios han reportado el efecto del sulfuro en el crecimiento de las BSR por ejemplo, Visser *et al.* (1996) descubrieron que a altos niveles de pH, el crecimiento de las BSR esta inhibido más fuertemente que la actividad. La sensibilidad de las BSR a la toxicidad del sulfuro también es reportada en base a las especies bacterianas involucradas. Maillacheruvu y Parkin (1996) estudiaron BSR que oxidan el propionato, acetato y el hidrógeno y reportaron que especialmente las bacterias acetotróficas fueron altamente sensibles a H<sub>2</sub>S. Similarmente, Yamaguchi *et al.* (1999) reportaron que las BSR que utilizan el acetato fueron más susceptibles a la inhibición por sulfuro que los que usan hidrógeno. Sin embargo, Celis-García *et al.* (2004) reportaron que BSR en un sistema de biopelícula tienen una mayor tolerancia a sulfuro que en un lodo granular. Kaksonen *et al.* (2004a) reportaron que la oxidación de etanol fue más afectada por la presencia de sulfuro, que la oxidación de acetato.

Los cationes metálicos y oxianiones pueden ser tóxicos para las BSR a bajas y altas concentraciones. El H<sub>2</sub>S producido por las BSR puede reaccionar rápidamente con muchos metales resultando en una precipitación de sulfuros metálicos, reduciendo la toxicidad de los metales (Karri *et al.*, 2006). Sin embargo, la toxicidad de los metales depende de muchos factores tales como la cantidad de biomasa, pH, fuente de carbono, concentración de sulfato, el tipo de metales y su concentración (Hao *et al.*, 2000). La toxicidad del sulfuro puede disminuir por la precipitación del sulfuro al adicionar metales tales como el hierro (Gupta *et al.*, 1994).

Diferentes estudios reportan la inhibición de las BSR por la presencia de metales pesados. Hao *et al.* (1994) estudiaron la toxicidad de los metales Cd, Cr(III), Cr(VI), Cu, Ni y Zn, reportando una completa inhibición en la actividad de las BSR a concentraciones de >4, 60, 4, >80, 10, 40 mg/L, respectivamente, en un cultivo mixto en tubos por 3 semanas. Mientras que Ueki *et al.* (1991) reportaron una completa inhibición en un cultivo de BSR con los metales Cd, Cu, Ni y Zn a concentraciones de 112, 64, 59 y 65 mg/L, respectivamente, en un digestor. Por otro lado, Cabrera *et al.* (2005) reportaron que los metales Cr(III), Cu, Mn, Ni y Zn fueron tóxicos para una cepa pura de *Desulfovibrio sp* a concentraciones de 14.5, 3.8, 9.8, 8.2 y 19.0 mg/L, respectivamente.

**Tabla 1.1** Ventajas y desventajas de la fuente de carbono y donadores de electrones para la reducción biológica del sulfuro (Kaksonen y Puhakka, 2007).

Fuente de carbono	Ventajas (+) y desventajas (-)
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Un gran numero de BSR pueden crecer en H<sub>2</sub></li> <li>+ Termodinámicamente, las BSR crecen mejor con H<sub>2</sub> que con acetato u otros compuestos reducidos de 2, 3 ó 4-C</li> <li>+ Las BSR pueden competir con los organismos metanogénicos por hidrógeno</li> <li>+ Más económicos para altas cargas de sulfato</li> <li>- Incrementa los costos de inversión</li> <li>- La transferencia de masa puede ser la etapa limitante por que el H<sub>2</sub> es poco soluble en solución acuosa</li> <li>- Su disponibilidad puede ser limitada</li> </ul>
Gás de síntesis (H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> +CO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Bajo costo</li> <li>- El CO puede inhibir algunas BSR</li> <li>- Su disponibilidad puede ser limitada</li> </ul>
Acetato	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solo algunas BSR son capaz de oxidar el acetato</li> <li>- Baja producción de biomasa</li> <li>- Los organismos metanogénicos pueden competir con las BSR</li> </ul>
Lactato	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Buena fuente de carbono para muchas BSR</li> <li>+ Alta producción de biomasa</li> <li>+ Alta producción de alcalinidad</li> <li>- Alto costo</li> <li>- La oxidación incompleta puede causar acumulación de acetato en el efluente</li> </ul>
Etanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ La habilidad de utilizar etanol es común entre las BSR</li> <li>+ Fácilmente oxidado por las BSR</li> <li>+ Bajo costo</li> <li>- Los costos son mas altos que operando con H<sub>2</sub></li> <li>- La oxidación incompleta no produce alcalinidad y causa acumulación de acetato en el efluente</li> </ul>
Glucosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto costo comparado a materiales vegetales</li> <li>- Pude causar una caída en el pH debido a la acumulación de ácidos orgánicos</li> </ul>
Metanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Bajo costo</li> <li>+Las BSR pueden competir con los organismos metanogénicos a altas temperaturas</li> <li>- Solo algunas BSR pueden utilizar metanol</li> </ul>
Material vegetal <sup>a</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Bajo costo</li> <li>- Uso limitado</li> <li>- La posible competitividad por bioconversión</li> <li>- Pude causar una caída en el pH debido a la acumulación de ácidos orgánicos</li> </ul>
Productos de desechos <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Bajo costo</li> <li>- Su disponibilidad puede ser limitada</li> <li>- La posible competitividad por bioconversión</li> <li>- La oxidación incompleta del sustrato genera DQO remanente en el efluente</li> </ul>

<sup>a</sup>Material vegetal = alfalfa, centeno, paja, arroz, musgo de pantano, composta de hojas, malezas, lodos de aguas residuales, etc.; <sup>b</sup>Productos de desechos= productos del papel, hidrolizante de plantas, celulosa, estiércol, aserrín y madera, etc.

**Tabla 1.2** Efecto de inhibición del sulfuro disuelto (SD) y no disociado (H<sub>2</sub>S) en el crecimiento y utilización del sustrato por las BSR que utilizan etanol y acetato. Modificada de Kaksonen y Puhakka (2007).

Sustrato	Biomasa	Tipo de experimento	T (°C)	pH	SD (mg/L)	H <sub>2</sub> S (mg/L)	Inhibición	Referencia
Etanol	Lodo granular	Lote en botellas serológicas	37	6.8	500-561	262-294	50% <sup>c</sup>	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
				7.2	788-880	241-269		
				7.6	878-990	131-147		
Etanol	Lodo granular	Lote en botellas serológicas	35	8.0	1019-1130	66-74	1.00% <sup>d</sup>	Kalvuzhnyi <i>et al.</i> , 1997
				8.5	1004-1164	22-25		
				7.1-8	1700-9951	570-610		
Etanol	Cultivo mixto	<sup>a</sup> UASB	35	6.9-7.3	225-248	76-84	KI <sup>e</sup>	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004
Acetato	Lodo granular	Reactor UASB en lote	30	7	521	217	5.0% <sup>e</sup>	Visser <i>et al.</i> , 1996
Acetato	Lodo granular	Lote en botellas serológicas	37	6.8	374	196	50% <sup>e</sup>	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
Acetato	Lodo granular	Lote en botellas serológicas	35	7	699	270	50% <sup>d</sup>	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1999
Acetato		Lote en botellas serológicas	30/37	6.8	443-583	233-306	50% <sup>c</sup>	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
				7.2	671-926	205-283		
				7.6	660-1360	98-203		
				8.0	659-1500	43-98		
Acetato, propionato, butirato	Lodo granular	Lote en botellas serológicas	35	7.5	850	-	5.0% <sup>d</sup>	Celis-García <i>et al.</i> , 2004
Acetato	Lodo granular	Lote en botellas serológicas	-	7.2-7.4	615	171	5.0% <sup>e</sup>	Visser <i>et al.</i> , 1996
Acetato	Cultivo mixto	Lote en botellas serológicas	.	-	35	8	KI <sup>e</sup>	Maillacherruvu <i>et al.</i> , 1996
Acetato	Cultivo mixto	FBR	35	6.9-7.3	338-356	118-124	KI <sup>f</sup>	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004

<sup>a</sup>UASB = reactor anaerobio de lecho de lodos granular; <sup>b</sup>FBR = reactor de lecho fluidificado; <sup>c</sup>inhibición del crecimiento; <sup>d</sup>inhibición de actividad sulfatorreductora; <sup>e</sup>inhibición de actividad de utilización de sustrato; KI = Constante de inhibición.



Las BSR pueden llegar a adaptarse al contenido de metales del medio ambiente. Sin embargo, los metales pueden causar mayores efectos adversos en sistemas en lote que en procesos en continuo. En una biopelícula las capas externas pueden proteger las capas internas de las concentraciones inhibitorias debido a la resistencia a la transferencia de masas (Gantzer, 1989). Además, Teitzel y Parsek (2003) muestran que las biopelículas son más resistentes a cobre y plomo que las células libres. Ellos sugieren que las biopelículas secretan sustancias extracelulares poliméricas que pueden proteger a las células reteniendo los metales pesados y retardando su difusión dentro de la biopelícula (Gantzer, 1989).

## **1.2 Tecnologías anaerobias de aplicación potencial para la precipitación de metales**

El proceso biológico de sulfatorreducción ha sido estudiado en numerosos diseños de reactores y ha sido utilizado satisfactoriamente para tratar una gran variedad de aguas residuales y en especial para aguas que contienen un alto contenido de sulfato y metales en solución. En la Tabla 1.3 se presentan las ventajas y desventajas de los tipos de reactores utilizados.

Por lo general, la precipitación y separación de sulfuros metálicos se ha efectuado en procesos de una o dos etapas. En estudios realizados por Bhagat *et al.* (2004) y Tabak *et al.* (2003) reportan la producción de sulfuro y precipitación de metales en unidades separadas. En la primera unidad se lleva a cabo el proceso biológico de reducción de sulfato a sulfuro, y en la segunda unidad se lleva a cabo la precipitación química de los metales como sulfuros metálicos utilizando el H<sub>2</sub>S biogénico generado en la primera unidad. El tener un proceso de unidades separadas permite la recuperación de los minerales valiosos, los cuales no van a estar aglomerados con la biomasa previniendo la toxicidad por sulfuro y metales hacia las BSR (Sierra-Alvarez *et al.*, 2007). Sin embargo, la desventaja de tener un sistema de unidades separadas es que generan altos costos de inversión y operación (Kaksonen *et al.*, 2004a). En contrapartida, también se han reportado trabajos en los cuales la producción biológica de sulfuro y la precipitación de sulfuros metálicos se dan en una sola etapa (Kaksonen *et al.*, 2003b). La desventaja de este proceso es que la biomasa y los sulfuros metálicos se encuentran mezclados, teniendo que ser separados posteriormente.

**Tabla 1.3** Ventajas y desventajas de diversos tipos de reactores aplicados en la sulfatorreducción (Kaksonen y Puhakka, 2007).

Tipo de reactor	Ventajas (+) y desventajas (-)
Reactor de tanque agitado (CSTR, por sus siglas en inglés)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pobre retención de biomasa</li> <li>+ Consistente, fiable y rápidas condiciones de equilibrio</li> </ul>
Proceso anaerobio de contacto (ACP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Mejor retención de biomasa comparado con un CSTR</li> <li>- El bombeo de la biomasa puede romper los floculos</li> </ul>
Reactor filtro anaerobio (AFR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Mayor tiempo de retención de lodo que en el CSTR</li> <li>+ Bajas fuerzas cortantes</li> <li>+ Posibilidad de utilizarlo en modo de flujo descendente.</li> <li>+ Elimina eficientemente el H<sub>2</sub>S en modo de flujo descendente</li> <li>- Posible canalización del flujo</li> <li>- Los gradientes de presión pueden ser grandes</li> </ul>
Reactor de lecho fluidificado (FBR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Mayor área superficial para la formación de la biopelícula</li> <li>+ Alta retención de biomasa en el material</li> <li>+ Eficiente transferencia de masa</li> <li>+ Pequeños gradientes de presión</li> <li>+ No hay canalización de flujo</li> <li>+ Dilución en la concentración del afluente debido al flujo de recirculación</li> <li>+ Recuperación de los sólidos desde el fondo del reactor en el modo de lecho fluidificado inverso.</li> <li>- Necesita energía para fluidificar el material de soporte</li> <li>- Menos volumen disponible para la biomasa comparado con un reactor UASB, debido al material de soporte</li> </ul>
Reactor de lecho de lodo granular de flujo ascendente (UASB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ No hay canalización del flujo</li> <li>+ No hay compactación del lodo</li> <li>+ No hay obstrucción</li> <li>+ Posibilidad de obtener altas velocidades de tratamiento</li> <li>- Mayor susceptibilidad a cambios en la cantidad del afluente</li> <li>- La biomasa es lavada del sistema comúnmente cuando hay fallas en el proceso</li> </ul>
Reactor anaerobio híbrido (AHR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Menor susceptibilidad a obstrucciones comparado con AFR</li> <li>+ Fácil remoción del lodo comparado con AFR</li> <li>+ Mayor retención de biomasa que en el UASB</li> </ul>
Reactor anaerobio con deflectores o compartimentos (ABR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Mayor tiempo de retención del lodo</li> <li>+ Buena tolerancia a los choques de carga orgánica e hidráulicos</li> </ul>
Reactor de membrana (MBR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Aumento en la retención de biomasa comparado con un reactor en suspensión</li> <li>+ Previene que las BSR tengan contacto directo con la tóxicos del agua residual</li> <li>- Contaminación de membranas debido al crecimiento microbiano o precipitación de metales</li> </ul>

**Tabla 1.4** Precipitación de metales mediante el proceso de sulfatorreducción con diferentes tipos de reactores.

Tipo de reactor	Biomasa	Fuente de carbono	TRH (h)	pH afluente	pH efluente	Concentración de metales en el afluente (mg/L)	Metales precipitados (%)	Referencia
FBR	Lodo granular sulfatorreductor	Lactato Etanol	6.8	5.2	6.8	Zn: 0.3 Cd: 0.5 As: 0.4	99.8	Somlev <i>et al.</i> , 1998
UASB	Lodo granular metanogénico adaptado a sulfatorreducción	Glucosa	7.2	6.5	7.1	Zn: 2.1-30.1 Cu: < 0.1 1.0	99.9	Tuppurainen <i>et al.</i> , 2000
FBR	Sedimentos de mina y lodo granular metanogénico	Lactato Etanol	16	2.5	7.5 - 8.5	Zn: 15-340 Fe: 57	99.8	Kaksonen <i>et al.</i> , 2003a
UAB	Lodo granular metanogénico adaptado a sulfatorreducción	Lactato	24	2.6	7.3	Zn: 98 Fe: 67 Cu: 19	98.0	Quan <i>et al.</i> , 2003
FBR UASB	Lodo granular sulfatorreductor	Lactato	16	3.0-3.2	7.5-8.5	Zn: 170-230 Fe: 58	99.8	Kaksonen <i>et al.</i> , 2003b
FBR	Lodo granular metanogénico adaptado a sulfatorreducción	Etanol Acetato	6.5	4.0	6.9-7.3	Zn: 200 Fe: 100	99.9	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004a
FBR	Lodo granular metanogénico adaptado a sulfatorreducción	Lactato Etanol	6.5	2.6	7.7	Zn: 360 Fe: 86	99.9	Kaksonen, <i>et al.</i> , 2004b
FBR	Lodo granular metanogénico adaptado a sulfatorreducción	Lactato Etanol	6.5	2.5-3.0	7.5-8.5	Zn: 600 Fe: 300	99.8	Kaksonen <i>et al.</i> , 2006
FBR	Lodo sulfatorreductor	Etanol	24	4.3-4.4	7.8	Fe: 40-90	100	Sahinkaya <i>et al.</i> , 2007

UASB = reactor anaerobio de lecho de lodo granular de flujo ascendente; FBR = reactor de lecho fluidificado; UAB = reactor anaerobio de flujo ascendente (lecho empacado); NR = no reportado. TRH= tiempo de residencia hidráulica.

Los reactores más usados para la precipitación de metales en una sola etapa han sido el reactor UASB (Kaksonen *et al.*, 2003b) y el de lecho fluidificado (Kaksonen *et al.*, 2003a,b; Sahinkaya *et al.*, 2007). En la Tabla 1.4 se muestran los valores obtenidos de la precipitación de metales mediante el proceso de sulfatorreducción reportados por diversos autores.

### **1.2.1 Reactor UASB**

El reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés), se basa en la acumulación de microorganismos en el reactor, cuyas características de sedimentación impiden su arrastre fuera del mismo. La biomasa es retenida en forma de agregados, llamados lodos granulares, formados por auto-inmovilización natural de las bacterias. La formación y estabilidad de los gránulos es esencial para la operación exitosa de este tipo de reactores (Schmidt y Ahring, 1995).

Las características principales son la alta concentración de biomasa activa (30-40 g sólidos suspendidos volátiles/L), el lodo granula con una gran capacidad de sedimentación, TRH cortos y tiempo de retención de sólidos desacoplado del TRH (Oude Elferink *et al.*, 1994). Las propiedades esenciales de este tipo de reactor son (Lettinga *et al.*, 1983 ): 1) lecho de lodo granular; 2) un sistema de distribución uniforme del afluente, el cual es bombeado desde el fondo del reactor y pasa a través del lecho de lodo granular, en donde los compuestos orgánicos son biológicamente degradados por las reacciones de oxidoreducción produciendo biogás; 3) un dispositivo de separación gas-líquido-sólido, situado en la parte alta, mediante el cual se consigue la captación de biogás y la desgasificación y sedimentación de los gránulos de pequeño tamaño que lleguen a ascender adheridos a las burbujas de gas (Schmidt y Ahring, 1995).

Los reactores UASB han sido utilizados para el tratamiento de una gran variedad de efluentes con diferentes concentraciones de sulfato, desde 0.050-50 g/L, en los efluentes de generados del refinado de azúcar fermentaciones (ácido cítrico) entre otros (Colleran *et al.*, 1995).

El reactor UASB tiene un alto potencial para el proceso de sulfatorreducción debido a su alta remoción de sulfato y además en la remoción de metales (Visser *et al.*, 1995), diversos estudios han documentado la remoción de metales por sulfato reducción. Por

ejemplo, Kaksonen *et al.* (2003b) estudiaron la remoción de Fe y Zn a un TRH de 16 h, alcanzando una remoción de sulfato del 80% y la concentración residual de Fe y Zn en el efluente fue menor a 0.1 mg/L (Tabla 1.4).

### **1.2.2 Reactores de lecho fluidificado**

Actualmente el uso del reactor de lecho fluidificado (FBR) para tratar aguas residuales tiene varias ventajas sobre el tratamiento convencional utilizado en los 70's. Las principales ventajas son el bajo tiempo de residencia hidráulica y alta eficacia en la degradación de la materia orgánica (Souza *et al.*, 2004). En los reactores de lecho fluidificado la mayor parte de la biomasa se encuentra adherida a un material inerte formando biopelículas, siendo muy pequeña la fracción de biomasa suspendida libremente. Se utilizan partículas sólidas de mayor densidad que el agua como soporte (García-Calderon *et al.*, 1998), algunos de los materiales que se utilizan como soporte son partículas de mineral de silicato, esferas de vidrio poroso y partículas de piedra pómez entre otros (Kaksonen y Puhakka, 2007). Las partículas son fluidizadas mediante la recirculación de agua o gas. En este tipo de reactores es posible alcanzar una alta concentración de biomasa dependiendo de las condiciones operacionales usadas en el proceso y del tipo de microorganismo inmovilizado. Los reactores de biopelícula se basan en las características de sedimentación y fluidificación de las partículas utilizadas como soporte y la expansión y fluidificación del lecho como función de la velocidad superficial del líquido, ya que este establece el tiempo de retención de los sólidos y el área específica de la biopelícula en la zona específicamente activa (Nicoletta *et al.*, 2000). El reactor proporciona un buen mezclado de la fase líquida haciendo que estos sistemas sean más eficientes y estables para el tratamiento de aguas contaminadas con metales que otro tipo de reactores como el UASB o el de filtro anaerobio (Buffiere *et al.*, 1995). Una de las ventajas para en el tratamiento de aguas residuales con un alto contenido de acidez y metales, son las altas velocidades de recirculación aplicada al FBR ya que diluye la concentración de metales y la acidez del afluente (Kaksonen *et al.*, 2003a; Sahinkaya *et al.*, 2007).

Los reactores de lecho fluidificado con flujo ascendente son los mayormente usados. Diversos estudios presentados en la Tabla 1.4 han demostrado la factibilidad de utilizar reactores de lecho fluidificado para la precipitación de metales como sulfuros metálicos.

Por ejemplo, Kaksonen *et al.* (2003a) han demostrado la viabilidad del uso de un FBR para la precipitación Fe y Zn de un agua residual ácida con una eficiencia de remoción de un 99%. De la misma manera, Ma y Hua (1997) reportan una eficiente precipitación de Cd (100 mg/L) en un reactor FBR con una remoción de un 99% del Cd alimentado a un TRH de 1 h. Sin embargo, ninguno de estos trabajos reportan la recuperación de los sulfuros metálicos, pues estos precipitan junto con la biomasa.

Por lo anterior, una alternativa apropiada no solo para la precipitación de metales, si no también para su recuperación separados de la biomasa, es el reactor de lecho fluidificado inverso (LFI). En el reactor LFI la biomasa se adhiere a partículas de baja densidad que flotan en la parte superior del reactor, las cuales son fluidificadas mediante un flujo descendente del líquido favoreciendo la expansión y/o fluidificación del lecho en el reactor, mientras que partículas sólidas son recuperados fácilmente en el fondo del reactor (Celis *et al.*, 2004). El reactor LFI tiene una potencial aplicación para el tratamiento de efluentes que contienen metales que reaccionan inmediatamente con el sulfuro producido y forman precipitados metálicos insolubles que pueden ser fácilmente recuperados del fondo del reactor separados de la biomasa.

### **1.2.3 Formación de biopelículas anaerobias**

Una biopelícula se puede describir como una estructura compleja de células y sustancias poliméricas extracelulares, en donde su composición varía dependiendo de los microorganismos que la formen (Van Hullebusch *et al.*, 2003). Los exopolímeros forman una matriz adherente en donde los microorganismos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos (Costerton *et al.*, 1994), estos microorganismos pueden crecer en una superficie estática sólida (biopelículas estáticas) o sobre acarreadores suspendidos (biopelículas soportadas) (Nicoletta *et al.*, 2000). Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad (organizaciones únicas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos), diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierte en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen (Costerton *et al.*, 1994; Vroom *et al.*, 1999). Las biopelículas pueden secuestrar minerales, nutrientes y metales desde la fase líquida con la que están en contacto (Van

Hullebusch *et al.*, 2003). El desarrollo de una biopelícula está influenciado por procesos de adhesión de los microorganismos a una superficie, el crecimiento de la biopelícula y el desprendimiento de ella (Characklis, 1990). La interacción de las comunidades microbianas es particularmente importante en el desempeño de los reactores de biopelícula, y son grandemente influenciada por la habilidad de los microorganismos a adherirse a un soporte, a las condiciones aplicadas en el reactor como son el tipo de sustrato, TRH, temperatura, tipo de soporte o material acarreador y el inóculo (Byres, 2000).

Uno de los factores importantes en la formación de biopelículas son las fuerzas cortantes (hidrodinámica) que ayudan a definir el grosor de la biopelícula y regulan la estructura de la matriz de la biopelícula. Además, estas poseen un sistema de canales que les permiten el transporte de nutrientes y desechos (Liu y Tay *et al.*, 2002). Un reactor con una alta fuerza cortante da como resultado una biopelícula más resistente (madura), y a menor fuerza cortante se forma una biopelícula con una estructura que tiende a ser heterogénea, porosa y más débil. Otros factores importantes son el tamaño y el área superficial del soporte, ya que esto indica la superficie disponible para la adhesión y crecimiento de la biopelícula (Heijnen *et al.*, 1989).

Las biopelículas anaerobias son formadas por células planctónicas las cuales en presencia de un material acarreador pueden adherirse a la superficie e iniciar la formación de una biopelícula (Donlan y Costerton, 2002). Diversos estudios han reportado el uso de lodos sulfatorreductores o de cultivos puros de BSR para el desarrollo de biopelículas para la producción de sulfuro (Nielsen, 1987). La formación de una biopelícula sulfatorreductora ha sido reportada en diversos tipos de reactores, en donde la presión de selección ha favorecido a las BSR que oxidan incompletamente el sustrato hasta acetato (Nagpal *et al.*, 2000; Kaksonen *et al.*, 2003a,b; Celis *et al.*, 2009). Esto puede ser debido a que las BSR que consumen acetato tienen tiempos de duplicación mayores a los de las BSR que oxidan incompletamente los sustratos (Oude Elferink *et al.*, 1994).

La formación de una biopelícula sulfatorreductora de oxidación incompleta es uno de los problemas que presentan los reactores de biopelícula, ya que la acumulación de acetato provoca una disminución en el flujo de electrones para la sulfatorreducción y, consecuentemente, menor alcalinidad, lo cual puede ser insuficiente para la neutralización de la acidez y la precipitación de metales. Algunas desventajas adicionales se deben a la

acumulación de acetato lo cual explica una alta DQO residual en el efluente, y el acetato puede llegar a ser inhibitorio a altas concentraciones y bajos pH para la biopelícula (Reis *et al.*, 1990). La acumulación de acetato bajo condiciones sulfurogénicas ha sido reportado bajo condiciones mesofílicas (Nagpal *et al.*, 2000; Kaksonen *et al.*, 2003a,b; Sahinkaya *et al.*, 2007) y termofílicas (Rintala y Lepistö, 1998; Vallero *et al.*, 2000a; Weijma *et al.*, 2000; Sahinkaya *et al.*, 2007).

### 1.3 Estructura de la tesis

El objetivo de este trabajo fue estudiar la aplicación de procesos biológicos de sulfatorreducción en reactores de biopelícula para la precipitación y recuperación de sulfuros metálicos en una sola etapa. Para tal efecto la tesis está dividida en 5 capítulos. En el capítulo 1 se presentó el estado del arte en el tema. En el capítulo 2 se describe la metodología general aplicada en el desarrollo del trabajo experimental.

En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo de biomasa sulfatorreductora en un reactor UASB a partir de un lodo metanogénico, utilizando diferentes sustratos. En este mismo capítulo se discute la competencia entre BSR y microorganismos metanogénicos.

En el capítulo 4 se presenta el desempeño de un reactor LFI para la precipitación y recuperación de metales, como sulfuros metálicos, en una sola etapa, presentes en un afluente sintético a condiciones ácidas. En el capítulo 5 se explora la formación de una biopelícula sulfatorreductora capaz de oxidar completamente el sustrato orgánico hasta CO<sub>2</sub> y bicarbonato, aplicando diferentes estrategias de presión de selección y tiempos de arranque cortos. Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones y recomendaciones generales de la investigación realizada en esta tesis.

### 1.4 Referencias bibliográficas

- Bhagat M., Burgess J.E., Antunes A.P.M., Whiteley C.G., Duncan J.R. (2004). Precipitation of mixed metal residues from wastewater utilizing biogenic sulphide. *Min Eng.* **17**, 925-932.
- Byres J.D. (2000). Process engineering. In: Byres J.D (ed) *Biofilm II: process analysis and applications*. Wiley-Liss, New York. pp 13-44.
- Buffière P., Steyer J.P., Fonade C., Moletta R. (1995). Comprehensive modeling of methanogenic biofilms in fluidized bed systems: Mass transfer limitations and multisubstrate aspects. *Biotechnol Bioeng.* **48**, 725-736.



- Cabrera G., Pérez, R., Gómez J.M., Cantero A.A. (2005). Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* strains. *J. Hazardous Mat.* **135** (1-3), 40-46.
- Characklis U. G. (1990) Biofilm process. En Characklis W. G., Marshall K.C. (Eds), biofilms Wiley. New York p195-232.
- Celis-García M. L. B., Ramírez F., Revah S., Razo-Flores E., Monroy O. (2004). Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: Influence of microbial immobilization type. *Environ Technol.* **25**, 1265-1275.
- Celis-García L.B., Razo-Flores E., Monroy O. (2007). Performance of a down-flow fluidized bed reactor under sulfate reducing conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol Bioeng.* **97**, 771-779.
- Celis L.B., Villa G.D., Alpuche-Solís A., Ortega-Morales 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.
- Colleran E., Finnegan S., Lens P. (1995). Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek.* **67**, 29-46
- Costerton J.W., Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994). Biofilms the customized microniche. *J Bacteriol* **176**, 2173-2242.
- Devereux R., Stahl D.A. (1993). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria and perspective for analyzing their natural communities In: Odon J.M., Singleton R.J (eds) The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer, New York. Pp 131-160.
- Dries J.A., De Smul L., Goethals H., Grootaerd W., Verstraete. (1998). High rate biological treatment of sulfate-rich wastewater in an acetate-fed EGSB reactor, *Biodegradation.* **9**, 103-111.
- Donlan R.M., Costerton J.W. (2002). Biofilm: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* **15**, 167-193.
- Gantzer C.J. (1989). Inhibitory substrate utilization by steady-state Biofilm. *J Environ Eng.* **115**, 302-319.
- García-Calderón D., Buffière P., Moletta R., Elmaleh S. (1998). Influence of biomass accumulation on bed expansion characteristics of a down-flow anaerobic fluidized-bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **57**, 136-144.
- Gupta A., Flora J.R., Gupta M., Sayles G.D., Suidan M. T. (1994). Methanogenesis and sulfate reduction in chemostats-I. Kinetic studies and experiments. *Water Res.* **28**, 781-793.
- Hao O.J., Huang L., Chen J.M. (1994). Effects of metal additions on sulfate reduction activity in wastewaters. *Toxicol. Environ. Chem.* **46**, 197-212.
- Hao O.J. (2000). Metal effects on sulfur cycle bacteria and metal removal by sulfate reducing bacteria, in Environmental technologies to treat sulfur pollution: Principles and engineering (Eds: P.N.L.Lens, L. Hulshoff Pol) IWA Publishing, London (UK). 393-414.
- Heijnen J., Mulder A., Enger W., Hoeks F. (1989). Review on the application on anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *Chem Eng J.* **41**, B37-B50.
- Hulshoff Pol L.W., Lens P., Stams A.J.M., Lettinga G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation.* **9**, 213-224.
- Isa Z., Grusenmeyer S., Verstraete W. (1986). Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Microbiological aspects, *Appl Environ Microbiol.* **51**, 580-587.
- Johnson D.B. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution- Principles and Engineering.* Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed). International Water Association. Londres, pp.175-205.
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D, Puhakka J.A. (2003a). Performance and ethanol oxidation kinetics of sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation.* **14**, 207-217.
- Kaksonen A.H., Riekkola-Vanhanen M.L, Puhakka J.A. (2003b). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Res.* **37**, 255-266.
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D., Puhakka J.A. (2004a). Effects of hydraulic retention time and toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulphate-reducing metal- precipitating fluidized- bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **86**, 333-342.
- Kaksonen A.H., Plumb J.J., Franzmann P.D., Puhakka J.A. (2004b). Simple organic electron donor support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactor treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Microbiol Ecol.* **47**, 279-289.

- Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Riekkola-Vanhanen M., Franzmann P.D., Puhakka J.A. (2006). The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Hidrometalurily* **83**, 204-213.
- Kaksonen A.H., Puhakka J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Eng Life Sci.* **7**, 541-564.
- Kalyuzhnyi D. V., Fragoso L. C., Martinez R. J. (1997). Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with ethanol as the electron donor. *Microbiology*. **66**, 674-680.
- Karri S., Sierra-Alvarez R., Field J. A. (2006). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere* **62**, 121-127.
- Lens P.N.L., Omil F., Lema J.M., Hulshoff Pol L.W. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution- Principles and Engineering*. Lens P.N.L. y Hulshoff Pol L. (Ed). International Water Association. Londres, pp.153-174.
- Lettinga G., Roersman R., Grin R. (1983). Anaerobic treatment of raw domestic sewage at ambient temperatures using a granular bed UASB reactor. *Biotechnol Bioeng.* **25**, 1701-23.
- Lettinga G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*. **67**, 3-28.
- Liu Y., Tay J.H. (2002). The essential role of the hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* **36**, 1655-1665.
- Ma X., Hua Y. (1997). Cd<sup>2+</sup> removal from wastewater by sulfate reducing bacteria with an anaerobic fluidized bed reactor. *J Environ Sci.* **9**, 366-371.
- Maillacheruvu K.Y., Parkin G.F. (1996). Kinetics of grown, substrate utilization and sulfide toxicity of propionate, acetate and hydrogen utilizers in anaerobic systems. *Water Environ Res.* **68**, 1099-1106.
- Michaud S., Bernet N., Buffiere P., Delgenes J.P. (2005). Use of the methane yield to indicate the methane yield the metabolic behaviour of methanogenic biofilm. *Process Biochem.* **40**, 2751-2755.
- Nagpal S., Chichulcherm S., Livingston A., Peeva L. (2000). Ethanol utilization by sulphate reducing bacteria: An experimental and Modelling Study. *Biotechnol Bioeng.* **70**, 534-543.
- Nicolella C., van Loodrecht M.C.M., Heijnen J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J Biotechnol.* **80**, 1-33.
- Nielsen P.H. (1987). Biofilm dynamics and kinetic during high rate sulfate reduction anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol.* **53**, 27-32.
- O'Flaherty V., Mahony T., O'Kennedy R., Colleran E. (1998) Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. *Process Biochem.* **33**, 555-569.
- O'Flaherty V., Colohan S., Mulkerrins D., Colleran E. (1999). Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor: II Microbial interactions and toxic effects. *Bioresource Technol.* **68**, 109-120.
- Oleszkiewicz J.A., Marstaller T., McCartney D.M. (1989). Effect of pH on sulfide toxicity to anaerobic processes. *Environ Technol Lett.* **10**, 815-202.
- Oude Elferink S.J.W.H., Visser A., Hulshoff Pol L.W. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbio Rev.* **15**, 119-136.
- Pfening N., Widdel F. (1981). Biology of inorganic nitrogen and sulfur. In: Bothe, H. and A Trebst (eds). Berlin Heidelberg. New York
- Quan Z.X., La H.J., Cho Y.G., Hwang M.H., Kim I.S., Lee S.T. (2003). Treatment of metal-contaminated water and vertical distribution of metal precipitates in an upflow anaerobic bioreactor. *Environ Technol.* **24**, 369-376.
- Reis M.A.M., Lemos P.C., Almeida J.S., Carrondo M.J.T. (1990). Influence of produced acetic acid on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol Lett.* **12**, 145-148.
- Rintala J.A., Lepistö S.S. (1998). Thermophilic anaerobic treatment of sulfur rich forest industry wastewater. *Biodegradation.* **9**, 225-232.
- Rinzema A., Lettinga G. (1988). Anaerobic treatment of sulphate-containing wastewater. En: *Biotreatment Systems*. D.L. Wise Ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp.65-109.
- Sahinkaya E., Ozkaya B., Kaksonen HA., Puhakka J.A. (2007). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. *Biotechnol Bioeng.* **96**, 1064-1072.
- Schmidt J.E., Ahring K. (1995). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioeng.* **49**, 229-246.

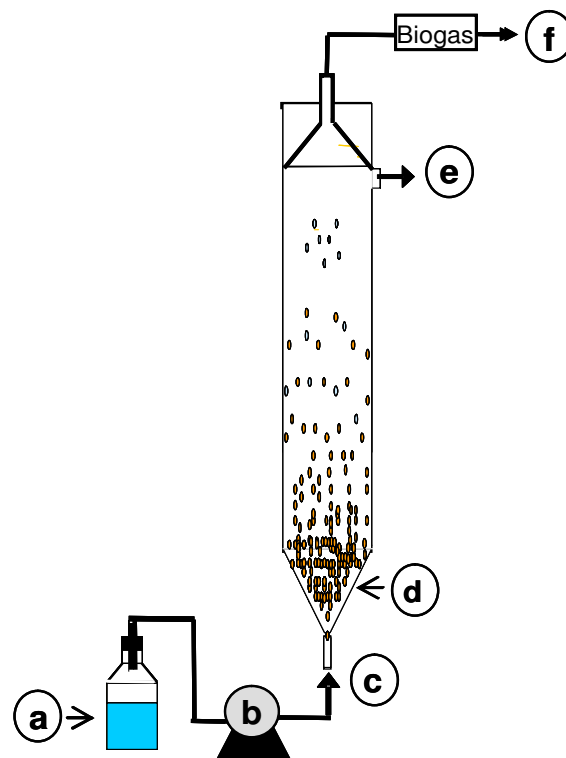
- Sierra-Alvarez R., Hollingsworth J., Zhou M.S. (2007). Removal of copper in an integrated sulfate reducing bioreactor-crystallization reactor system. *Environ Sci Technol.* **41**, 1426-1431.
- Somlev V., Banov M. (1998). Three stage process for complex biotechnological treatment of industrial wastewater from uranium mining. *Biothechnol Tech.* **12**, 637-639.
- Souza R.R., Bresolin I.T.L., Bioni T.L., Gimenes M.L., Dias-Filho B.P. (2004) . The performance of a three-phase fluidized bed reactor in treatment of wastewater with high organic load. *Brazilian J Chem Eng.* **21**, 219-227.
- Szczepanska J., Twardowska. (1999). Distribution and environmental impact of coal-mining wastes in Upper Silesia, Poland. *Environ Geol.* **38**, 249-258.
- Tabak H.H., Scharp R., Burckle J., Kawahara F.K., Govind R. (2003). Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. *Biodegradation.* **14**, 423-436.
- Teitzel G.M., Parsek M.R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 2313-2320.
- Tuppurainen K.O., Vaisanen A.O., Rintala J.A. (2002). Sulphate-reducing laboratory-scale high-rate anaerobic reactors for treatment of metal and sulphate-containing mine wastewater. *Environ Technol.* **23**, 599-608.
- Ueki K., Ueki A., Itoh K., Tanaka T., Satoh A. (1991). Removal of sulfate and heavy metals from acid mine water by anaerobic treatment with cattle waste: Effects of heavy metals on sulfate reduction. *J Environ Sci Health.* **26**, 1471-1489.
- Vallero M.V.G., Sipma J., Lettinga G., Lens P.N.L. (2004). High-rate sulfate reduction at high salinity (up to 90 mS/cm) in mesophilic UASB reactors. *Biotechnol Bioeng.* **86**, 226-236.
- Van Houten R.T., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1994). Biological sulphate reduction using gas lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source, *Biotechnol Bioeng.* **44**, 586-594.
- Van Hullebusch E.D., Zandvoort M.H., Lens P. (2003). Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Rev Environ Sci Bio Technol.* **2**, 9-33.
- Visser A., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci Technol.* **33**, 99-110.
- Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holanda.
- Vroom J.M., De Grauw K.J., Gerritse H.C.(1999). Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 3502-3511.
- Yamaguchi T., Harada H., Hisano T., Yamazaki S., Tseng I.C. (1999). Process behavior of UASB reactor treating a wastewater containing high strength sulfate. *Water Res.* **33**, 3182-3190.
- Weijma J.P.L.W.H., Stams A.J.M., Lettinga G. (2000). Performance of a thermophilic sulfate and sulfite reducing high rate anaerobic reactor fed with methanol. *Biodegradation.* **11**, 429-439.

## Capítulo 2. Materiales y métodos

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Reactor UASB

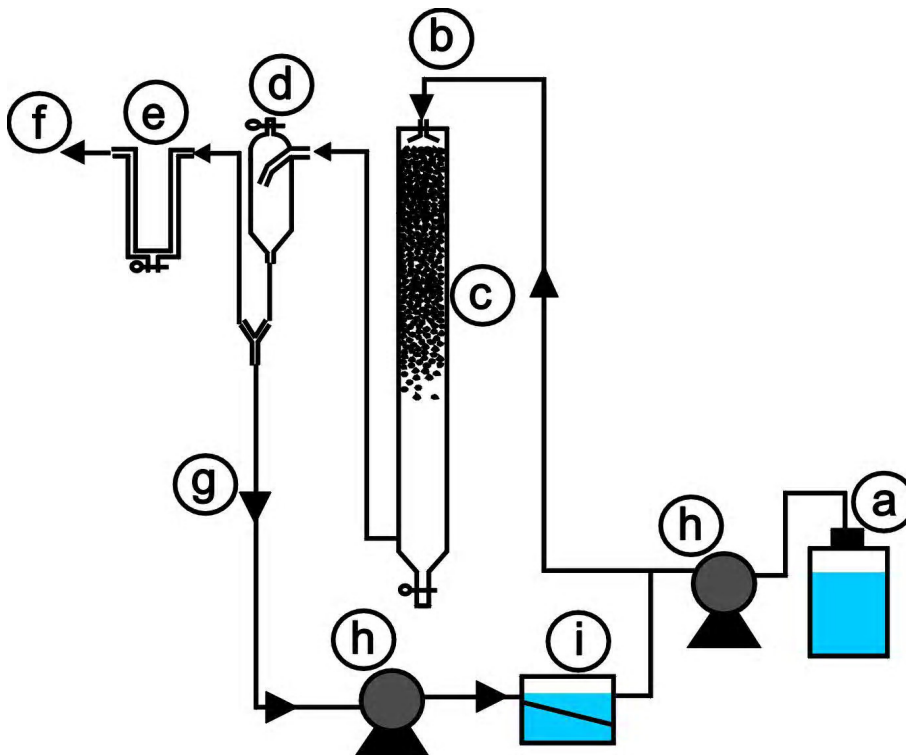
Se utilizó un reactor de vidrio de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente UASB (por sus siglas en Inglés), con fondo cónico, de 1.07 L de volumen, diámetro interno de 5.4 cm y una relación altura diámetro de 10.5. Para alimentar el reactor se utilizó una bomba peristáltica marca Masterflex. El biogás producido se midió mediante un medidor de biogás en mL/día. El reactor fue operado en continuo a temperatura ambiente. La Figura 2.1 muestra un esquema del reactor UASB.



**Figura 2.1** Diagrama del reactor de lecho de lodo de flujo ascendente (UASB). a) alimentación; b) bomba peristáltica; c) afluente; d) cama de lodo; e) efluente; f) salida de gas hacia el medidor de biogás.

### 2.1.2 Reactor LFI

El reactor LFI consistió de una columna de poliacrílico de fondo cónico con un volumen de 2.5 L (Figura 2.2), un equalizador de flujo y un separador sólido-líquido que también funciona para ajustar el nivel del líquido en la columna. El volumen total del reactor, incluyendo el ajustador de nivel, el equalizador y las líneas de recirculación fue de 3.34 L. El reactor se operó a temperatura ambiente (18-26°C).



**Figura 2.2** Diagrama del reactor de lecho fluidificado inverso (LFI). a) alimentación; b) afluente; c) lecho fluidificado; d) separador sólido-líquido y ajustador de nivel del agua; e) sello hidráulico; f) efluente; g) recirculación de líquido; h) bombas peristálticas; i) equalizador de flujo.

### 2.1.3 Medios de Cultivo

#### 2.1.3.1 Medio basal de alimentación del reactor UASB

El reactor UASB se alimentó con medio mineral basal con la siguiente composición (g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.3),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.015),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.12),  $\text{KCl}$  (0.25),

extracto de levadura (0.02) y 1 mL/L de solución de elementos traza. Al medio basal se le adicionaron diferentes concentraciones de sustrato y sulfato dependiendo de la etapa de operación del reactor descrita en el capítulo 3.

### **2.1.3.2 Medio basal de alimentación del reactor LFI**

El reactor LFI se alimentó con medio mineral basal con la siguiente composición (g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.3),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.015),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.12),  $\text{KCl}$  (0.25), extracto de levadura (0.02) y 1 mL/L de solución de elementos traza. Al medio basal se le adicionaron diferentes concentraciones de sustrato y sulfato dependiendo de la etapa de operación del reactor descrita en los capítulos 4 y 5.

### **2.1.3.3 Medio basal para determinar las actividades específicas**

El medio mineral basal para determinar la actividad metanogénica específica tenía la siguiente composición (g/L):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.70),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.6),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.11),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.28),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.006), extracto de levadura (0.02) y 1 mL/L de solución de elementos traza.

Para la actividad sulfatorreductora el medio mineral se preparo de igual forma que el que se utilizó para la AM con la excepción de la adición de elementos traza para evitar la precipitación de sulfuros metálicos con el sulfuro biogénico. El pH del medio se ajusto a 7.0 con bicarbonato de sodio.

### **2.1.3.4 Solución de elementos traza**

La solución de elementos traza tenía la siguiente composición (g/L):  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.5),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.1), EDTA (0.5),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.062),  $\text{ZnCl}_2$  (0.07),  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.036),  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.04),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.024),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.07),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.02),  $\text{HCl}$  36% (1ml),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0.1), y resazurina (0.5) como indicador de condiciones redox.

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Actividad metanogénica**

Se define como la velocidad de producción de metano por el lodo, expresado como DQO, bajo condiciones óptimas y con respecto al contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el lodo granular (g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-día) (Celis, 2004).

El experimento se realizó en botellas serológicas de 120 mL. Cada botella contenía 1.5 g SSV/L de lodo granular, 80 mL de medio mineral (Sección 2.1.3.3). Como sustratos orgánicos se usaron etanol y acetato (2 g DQO/L) de forma independiente, el pH se ajustó a 7 con NaHCO<sub>3</sub>. Las botellas se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio, la atmósfera de las botellas se cambió burbujeando N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 v/v) por 3 min; para equilibrar la fase gaseosa de las botellas a la presión atmosférica, el exceso de gas de la botella se purgó en un recipiente que contenía agua, mediante una aguja conectada a una manguera. Las botellas se incubaron a 30°C con agitación (100 rpm) durante 24 horas. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. El ensayo control fue idéntico a los anteriores pero sin la adición de sustrato, este ensayo se realizó para corregir la producción de metano endógena.

El volumen de metano producido se cuantificó cada 3 horas por un período de 72 horas, por medio del desplazamiento de una solución de NaOH al 3%. La actividad metanogénica se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar el volumen acumulado de metano producido a través del tiempo (en la fase exponencial) y dividida entre la concentración de SSV contenidos en la botella.

### **2.2.2 Actividad sulfatorreductora del lodo granular**

La actividad sulfatorreductora es definida como la capacidad de reducción de sulfato máxima por el lodo y se determina utilizando la velocidad de producción de sulfuro o la remoción de sulfato expresada como DQO, bajo condiciones óptimas y con respecto al contenido de sólidos suspendidos volátiles en el lodo (g DQO-H<sub>2</sub>S/gSSV-día) (Celis, 2004).

Las actividades sulfatorreductoras se llevaron acabo en botellas serológicas de 120 mL que contenían 1.5 g SSV/L de lodo granular y 115 mL de medio basal, sin solución de

elementos traza y sin dejar espacio de cabeza, se usaron diferentes sustratos orgánicos como etanol, acetato, propionato o lactato (2 g DQO/L) y sulfato de sodio como aceptor de electrones a una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67 (g/g); el pH se ajustó a 7.0 con NaHCO<sub>3</sub>. Las botellas se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio, y se incubaron a 30°C y 100 rpm. Los experimentos se realizaron por triplicado. El ensayo control consistió en una botella con la misma concentración de SSV, el mismo volumen de medio mineral basal pero sin sustrato. El control se utilizó para corregir la producción de sulfuro debida a la producción endógena. La concentración de sulfuro en el líquido se cuantificó cada 2 horas por un período de 72 horas, la actividad sulfatorreductora se calculó con la pendiente obtenida durante la fase exponencial al graficar la concentración de sulfuro disuelto total producido contra el tiempo y la concentración de SSV en la botella.

### **2.2.3 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula**

La actividad sulfatorreductora se determinó mediante la velocidad de producción de sulfuro y la biomasa adherida al soporte, medida a diferentes tiempos durante la operación del reactor. Los ensayos se realizaron por triplicado en botellas serológicas de 70 mL con 65 mL de medio basal sin solución de elementos traza, y sin dejar espacio de cabeza, como inóculo se usaron 5 mL de soporte (biopelícula) retirados recientemente del reactor, etanol como sustrato (1 g DQO/L) y sulfato de sodio para obtener una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67: el pH de la solución fue ajustado a 6.5 con NaHCO<sub>3</sub>. Todas las botellas se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio y se incubaron a 30°C por un periodo de 3-4 días con agitación a 100 rpm. La actividad fue calculada mediante la pendiente de la curva de producción de sulfuro (concentración de sulfuro vs. tiempo) y el contenido de sólidos volátiles (SV) adheridos al soporte en cada botella. Los sólidos volátiles adheridos al soporte (biomasa) se reportan como sólidos volátiles inmovilizados (SVI) por volumen de soporte (g SVI/L<sub>s</sub>); la biopelícula fue desprendida del soporte por lavados sucesivos con agua desionizada en un baño ultrasónico y se cuantificó como sólidos suspendidos volátiles (SSV) en las botellas serológicas al final de la prueba de actividad.



### 2.2.5 Análisis

La DQO se determinó por el método de reflujo cerrado descrito en los métodos estándar (APHA, 1998), se usaron 2 mL de muestra previamente centrifugada. Este método consiste en oxidar la muestra en un medio ácido que contiene sulfato de plata como catalizador y dicromato como agente oxidante, la muestra se digiere a 160°C por 2 horas en tubos de vidrio cerrados. La concentración de DQO se determinó en un espectrofotómetro UV visible marca Thermo spectronic modelo Aqua Mate a una longitud de 600 nm, a partir de la curva estándar correspondiente. El sulfuro presente en la muestra se removió antes de la determinación de DQO burbujeando aire en el recipiente que contenía la muestra (6 mL) por 5 minutos.

El sulfuro disuelto se determinó por el método yodométrico basado en la capacidad que tiene el yodo como oxidante débil cuando reacciona con el sulfuro que es un agente reductor fuerte cuando se encuentra en medios ácidos. La cuantificación se efectúa por la titulación del yodo remanente empleando una solución estándar 0.025 N de tiosulfato de sodio. Este método es confiable para concentraciones mayores de 1 mg/L (APHA, 1998).

Para medir la concentración de sulfuro en los ensayos de actividad sulfatorreductora se utilizó el método de Cord-Ruwisch (1985). En un tubo HACH se adicionaron 4 mL de una solución que contenía 1 mL de sulfato de cobre 0.05 M aforado a 100 mL con una solución de HCl 0.05 molar, luego se agregó 0.1 mL de muestra y se agitó vigorosamente en un vortex, en seguida se analizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm (UV visible marca Thermo spectronic modelo Aqua Mate). La concentración de sulfuro se obtuvo a partir de la curva estándar correspondiente.

El pH y la alcalinidad se determinaron en una muestra de 20 mL de efluente contenida en un vaso de precipitado y se midió el pH inicial con un potenciómetro marca Thermo Orión modelo 720 A y con un electrodo marca Orión modelo 8256. Para determinar la alcalinidad se titularon 20 mL de muestra con HCl 0.1 M hasta un pH de 5.8 para la cuantificación de la alcalinidad por bicarbonato ( $\text{CaCO}_3$ ). Posteriormente se siguió titulado hasta alcanzar un pH de 4.3 para la alcalinidad por AGV.

La determinación de sulfato se realizó en un sistema de electroforesis capilar marca Agilent con detector de arreglo de diodos (190-600 nm). La muestra se centrifugó a 900 rpm y se diluyó con agua desionizada, posteriormente se filtró con una membrana de 0.2

µm. Se utilizó un capilar de 50 µm de diámetro interno y 72 cm de longitud. La muestra se inyectó con una presión de 50 mbar por 4 segundos, se aplicó un voltaje de -30 kV, la temperatura del capilar fue de 20°C y se usó un buffer para aniones inorgánicos (Agilent 8500-6797). La señal se detectó a 300 nm con detección indirecta de UV con una referencia de 245 nm. El tiempo de análisis fue de 7 min. La curva estándar para sulfatos se determinó a partir de una mezcla de aniones (Agilent Technologies 5062-8524), a partir de la curva estándar se determinó la concentración de sulfato, acetato y lactato de las muestras experimentales del afluente y efluente.

Alternativamente se usó el método turbidimétrico para la determinación de sulfato. Este método está basado en la precipitación del ion sulfato con cloruro de bario en un medio ácido y en condiciones en las que se formen cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme, para después medir la turbiedad producida a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm (UV visible marca Termo spectronic modelo Aqua Mate) con la correspondiente curva estándar (APHA, 1998).

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

La evolución de la formación de biopelícula en forma de SVI se midió por gravimetría (APHA, 1998) después de haber desprendido la biopelícula del soporte utilizando un baño sónico y se reportó como g SVI/L<sub>s</sub>. Esta determinación se hizo a la biopelícula contenida en las botellas serológicas después de ser usadas en la determinación de la actividad sulfatorreductora. Para este análisis se desprendió la biopelícula adherida al soporte, colocando la botella serológica que contenía 5 mL de soporte y 25 mL de agua destilada dentro de un baño sónico por 5 min, posteriormente se extrajo el volumen de la botella y éste se filtró a vacío con un filtro de fibra de vidrio de 0.1 µm de tamaño de poro. La operación se repitió 5 ó 6 veces hasta desprender completamente la biopelícula del soporte.

Los SSV en los filtros se determinaron de acuerdo a lo descrito en los métodos estándar (APHA, 1998).

La determinación del hierro, zinc y cadmio en solución se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer modelo Aanalyst 400. se utilizó un estándar de cada metal de 1000 ppm Marca Fisher Chemical.

Para la determinación de los sulfuros metálicos y observación de la biopelícula, se utilizó un Microscopio electrónico de barrido marca Philips modelo XL-30, equipado con un espectrómetro de rayos-X por dispersión de energía marca EDAX. La muestra se colocó en un porta muestras de aluminio y se recubrió con oro. Las micrografías se llevaron a cabo mediante la ayuda de un detector de electrones retrodispersos a 10 kV.

La identificación de fases cristalinas que constituyen a los sulfuros metálicos, se realizó sobre muestras previamente secas a 40°C, molidas y homogeneizadas a un tamaño de partícula <100 micras. El análisis por difracción de rayos X (DRX) se realizó mediante un Difractómetro de rayos X marca Rigaku modelo DMAX-2200, que dispone de una identificación de fases cristalinas que se encuentran en una concentración superior a 5% en la muestra, por comparación con un banco de datos automatizado. Los diagramas fueron construidos en un rango de  $2\theta$  de 5-80°.

## 2.3 Cálculos

### 2.3.1 Eficiencia de remoción de DQO

La eficiencia de remoción de DQO se calculó a partir de la diferencia entre la concentración de DQO en el afluente y la concentración de DQO en el efluente expresada en porcentaje.

$$\text{Remoción de DQO} = \frac{[DQO]_{\text{Afluente}} - [DQO]_{\text{Efluente}}}{[DQO]_{\text{Afluente}}} \times 100$$

### 2.3.2 Eficiencia de conversión de sulfato

La eficiencia de conversión de sulfato (ECS) se calculó a partir de la diferencia entre la concentración del sulfato en el afluente y la concentración del sulfato en el efluente del reactor expresada en porcentaje.

$$ECS = \frac{[SO_4^{2-}]_{Afluente} - [SO_4^{2-}]_{Efluente}}{[SO_4^{2-}]_{Afluente}} \times 100$$

### 2.3.3 Cantidad de DQO utilizada para la sulfatorreducción

La cantidad de DQO utilizada por sulfatorreducción fue calculada a partir de la concentración de sulfato reducido.

$$DQO_{SO_4^{2-}} = \frac{0.66(SO_4^{2-}{}_{Afluente} - SO_4^{2-}{}_{Efluente})}{DQO_{Afluente}}$$

### 2.3.4 Cantidad de DQO utilizada por metanogénesis

La cantidad de DQO vía formación de metano fue calculada como sigue.

$$DQO_{CH_4} = (DQO_{Consumida} - DQO_{SO_4^{2-}})$$

### 2.3.5 Cálculo de las actividades metanogénica y sulfatorreductora

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

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

La actividad sulfatorreductora se calculó con la pendiente obtenida al graficar la concentración de sulfuro producido expresada en DQO vs. tiempo.

$$\text{Actividad sulfatorreductora} = \frac{mH_2S}{V_B \times SSV}$$

Donde:

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

$fc$  = conversión de  $CH_4$  a DQO = 0.35 L  $CH_4$ /g DQO a STP

$mH_2S$  = velocidad de producción de sulfuro, expresado en DQO (g DQO- $H_2S$ /d)

$V_B$  = volumen del líquido en la botella (L)

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

### 2.3.6 Balance de masa de los sulfuros metálicos precipitados

El balance de masa de los sulfuros metálicos precipitados se calculó a partir de la concentración de metales solubles en el afluente, la concentración de metales solubles contenidos en el efluente y el volumen del reactor.

Entra – Sale = Consumo

$$\text{Masa de los metales solubles por reaccionar} = (Me_{Af}^+ - Me_{Ef}^+) \times V_r$$

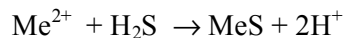
Donde:

$Me_{Af}^+$  = Concentración de metales solubles en el afluente (mg/L)

$Me_{Ef}^+$  = Concentración de metales solubles en el efluente (mg/L)

$V_r$  = Volumen del reactor (L)

La masa teórica de los sulfuros metálicos esperados se calculó primero con la masa de cada uno de los metales solubles por reaccionar, y con la estequiometría para cada metal se calcularon los sulfuros metálicos esperados.



Donde  $\text{Me}^+ = \text{Fe}, \text{Zn}$  y  $\text{Cd}$

$$\text{Masa teórica de los sulfuros metálicos esperados} = \Sigma \frac{(\text{Me}^+_{\text{solb}}) \times (\text{PM}_{\text{MeS}})}{(\text{PM}_{\text{Me}^+})}$$

Donde:

$\text{Me}^+_{\text{solb}}$  = Masa de los metales solubles por reaccionar (mg)

$\text{PM}_{\text{MeS}}$  = Peso molecular del sulfuro metálico correspondiente (mg/mmol)

$\text{PM}_{\text{Me}^+}$  = Peso atómico del metal correspondiente (mg/mmol)

El porcentaje de recuperación de los sulfuros metálicos se calculó a partir de la masa experimental de los sulfuros metálicos recuperados del reactor y la masa teórica de los sulfuros metálicos esperados.

$$\text{Porcentaje de los sulfuros metálicos recuperados} = \left( \frac{\text{MeS}_{\text{Rec}}}{\text{MeS}_{\text{Esp}}} \right) \times 100$$

Donde:

$\text{MeS}_{\text{Rec}}$  = Masa experimental de los sulfuros metálicos recuperados (mg)

$\text{MeS}_{\text{Esp}}$  = Masa teórica de los sulfuros metálicos esperados (mg)

## 2.4 Referencias bibliográficas

- American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard methods for examination of water and wastewater*. (20th edition). Washington D.C.
- Celis García M.L.B. (2004).: “*Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes*”, Tesis doctoral, División de Ciencias Biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Cord-Ruwisch R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulphides in cultures of sulphate-reducing bacteria. *J Microbial Methods*. **4**, 3-36.

## **Capítulo 3. Competencia por sustrato durante el desarrollo de biomasa sulfato reductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB**

### **3.1 Resumen**

En este trabajo se estudió la competencia entre los microorganismos metanogénicos y sulfatorreductores utilizando un reactor anaerobio de lecho de lodo granular con flujo ascendente (UASB) a escala laboratorio, el cual fue usado para el enriquecimiento de biomasa sulfatorreductora a partir de un lodo granular de origen metanogénico. El reactor se alimentó con una mezcla de etanol y acetato, la carga orgánica se incrementó de 0.5 a 2 g demanda química de oxígeno (DQO)/L-d a un pH de 7.0. El consumo de DQO fue mayor a 90% y la alcalinidad producida por la oxidación del sustrato incrementó el pH en el efluente hasta 8.0. A partir de los 50 días de operación, el reactor se alimentó con lactato y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) para promover la sulfatorreducción. La carga orgánica se aumentó de 1 a 3 g DQO/L-d con una relación DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.67 a un tiempo de retención hidráulico de un día. A los 194 días de operación del reactor el máximo consumo de DQO y sulfato obtenido fue de 94 y 22%, respectivamente. La concentración total del sulfuro alcanzada fue de 310 mg  $\text{S}^{2-}$ /L y la actividad sulfatorreductora de la biomasa fue de 0.29 g DQO- $\text{H}_2\text{S}$ /g SSV-d, lo que mostró el desarrollo de biomasa sulfatorreductora; la actividad metanogénica que se obtuvo fue de 0.35 g DQO- $\text{CH}_4$ /g SSV-d. Estos resultados mostraron que los organismos metanogénicos no fueron desplazados por las bacterias sulfatorreductoras, coexistiendo ambos tipos de bacterias en el lodo granular anaerobio al final de la operación del reactor.

*Palabras clave:* Metanogénesis; Sulfatorreducción; lodo granular; reactor UASB

Marisol Gallegos-García, Lourdes B. Celis, Elías Razo-Flores. (2008). "Competencia por sustrato durante el desarrollo de biomasa sulfato reductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. (Sometido)

### 3.2 Introducción

Actualmente existe una gran variedad de industrias que generan compuestos que son resistentes a la biodegradación y por lo tanto persisten en el medio ambiente. En especial, la industria petroquímica, productoras de papel, aceites comestibles, fibras sintéticas, etc., generan aguas residuales que contienen altas concentraciones de sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y materia orgánica (Omil *et al.*, 1997). Este tipo de efluentes pueden ser tóxicos para muchos microorganismos y son una fuente potencial de contaminación para los cuerpos de aguas superficiales y subterráneas. Debido a esta problemática, se han desarrollado procesos biológicos de sulfatorreducción para el tratamiento de estos efluentes, generalmente se efectúan en reactores anaerobios de lecho de lodo granular de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en Inglés) (Lens *et al.*, 2002). Los procesos anaerobios pueden ser extremadamente eficientes debido a su bajo consumo de energía y menor producción de lodo en comparación con los procesos aerobios (Yoda *et al.*, 1987). De forma general, la aplicación de un proceso de digestión anaerobia a efluentes ricos en sulfato produce la coexistencia de bacterias sulfatorreductoras (BSR) con microorganismos metanogénicos, que establecen una competencia entre ambos grupos microbianos por el sustrato orgánico disponible, especialmente por los compuestos más comunes como son el acetato, hidrógeno y ácidos grasos de cadena corta (Widdel, 1998). El resultado de esta competencia determinará los productos finales de ambos procesos de mineralización que pueden ser sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) o ambos. En los casos extremos en que predomine una de las dos poblaciones se tendrá o un sistema totalmente metanogénico o bien un sistema totalmente sulfatorreductor (Omil *et al.*, 1997). Las reacciones involucradas en la degradación de la materia orgánica por los metanógenos y BSR se muestran en la Tabla 3.1. (Oude Elferink *et al.*, 1994).

Actualmente el proceso de sulfatorreducción está adquiriendo un gran interés debido a su posible aplicación para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados en reactores sulfatorreductores mediante la eliminación conjunta del sulfato y metales para producir sulfuros metálicos como precipitados insolubles, en el cual la metanogénesis estaría parcial o totalmente inhibida (Omil *et al.*, 1997).

Para favorecer el predominio de las BSR en un lodo anaerobio es importante considerar la relación estequiométrica  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ . La relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  es un parámetro de control



importante en el tratamiento anaerobio en este tipo de aguas residuales. A una relación estequiométrica de 0.67 (g/g), teóricamente existe el suficiente sulfato en el medio para que toda la materia orgánica presente sea utilizada por las BSR y, en principio, se podría operar en condiciones completamente sulfatorreductoras (Dar *et al.*, 2008). La competencia por el sustrato está determinada por las bases termodinámicas y cinéticas de la sulfatorreducción, metanogénesis y acetogénesis. Estas bases predicen que las BSR pueden predominar sobre los organismos metanogénicos y los acetogénicos (Rinzema y Lettinga, 1988).

**Tabla 3.1.** Reacciones metabólicas involucradas en la degradación de la materia orgánica en sistemas metanogénicos y sulfatorreductores (Oude Elferink *et al.*, 1994).

Reacción	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)
<b>Acetogénesis</b>	
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-4.2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9.6
<b>Metanogénesis</b>	
$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	- 33.9
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31.0
<b>Sulfatorreducción</b>	
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \frac{1}{2}\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}^+$	- 80.0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \frac{1}{2}\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	- 66.4
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	- 47.6
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \frac{3}{4} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \frac{3}{4} \text{HS}^- + \frac{1}{4}\text{H}^+$	- 37.7
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \frac{1}{2}\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}^+$	- 27.8

Acetato =  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ; Propionato =  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ ; Butirato =  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ; Lactato =  $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ ; Etanol =  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ .

Sin embargo, se ha encontrado que la competencia entre las BSR y los organismos metanogénicos también es influenciada por otros factores tales como la duración de la competencia, el tipo de lodo, las propiedades de inmovilización de las bacterias, la concentración de materia orgánica, la concentración del sulfato, el pH del reactor, y la temperatura (Oude Elferink *et al.*, 1994; Lens *et al.*, 2000).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar biomasa sulfatorreductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB y estudiar la competencia entre los organismos metanogénicos y las BSR durante la operación del reactor. Adicionalmente se comparó la evolución de las actividades específicas metanogénica (AM) y sulfatorreductora (ASR) con diferentes tipos de sustratos.

### **3.3 Materiales y métodos**

#### **3.3.1 Condiciones de operación del reactor UASB**

EL experimento en continuo se llevo a cabo en un reactor UASB descrito en el capítulo 2. El reactor UASB se inoculó con lodo granular metanogénico proveniente de un reactor UASB a escala industrial de la planta de tratamiento de efluentes de la Cervecería Modelo (Cd. Obregón, Sonora). El lodo estuvo almacenado a 4°C antes de inocularse en el reactor. El lodo granular contenía 0.07 g sólidos suspendidos volátiles (SSV) por gramo de lodo en base húmeda. Se inocularon aproximadamente 530 mL de lodo en el reactor para tener una concentración de 20 g SSV/L. El lodo granular se caracterizó mediante ensayos de AM y ASR.

Inicialmente el reactor UASB se operó en lote durante 7 días con el fin de aclimatar la biomasa que había estado en refrigeración y, posteriormente, se operó en continuo bajo ocho diferentes periodos de operación (A-H). Inicialmente el reactor se operó bajo condiciones de metanogénesis (días 1-49) y posteriormente bajo condiciones de sulfatorreducción (días 50-250) tal como se muestra en la Tabla 3.2. El desempeño del reactor se evaluó mediante la eficiencia de remoción de DQO, sulfatos y la producción de sulfuro. El porcentaje de DQO removida por las BSR (% DQO<sub>BSR</sub>) y el porcentaje de DQO utilizada por los organismos metanogénicos (% DQO<sub>BM</sub>), se calcularon a partir de las

**Tabla 3.2.** Características del afluente y condiciones de operación aplicadas al reactor UASB en las etapas metanogénica y sulfatorreductora.

Condiciones de operación	Metanogénesis			Sulfatorreducción				
	A	B	C	D	E	F	G	H
Días de operación	1 - 12	13 - 33	34 - 49	50 - 78	79 - 91	92 - 115	116 - 166	167 - 250
DQO (g/L)	0.5 - 1	1.5	2	1	1.5	2	2.5	3
Proporción en base a DQO (Ac:Et:Lac) <sup>a</sup>	1:1:0	1:1:0	1:1:0	0:0:1	0:0:1	0:1:1	0:1.25:1.25	0:1:0
TRH (días)	1	1	1	1	1	1	1	1
Carga orgánica (g DQO/L-d)	0.5 - 1	1.5	2	1	1.5	2	2.5	3
Carga de sulfato (g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L-d)	-	-	-	1.49	2.27	3	3.7	4.5
pH Afluente	7	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

<sup>a</sup> Ac = acetato; Et = etanol; Lac = Lactato

ecuaciones mostradas en el capítulo 2 (Sección 2.3.3 y 2.3.4). El reactor se operó en continuo durante 250 días a temperatura ambiente variando entre 25 – 30°C.

### **3.3.2 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados tanto para el reactor en continuo como para los ensayos en lote, para determinar la actividad específica anaerobia se describen en la sección 2.1.3 del capítulo 2.

### **3.3.3 Ensayos de actividad específica anaerobia**

La AM se determinó utilizando como sustrato etanol o acetato (2 g DQO/L), el pH se ajustó a 7 con  $\text{NaHCO}_3$  (Capítulo 2). La ASR se determinó usando diferentes sustratos orgánicos como etanol, acetato, propionato o lactato (2 g DQO/L) y sulfato de sodio como aceptor de electrones a una relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 0.67; el pH se ajustó a 7.0 con  $\text{NaHCO}_3$ . Las actividades se calcularon a partir del consumo de sustrato o la producción de metano y sulfuro (Sección 2.3.5).

### **3.3.4 Análisis**

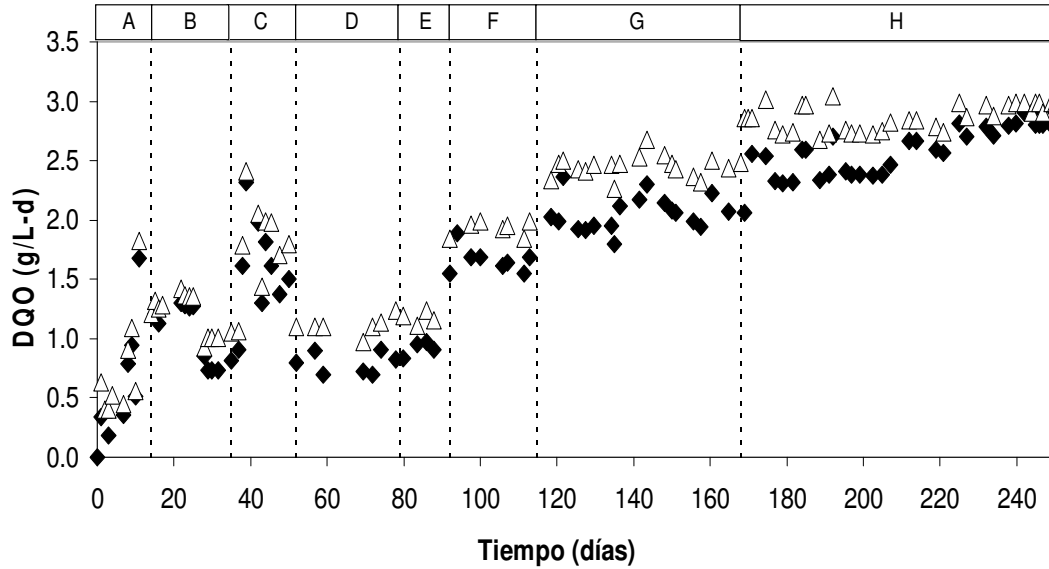
Los análisis para la determinación de DQO, alcalinidad, pH, sulfuro, sulfato y SSV se describen en el capítulo 2 (Sección 2.2.5).

## **3.4 Resultados y Discusión**

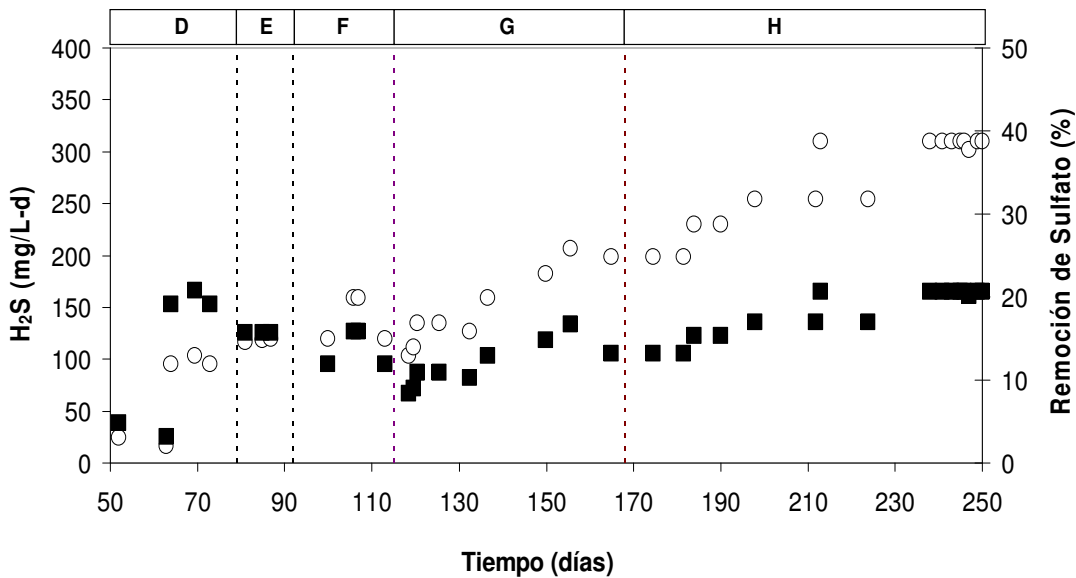
### **3.4.1 Desempeño del reactor UASB**

El desempeño del reactor UASB con respecto al tiempo de operación se presenta en la Figura 3.1 y las eficiencias de remoción se resumen en el Tabla 3.3. Durante los primeros 7 días de operación del reactor (periodo A) se aplicó una carga orgánica de 0.5 g DQO/L-d con etanol como sustrato, para activar el lodo que había estado en refrigeración. Durante los periodos A - C se observó que la eficiencia de remoción de DQO alcanzó valores superiores a 90%, lo cual indicó que casi toda la materia orgánica alimentada fue removida. El aumento del pH y la alcalinidad dentro del reactor se debió a la oxidación del acetato

con lo que se produjo metano y bicarbonato (Tabla 3.1), lo que ayudó a incrementar la capacidad buffer del sistema.



**Figura 3.1** Desempeño del reactor UASB con respecto al tiempo de operación. Velocidad de la carga orgánica alimentada ( $\Delta$ ), velocidad de consumo de la carga orgánica ( $\blacklozenge$ ).



**Figura 3.2.** Desempeño del reactor UASB con respecto al tiempo de operación, velocidad de producción de sulfuro ( $\circ$ ), eficiencia de remoción de sulfato ( $\blacksquare$ ).

**Tabla 3.3** Desempeño del reactor UASB operado en continuo bajo condiciones metanogénicas y de sulfatorreducción.

Parámetros	Periodos experimentales							
	Metanogénesis			Sulfatorreducción				
	A n = 10	B n = 13	C n = 13	D n = 9 <sup>a</sup> 6 5 <sup>b</sup>	E n = 5 <sup>a</sup> 6 3 <sup>b</sup>	F n = 8 <sup>a</sup> 6 4 <sup>b</sup>	G n = 18 <sup>a</sup> 6 9 <sup>b</sup>	H n = 38 <sup>a</sup> 6 16 <sup>b</sup>
Días de operación	1 - 12	13 - 33	34 - 49	50 - 78	79 - 91	92 - 115	116 - 166	167 - 250
Eficiencia de remoción de DQO (%)	74 ± 17	88 ± 8.3	93 ± 5.4	78 ± 7.65	76 ± 3.4	85 ± 0.7	88 ± 3.1	94 ± 3.9
Eficiencia de remoción de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)	-	-	-	19 ± 8.6	16 ± 0.4	16 ± 2.3	17 ± 2.7	22 ± 2.8
Sulfuro producido (mg/L)	-	-	-	95 ± 5.8	118 ± 1.7	151 ± 3.2.7	159 ± 37.6	310 ± 42.7
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	423 ± 155	2643 ± 1200	2854 ± 1227	4003 ± 1264	3200 ± 632	3238 ± 215	3416 ± 280	3527 ± 178
pH <sub>Efluyente</sub>	7.6 ± 0.3	8.0 ± 0.7	8.1 ± 0.2	7.0 ± 0.1	7.0 ± 1.3	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.2	8.0 ± 0.2

(Promedio ± desviación estándar)

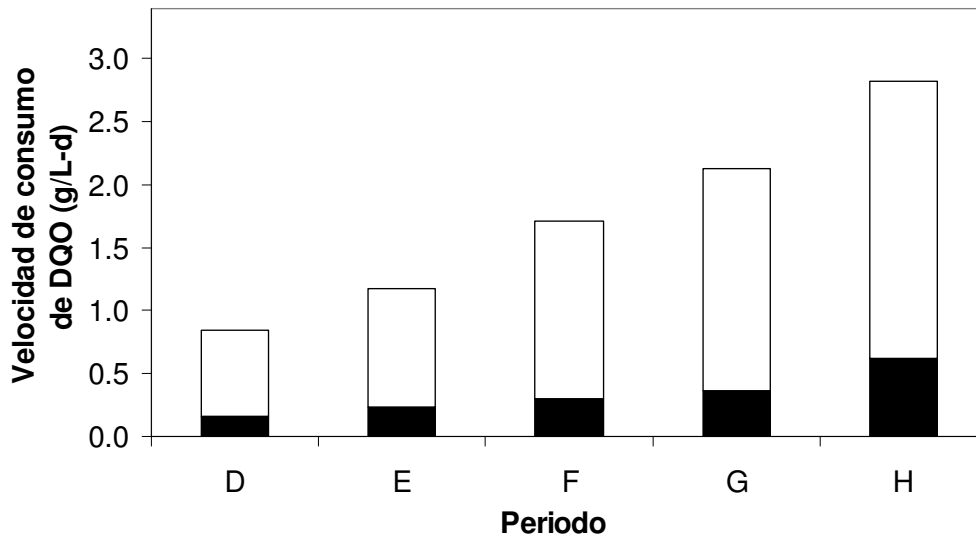
<sup>a</sup> Eficiencia de remoción de DQO, Alcalinidad y pH<sub>Efluyente</sub>; <sup>b</sup> Eficiencia de remoción de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y concentración de sulfuro.

Una vez que el reactor operó bajo condiciones metanogénicas por 50 días en continuo, se procedió a enriquecer las BSR presentes en el lodo granular mediante la operación del reactor UASB bajo condiciones de sulfatorreducción, las condiciones de operación se resumen en la Tabla 3.2. Durante los periodos D y E se observó que las condiciones impuestas al sistema tales como el cambio de sustrato, la adición de sulfato y la producción de sulfuro, afectaron la actividad del lodo ya que la remoción de DQO disminuyó a 78%. La eficiencia de conversión de sulfato (ECS) alcanzó un valor de 19 % y la concentración de sulfuro disuelto solo fue de 95 mg/L, debido a que las BSR se encontraban en proceso de enriquecimiento (Fig. 3.2).

A partir de los 92 días, el sistema se recuperó paulatinamente hasta alcanzar una eficiencia de remoción de DQO superior a 90%, a los 210 días de operación. El pH y la alcalinidad en el efluente aumentaron hasta 8.0 y 4000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, respectivamente. La producción de sulfuro en el sistema incrementó alcanzando concentraciones de 310 mg/L y una ECS de 21% al final de la operación del reactor, lo que indicó un enriquecimiento de BSR en el lodo granular y, consecuentemente, un aumento en la actividad sulfatorreductora debido a las condiciones impuestas al sistema (relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, tiempo de operación del reactor y el sustrato utilizado en la alimentación) (Visser *et al.*, 1992; Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

### **3.4.2 Competencia entre los organismos metanogénicos y BSR**

En la Figura 3.3 se muestra la velocidad de consumo de DQO por los organismos metanogénicos y BSR durante los diferentes periodos de operación del reactor. La velocidad de consumo de la DQO por las BSR durante los periodos D y E fue de 0.16 y 0.24 g DQO/L-d, respectivamente; mientras que el consumo de DQO por los organismos metanogénicos para los mismos periodos fue de 0.69 y 0.94 g DQO/L-d, respectivamente. La participación de las BSR fue incrementando lentamente a partir de los 92 días, este aumento se observó a partir de la adición de etanol como sustrato. Después de los 167 días de operación del reactor, la velocidad de consumo de DQO por las BSR incrementó de 0.36 a 0.62 g DQO/L-d hasta el final de la operación, y el consumo de la DQO por los organismos metanogénicos pasó de 1.77 a 2.2 g DQO/L-d.



**Figura 3.3** Velocidad de consumo de la carga orgánica utilizada por los organismos metanogénicos ( ) y bacterias sulfatorreductoras (■).

El incremento en la velocidad de consumo de la DQO por las BSR indicó que parte del flujo de electrones se empezaba a desviar hacia las BSR, lo que sugiere un aumento en número de los microorganismos (20% de DQO consumida por las BSR). Este aumento pudo deberse al sustrato utilizado en la alimentación, ya que el lactato y el etanol son sustratos preferentemente usados por las BSR (Kaksonen *et al.*, 2003). El consumo de la DQO por los metanógenos fue hasta de 70% al final de la operación del reactor bajo condiciones sulfatorreductoras, esto quiere decir que en el reactor sustratos como acetato, hidrógeno y CO<sub>2</sub> estuvieron presentes. Lo que indicó la existencia de especies metabólicas que oxidan incompletamente el sustrato hasta acetato. Esto pudo deberse a que en el lodo granular pueden estar presentes BSR que oxidan completamente el sustrato hasta CO<sub>2</sub>, y de igual manera BSR que oxidan incompletamente el sustrato hasta acetato (Madigan *et al.*, 2006). También puede ser atribuido a la presencia de organismos acetogénicos que llevan a cabo la fermentación del etanol y lactato hasta acetato (Tabla 3.1) (Oude Elferink *et al.*, 1994). El acetato producido es consumido por los organismos metanogénicos evitando que sean desplazados por las BSR.

Estos resultados indicaron que fue posible el desarrollo de las BSR en el reactor ya que la degradación de la DQO, ya sea por los microorganismos metanogénicos o



sulfatorreductores, determinará el tipo de metabolismo predominante. De igual manera la concentración del sulfato juega un papel importante en la competencia por el sustrato ya que la ASR podría llegar a estar limitada por el aceptor de electrones, en caso de que existiera una baja concentración sulfato (Visser *et al.*, 1996).

### **3.4.3 Actividad específica con diferentes sustratos**

En el Tabla 3.4 se muestran los resultados de la AM y ASR realizadas con diferentes sustratos usando lodo granular tomado del reactor UASB a los días de operación 0 y 194. Los resultados obtenidos de la actividad metanogénica al inicio de la operación del reactor mostraron que la mayor actividad metanogénica se obtuvo con la mezcla etanol-acetato (0.54 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d), el valor obtenido se encuentra dentro de lo reportado en la literatura, que está alrededor de 0.45 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-d para una actividad metanogénica acetoclástica (Omil *et al.*, 1997). De igual forma la actividad obtenida solo con acetato fue similar al valor reportado en la literatura, ya que este es el principal sustrato que los organismos metanogénicos son capaces de utilizar de acuerdo a su sistema bioquímico y  $\Delta G^\circ$  de reacción. Mientras que el etanol primero es consumido por la asociación sintrófica de otras especies metabólicas que fermentan el etanol a acetato, hidrógeno y CO<sub>2</sub>, los cuales son consumidos por los organismos metanogénicos (Visser *et al.*, 1993).

Los valores de la ASR en los ensayos con acetato y etanol obtenidos con el lodo granular al día 0 mostraron que existía muy poca actividad de las BSR con ambos sustratos (Tabla 3.4), ya que otros autores reportan valores de 0.45 y 2.1 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d a partir de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato) como sustrato (Visser *et al.*, 1993; Omil *et al.*, 1996). A diferencia de los organismos metanogénicos, las BSR obtienen más energía de la degradación de etanol que de acetato (Tabla 3.1 valores de  $\Delta G^\circ$ ).

En las pruebas de actividad efectuadas con lodo obtenido del reactor a los 194 días de operación y usando acetato como sustrato (Tabla 3.4), se observa un aumento en la actividad de las BSR que oxidan completamente el sustrato a CO<sub>2</sub>, y una ligera disminución en la actividad de los organismos metanogénicos con respecto a la prueba inicial. Sin embargo, aunque la AM disminuyó, la existencia de especies metabólicas de oxidación incompleta del sustrato hasta acetato favorecieron la permanencia de los organismos metanogénicos manteniéndolos activos durante la operación del reactor. Visser *et al.* (1993)

y Omil *et al.* (1997), reportan la conversión completa del acetato por los organismos metanogénicos en presencia de altas concentraciones de sulfato.

Los resultados de las pruebas de la ASR muestran que se obtuvo el valor más alto de actividad con la combinación de etanol-lactato. En términos de energía y producción de biomasa, el lactato y el etanol son donadores de electrones superiores a otros (Tabla 3.1), ya que son sustratos que pueden enriquecer selectivamente a la población de BSR (Widdel, 1988; Kalyuzhnyi *et al.*, 1997; Kaksonen *et al.*, 2004). Al utilizar el etanol y el lactato en forma independiente se observó que la actividad con lactato fue menor a la del etanol, esto tal vez debido a que al final de la operación del reactor solo se adicionaba etanol.

**Tabla 3.4.** Evolución de las actividades específicas del lodo granular con respecto al tiempo de operación del reactor UASB. Actividad específica metanogénica (AM) y sulfatorreductora (ASR).

Sustrato	Actividad g DQO/g SSV-d			
	0 días		194 días	
	AM	ASR	AM	ASR
Etanol : Acetato	0.54	-	-	-
Etanol	0.35	0.03	-	0.22
Acetato	0.45	0.02	0.35	0.15
Etanol : Lactato	-	-	-	0.29
Lactato	-	-	-	0.16
Propionato	-	-	-	0.27

Finalmente el segundo sustrato con el que se obtuvo una mayor actividad de las BSR fue el propionato (Tabla 3.1), lo cual indica que la biomasa sulfatorreductora también fue capaz de usar otro intermediario clave de la degradación anaerobia. Widdel, (1998) reportó que en sistemas sulfurogénicos, la oxidación del propionato puede ser por asociaciones simbióticas entre bacterias acetogénicas y sulfatorreductoras hidrogenotróficas o directamente por BSR.

Estos resultados indicaron que fue posible utilizar diferentes sustratos para llevar a cabo el desarrollo de BSR. Sin embargo, los valores de actividad que se obtengan con los diferentes sustratos dependerán de los diferentes grupos bacterianos que se encuentren en el lodo granular.

Aunque se logró aumentar la actividad de las BSR, los organismos metanogénicos no fueron desplazados por completo, coexistiendo ambos tipos de microorganismos en el lodo granular al final de la operación del reactor. Lo que indicó que se necesitaron más de 250 días para que las BSR que oxidan acetato hasta CO<sub>2</sub> aumenten en número y puedan competir con los organismos metanogénicos que usan acetato y con los organismos acetogénicos que usan etanol y lactato, convirtiéndose en la especie predominante. Visser *et al.* (1993) y Omil *et al.* (1997), estudiaron la competencia a largo plazo entre los organismos metanogénicos y las BSR en reactores UASB, con acetato como sustrato y sulfato en exceso, demostrando que se requieren más de 200 días para que las BSR utilizadoras de acetato desplacen a los organismos metanogénicos. En el mismo trabajo de Omil *et al.* (1997) se observó la importancia del tipo de lodo inoculado, ya que se usó un lodo granular con bajo número de BSR utilizadoras de acetato, por lo que se requirieron más de 50 días para que se detectara degradación de acetato por sulfatorreducción.

Harada *et al.* (1994) estudiaron la competencia entre las BSR y los organismos metanogénicos con desechos complejos como sustratos a diferentes concentraciones de sulfato; concluyeron que las BSR únicamente serían predominantes después de un largo periodo de operación del reactor (180 días). Diversos autores, reportan que la competencia entre los organismos metanogénicos y las BSR podría deberse a otros tipos de factores como son: a) la temperatura, b) el pH, c) tipo de lodo inoculado, d) duración del experimento, e) concentración de la materia orgánica y sulfato, f) propiedades cinéticas y termodinámicas de crecimiento, y g) constantes de afinidad por el sustrato (Visser *et al.*, 1993; Oude Elferink *et al.*, 1994; Lens *et al.*, 2000).

### **3.5 Conclusiones**

En este trabajo se demostró que las condiciones de operación impuestas al reactor UASB durante 250 días permitieron el desarrollo de BSR, lo cual se reflejó en los valores de la ASR obtenida con los diferentes sustratos y la producción de sulfuro en el reactor UASB.

La relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y los diferentes tipos de sustratos fueron determinantes para el desarrollo de las bacterias sulfatorreductoras. Sin embargo el desarrollo de las BSR fue lento y no fueron capaces de desplazar a los organismos metanogénicos coexistiendo ambos tipos de bacterias hasta el final de la operación del reactor, por lo que las BSR requieren más tiempo para que puedan desplazar a los microorganismos metanogénicos u otras especies metabólicas presentes creando un sistema completamente sulfatorreductor. Los valores reportados de las pruebas de ASR al final de la operación, demostraron que es factible utilizar diferentes sustratos para llevar a cabo el desarrollo de BSR, debido a que en un lodo granular existen diversos grupos bacterianos afines a diferentes sustratos.

Finalmente se puede concluir que es posible el desarrollo de biomasa sulfatorreductora y la producción de sulfuro durante el tratamiento anaerobio en un reactor UASB a partir de un lodo metanogénico.

### 3.6 Referencias bibliográficas

- American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard methods for examination of water and wastewater*. (20th edition). Washington D.C.
- 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.
- Dar S.A., Kleerebezem R., Stams A.J.M., Kuenen J.G. y Muyzer G. (2008). Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Environ Biotechnol*. **78**, 1045-1055.
- Harada H., Uemura S., Momono K. (1994). Interaction between sulfate reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Water Res*. **28**, 355-367.
- Hulshoff Pol L.W., Lens P., Stams A.J.M., Lettinga G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*. **9**, 213-224.
- Kaksonen H., Riekkola-Vanhanen., Puhakka J. (2003). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Res*. **37**, 255-266.
- Kaksonen H., Plumb J., Franzmann D., Puhakka J. (2004). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiol Ecol*. **47**, 279-289.
- Kalyuzhnyi S., Fragoso C., Rodríguez J. (1997). Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with ethanol as the electron donor. *Microbiol*. **66**, 562-567.
- Madigan M.T., Martinko J.M. (2006). *Brock Biology of microorganisms*. 11a. Edición, Pearson Prentice Hall. New Jersey. USA.
- Lens P., Omil F., Lema J.M., Hulshoff Pol. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental Technologies to treat sulfur Pollution*, P. Lens y L. Hulshoff Pol Eds., IWA Publishing, London, **7**, 153-173.
- Lens P., Vallero M., Esposito G., Zandvoort. (2002). Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. *Biores Technol*, **1**, 311-325.
- Omil F., Lens P., Hulshoff Pol. L., 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., Visser A., Hulshoff Pol. L., 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., Stams A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol Rev.* **15**, 119-136.
- Rinzema A., Lettinga G. (1988). Anaerobic treatment of sulphate-containing wastewater. En: *Biotreatment Systems*. D.L. Wise Ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp.65-109.
- Visser A., Gao Y., Lettinga G. (1992). The anaerobic treatment of a synthetic sulfate containing wastewater under thermophilic (55°C) conditions. *Water Sci Technol.* **25**, 193-202.
- Visser A., Beekma I., Van der Zee F., Stams A.J.M., Lettinga G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol.* **40**, 549-556.
- Visser A., Hulshoff P.L., Lettinga G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci Technol.* **33**, 99-110.
- Yoda M., Kitagawa M., Miyaji Y. (1987). Long term competition between sulfate-reducing and methane producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Water Res.* **21**, 1547-1556.
- Widdel F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate reducing bacteria. En: *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder A.J.B. Ed., Wiley-Interscience, New York, pp. 469-585.

## **Capítulo 4. Precipitación y recuperación de sulfuros metálicos de agua residual ácida conteniendo metales en un reactor sulfurogénico de lecho fluidificado inverso.**

### **4.1 Resumen**

Este estudio reporta la factibilidad de recuperar precipitados metálicos de un agua residual sintética acidificada conteniendo etanol, Fe, Zn y Cd con una carga orgánica de 2.5 g DQO/L-d y una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.8 en un reactor sulfatorreductor de lecho fluidificado inverso. Los metales fueron adicionados incrementando las velocidades de carga: Fe desde 104 a 320 mg/L-d, Zn desde 20 a 220 mg/L-d, y Cd desde 5 a 20 mg/L-d. Las remociones máximas de DQO y sulfato alcanzadas fueron de 54 y 41%, respectivamente. El reactor de biopelícula se operó a valores de pH tan bajos como 5.0 con un desempeño estable, sin observar efectos adversos sobre el consumo de la DQO o la producción del sulfuro. Las eficiencias de precipitación de los metales obtenidas para Fe, Zn y Cd excedieron 99.7%, 99.3% y 99.4%, respectivamente. El total de los precipitados recuperados fue de 90% de la masa teórica esperada como sulfuros metálicos. Los precipitados fueron recuperados principalmente del fondo del reactor y del equalizador. El análisis de los precipitados mostraron la presencia de piritita (FeS), esfalerita (ZnS) y greenockita (CdS); no se identificaron hidróxidos y carbonatos metálicos como fases cristalinas. Este estudio es el primero en reportar la viabilidad para recuperar los sulfuros metálicos separados de la biomasa en un proceso sulfatorreductor en una sola etapa.

**Palabras clave:** biopelícula; cadmio; reactor de lecho fluidificado; hierro; precipitación de metales; sulfuros metálicos; sulfatorreducción; zinc.

Una versión modificada de este capítulo se publicó como:  
Marisol Gallegos-García, Lourdes B Celis, René Rangel-Méndez, Elías Razo-Flores (2009). "Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acidic wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor". *Biotechnol Bioeng.* **102**, 91-99.

## 4.2 Introducción

La contaminación ambiental por metales pesados es un asunto de importancia extrema debido a su impacto en la salud pública, el medio ambiente y finalmente en la economía. Algunos sectores industriales, por ejemplo minería, semiconductores, metalúrgica, electroplatinado y acabados metálicos generan efluentes contaminados con una gran variedad de metales tóxicos (Sierra-Alvarez *et al.*, 2007). Los métodos usados tradicionalmente para el tratamiento de aguas residuales ácidas que contienen metales se basan en la neutralización química y la precipitación de los metales en forma de hidróxidos (Johnson, 2000; Kaksonen y Puhakka, 2007). Las desventajas de los tratamientos químicos incluyen el alto costo de los reactivos químicos y la producción excesiva de lodos, los cuales requieren de una disposición posterior (García *et al.*, 2001). La sulfatorreducción se ha convertido en una alternativa para el tratamiento de aguas residuales que contienen metales. Este proceso anaerobio es realizado por las bacterias sulfatorreductoras (BSR) que utilizan el sulfato como aceptor terminal de electrones para la oxidación de compuestos orgánicos y de hidrógeno (donadores de electrones), dando por resultado la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). La remoción de los metales por sulfatorreducción es debido a la formación de precipitados altamente insolubles con el H<sub>2</sub>S biogénico, como se muestra en las ecuaciones (4.1) y (4.2). Por otra parte, la alcalinidad producida aumenta el pH del agua residual (Ec. 4.3):



Donde CH<sub>2</sub>O = Materia orgánica (donador de electrones)



Donde M<sup>2+</sup> = metal, como Fe<sup>2+</sup>



Kaksonen y Puhakka. (2007) y Hao (2000) revisaron diferentes configuraciones de reactores sulfatorreductores para la precipitación de metales; estas configuraciones incluyen

los procesos de una sola etapa o de unidades separadas. En los procesos de una sola etapa, los metales pesados son precipitados como sulfuros metálicos y son retenidos en el fondo del reactor junto con la biomasa (Janssen *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2003a,b), mientras que en procesos de unidades separadas, la producción biológica del sulfuro y la precipitación química de los sulfuros metálicos ocurre en unidades independientes permitiendo la recuperación de minerales valiosos (Bhagat *et al.*, 2004; Tabak *et al.*, 2003; Sierra-Alvarez *et al.*, 2007). Dependiendo del tipo de reactor y la configuración del proceso, los sistemas existentes muestran ventajas y desventajas (Kaksonen y Puhakka, 2007).

Se han aplicado varias configuraciones de reactores de alta tasa para la precipitación biológica de sulfuros metálicos incluyendo los reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (de Vegt *et al.*, 1998; Kaksonen *et al.*, 2003b), filtros anaerobios (Elliott *et al.*, 1998; Jong y Parry, 2003), reactores de lecho expandido (Sierra-Alvarez *et al.*, 2007) y los reactores de lecho fluidificado (Kaksonen *et al.*, 2003a,b). Entre las diferentes configuraciones de reactores de lecho fluidificado, el reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) es una alternativa apropiada no solo para la precipitación de metales, si no también para su recuperación. En este tipo de reactores partículas de soporte flotan en el líquido en la parte superior de la columna y estas partículas se fluidifican mediante un flujo descendente del líquido (Celis-García *et al.*, 2007). Después de la inoculación, se desarrolla una biopelícula sobre el soporte que permanece en la parte superior del reactor y mantiene los sulfuros metálicos precipitados separados de la biomasa, lo cual no ocurre en los reactores sulfidogénicos convencionales de alta tasa. Hasta la fecha, los sulfuros metálicos precipitados y la biomasa son recuperados en unidades separadas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de un reactor LFI sulfidogénico para la precipitación y recuperación de los sulfuros metálicos en una sola etapa, utilizando agua residual ácida conteniendo sulfato, hierro, zinc y cadmio. Se espera que la configuración del reactor LFI permita la recuperación de los sulfuros metálicos separados de la biomasa.



## 4.3 Materiales y métodos

### 4.3.1 Operación del reactor LFI

Los experimentos en continuo se llevaron a cabo en el reactor LFI descrito en el capítulo 2. El reactor LFI fue inoculado con 600 mL de una biopelícula sulfatorreductora desarrollada sobre partículas finas de polietileno de baja densidad como material de soporte (500  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio y una densidad aparente de 400  $\text{kg/m}^3$ ). La biopelícula se obtuvo de un reactor LFI similar a escala laboratorio, el cual trató una mezcla de etanol-lactato a una relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 0.6 por más de 225 días, a un pH entre 7.0 y 6.0. El soporte fue fluidizado y mantenido a la mitad del largo de la columna por el flujo de recirculación; el flujo de recirculación fue de 750 mL/min resultando una velocidad superficial del líquido de 18.6 m/h. La velocidad de recirculación aseguró condiciones de mezcla completa dentro del reactor LFI y una fluidificación del 50% con respecto al volumen del reactor. El reactor se alimentó con agua residual ácida sintética, con medio mineral (Capítulo 2) y una mezcla de etanol-lactato o etanol como donador de electrones y se adicionó sulfato de sodio como aceptor de electrones; durante todo el experimento la relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  fue alrededor de 0.8.

El reactor LFI fue operado en continuo por 320 días bajo seis diferentes periodos de operación, los cuales se muestran en la Tabla 4.1. Durante los primeros 126 días (periodos I-III) el reactor fue operado sin la adición de metales en el afluente, mientras que de los días 127 a 318 (periodos IV-VI) se alimentaron Fe, Zn y Cd en el reactor como  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente. Los metales fueron adicionados uno por uno (para evaluar los cambios que pudieran afectar el desempeño del reactor al adicionar cada metal) y sus concentraciones fueron incrementadas gradualmente (Tabla 4.1). Las concentraciones iniciales de Zn y Cd estuvieron por debajo de los valores reportados en la literatura como tóxicos para las BSR (Hao *et al.*, 1994; Kaksonen *et al.*, 2004). Las cantidades de cada metal (Fe, Zn y Cd) alimentadas al reactor fueron utilizadas para estimar la producción teórica de los sulfuros metálicos de acuerdo a la siguiente estequiometría: 1g Fe (+II), Zn (+II) ó Cd (+II) requiere de 0.57, 0.49 ó 0.28 g de sulfuro para formar los correspondientes sulfuros metálicos: FeS, ZnS y CdS. Entonces, toda la masa teórica calculada de los sulfuros metálicos para cada periodo y para cada metal fue sumada para

obtener la masa total de sulfuros metálicos que deberían ser recuperados, la cual fue de 156 g.

El pH del afluente se ajustó entre 5.0 y 6.0 para asegurar que los metales se encontraran en forma soluble (Stumm y Morgan, 1996). El desempeño del reactor se evaluó por medio de la remoción de DQO y sulfato, la producción de sulfuro y la remoción/precipitación de los metales solubles Fe, Zn y Cd como sulfuros metálicos. La recuperación de los sulfuros metálicos como precipitados en el sistema se efectuó colectando los sólidos producidos durante periodos de 7 días. Los precipitados se secaron a 105°C y posteriormente incinerados a 550°C por 1 h para eliminar todos los compuestos volátiles. El contenido de cenizas fue utilizado para el balance de los sólidos fijos, asumiendo que todas las cenizas después de la combustión de los sólidos a 550°C eran sulfuros metálicos.

**Tabla 4.1.** Condiciones de operación en continuo para la sulfatorreducción y precipitación de metales en el reactor LFI operado a temperatura ambiente (18–26°C).

Parámetros	Periodo Experimental					
	I	II	III	IV	V	VI
Días de operación	0-55	56-86	87-126	127-177	178-258	259-318
DQO afluente (g/L)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Etanol/Lactato (base DQO)	2:1 <sup>a</sup>	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0
TRH (d)	2	1.5	1	1	1	1
Carga orgánica (g DQO/L-d)	1.25	1.66	2.5	2.5	2.5	2.5
Carga de sulfato (g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L-d)	1.5	2.25	3.0	3.0	3.0	3.0
pH afluente	5.0	5.0	6.0 - 5.0	6.0	6.0	6.0
Carga de Fe (+II) (mg/L-d)	-	-	-	104	104-140	140-320
Carga de Zn (+II) (mg/L-d)	-	-	-	-	20-40	40-220
Carga de Cd (+II) (mg/L-d)	-	-	-	-	-	5-20

<sup>a</sup> La relación se cambió a 1:0 en el día 37.

### 4.3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados tanto para el reactor en continuo como para los ensayos en lote para determinar la actividad específica anaerobia se describen en la sección 2.1.3 del capítulo 2.

### **4.3.3 Ensayos de actividad sulfatorreductora específica**

La actividad específica sulfatorreductora de la biopelícula se determinó utilizando etanol como sustrato (1 g DQO/L). La actividad fue calculada mediante la pendiente de la curva de producción de sulfuro (concentración de sulfuro vs. tiempo) y la cantidad de sólidos volátiles adheridos al soporte (SVI) contenidos en cada botella (Sección 2.3.5).

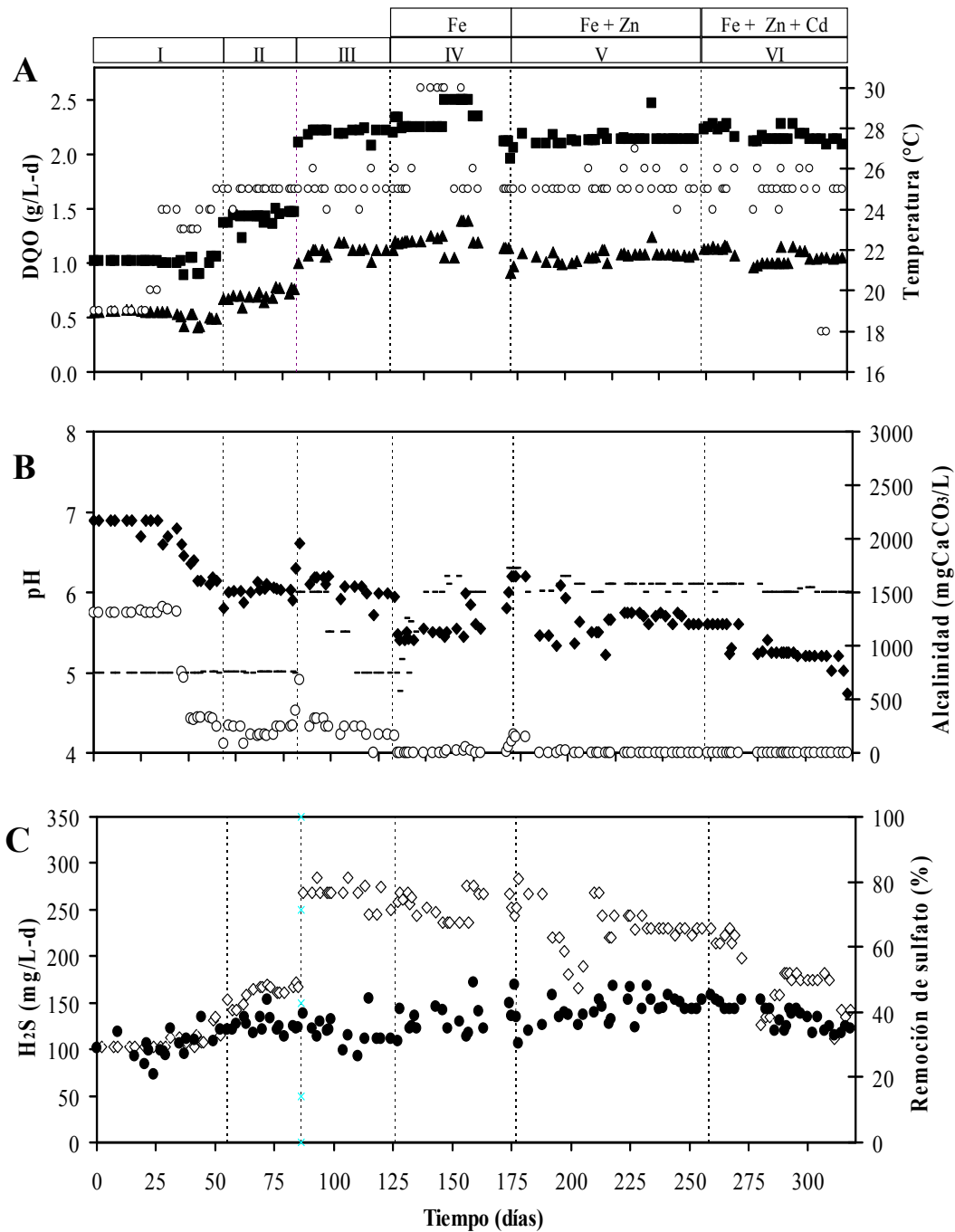
### **4.3.4 Análisis**

Los análisis para la determinación de DQO, alcalinidad, pH, sulfuro, sulfato, SSV y AGV se describen en el capítulo 2 (Sección 2.2.5).

## **4.4 Resultados**

### **4.4.1 Remoción de DQO y sulfato**

La Figura 4.1 muestra el desempeño del reactor con respecto al tiempo y las eficiencias de remoción promedio se presentan en la Tabla 4.2. Durante los primeros tres periodos de operación el pH del afluente se mantuvo entre 5.0 y 6.0, y se efectuaron cambios en la composición de la fuente de carbono y en el tiempo de retención hidráulico (TRH). El desempeño del reactor LFI fue evaluado utilizando un agua residual sintética acidificada que inicialmente consistía de una mezcla de etanol-lactato como sustratos orgánicos (2:1, en base a DQO); posteriormente la concentración del lactato se fue disminuyendo por etapas hasta tener etanol como único sustrato orgánico en la alimentación en el día 37. Durante el periodo I las eficiencias de remoción de DQO y sulfato fueron en promedio 52% y 30%, respectivamente; el sulfuro alcanzó una concentración de 230 mg/L. El pH en el afluente se mantuvo en 5.0 y fue neutralizado por la alcalinidad producida por la oxidación del sustrato orgánico; el pH en el efluente alcanzó valores de 6.9 los primeros 27 días de operación (Fig. 4.1B). Sin embargo, para el día 40, la alcalinidad disminuyó y el pH del efluente alcanzó valores cercanos a 6.0.



**Figura 4.1** Desempeño del reactor LFI. **A:** velocidad de carga de DQO (■), velocidad de remoción de DQO (▲), temperatura (○), **B:** pH afluente (---), pH efluente (◆), alcalinidad por bicarbonato (○), **C:** velocidad de producción de H<sub>2</sub>S (◇), y eficiencia de remoción de sulfato (●). Ver la Tabla 4.1 para las condiciones de operación.

**Tabla 4.2.** Eficiencias del tratamiento durante la operación en continuo del reactor LFI para la reducción de sulfato y precipitación de metales (promedio  $\pm$  desviación estándar).

Parámetros	Periodo Experimental					
	I (n = 22)	II (n = 16)	III (n = 17)	IV (n = 24 <sup>a</sup> ó 20 <sup>b</sup> )	V (n = 31 <sup>a</sup> ó 32 <sup>b</sup> )	VI (n = 31 <sup>a</sup> ó 37 <sup>b</sup> )
Días de operación	0-55	56-86	87-126	127-177	178-258	259-318
Eficiencia de remoción de DQO (%)	52 $\pm$ 3.3	50 $\pm$ 1.3	54 $\pm$ 1.2	50 $\pm$ 2.2	50 $\pm$ 1.4	50 $\pm$ 1.7
Eficiencia de remoción de sulfato (%)	30 $\pm$ 3.9	36 $\pm$ 2.5	33 $\pm$ 4.3	36 $\pm$ 4.8	41 $\pm$ 3.1	35 $\pm$ 1.5
Concentración de acetato (g DQO/L)	0.43 $\pm$ 0.1	0.96 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.12	1.3 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1
Sulfuro disuelto (mg/L)	230 $\pm$ 17.4	250 $\pm$ 28.3	268 $\pm$ 14.0	275 $\pm$ 14.2	230 $\pm$ 39.6	142 $\pm$ 15.0
Alcalinidad por bicarbonato (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	1,314 $\pm$ 19.3 <sup>c</sup> ; 274 $\pm$ 72 <sup>d</sup>	254 $\pm$ 136	227 $\pm$ 129	0	0	0
pH efluente	6.14 $\pm$ 0.02	6.1 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.5	5.8 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.2

Los valores de la remoción de DQO (P < 0.0282), remoción de sulfato (P < 0.0001) y la concentración de sulfuro (P < 0.0001) muestran diferencias significativas entre los periodos I y VI a un intervalo de confianza de 95%.

<sup>a</sup> Eficiencia de remoción de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, concentración de sulfuro y acetato.

<sup>b</sup> Eficiencia de remoción de DQO, alcalinidad y pH.

<sup>c</sup> El sustrato fue etanol/lactato (2:1 base DQO).

<sup>d</sup> El sustrato fue etanol.

En el periodo II, el TRH fue reducido a 1.5 días con el consecuente incremento de la carga orgánica y de sulfato. Bajo estas condiciones la eficiencia de remoción de DQO se mantuvo en promedio alrededor de 50% y la eficiencia de remoción de sulfato incrementó ligeramente hasta 36%, obteniéndose en promedio una concentración de sulfuro de 250 mg/L; el pH en el efluente se mantuvo en 6.1.

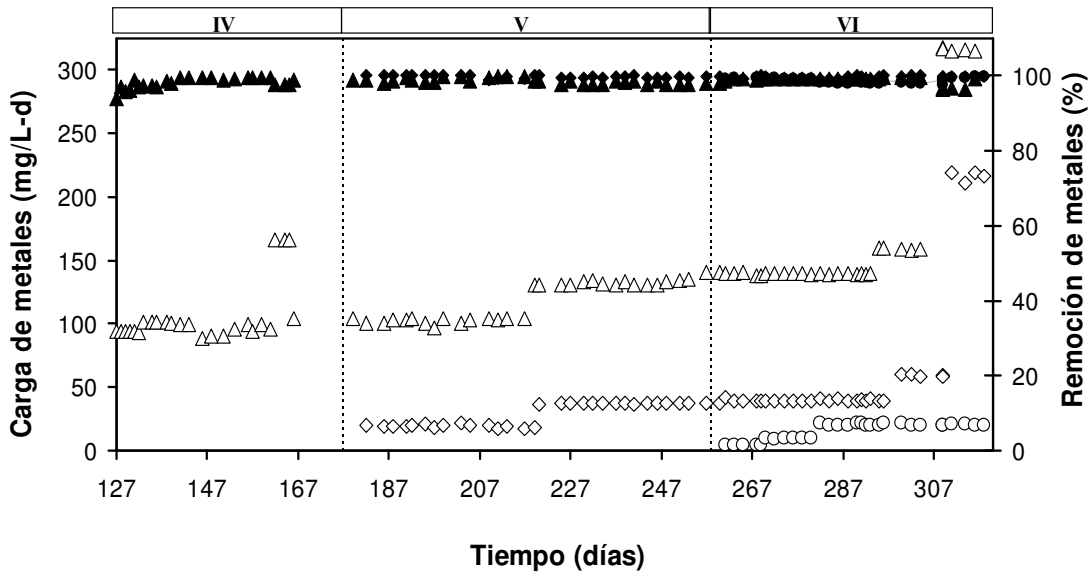
Posteriormente, el TRH se disminuyó a 1 día y la carga orgánica y de sulfato se incrementó a 2.5 g DQO/L-d y 3 g  $\text{SO}_4^{2-}$ /L-d, respectivamente; bajo estas nuevas condiciones las eficiencias de remoción de DQO y sulfato permanecieron cerca de los valores obtenidos durante el periodo anterior. No obstante, durante este periodo se obtuvo la máxima concentración de sulfuro disuelto durante la operación del reactor, que fue de 284 mg/L; al final del periodo III la concentración de sulfuro disuelto fue de 258 mg/L. En este punto, la alcalinidad por bicarbonato fue despreciable y consecuentemente el pH en el efluente disminuyó a 5.0 (Fig. 4.1B). A partir del día 127 y en adelante, periodos IV-VI, el reactor se operó con cargas incrementales de metales bajo las mismas condiciones operacionales del periodo III (Tabla 4.1).

Tal como se muestra en la Figura 4.1 y la Tabla 4.2, la adición de metales no afectó las eficiencias de remoción de DQO y sulfato, las cuales permanecieron alrededor de 50% y 35%, respectivamente, aun cuando la carga de metales se incrementó hasta 320 mg/L-d de Fe, 220 mg/L-d de Zn y 20 mg/L-d de Cd durante el final de la operación del reactor en el periodo VI. Debido a la falta de alcalinidad en el sistema y la acidez generada por la reacción de precipitación de los metales (Ec. 4.2), el pH en el afluente se ajustó a 6.0 con  $\text{NaHCO}_3$  a partir del día 139 y en adelante. Es interesante resaltar que al final del periodo VI, cuando la carga de metales aplicada al sistema fue la más alta (270–318 días), el desempeño del reactor LFI permaneció estable, aun operando a valores de pH tan bajos como 5.0, indicando la robustez del sistema.

#### **4.4.2 Remoción de hierro, zinc y cadmio**

En la Figura 4.2 se muestran las cargas de Fe, Zn y Cd aplicadas al reactor LFI y las eficiencias de remoción de metales en función del tiempo de operación a un pH en el afluente de 6.0. Al inicio del periodo IV (día 127), la carga inicial de Fe aplicada al reactor LFI fue de 104 mg/L-d y fue incrementada a 140, 160 y 320 mg/L-d en los días 218, 294 y

309, respectivamente. De manera similar se adicionó Zn y Cd al sistema; la carga inicial de Zn se incrementó desde 20 mg/L-d (día 178) a 220 mg/L-d (día 309): para Cd la carga se incrementó desde 5 mg/L-d (día 259) a 20 mg/L-d (día 280). La eficiencia de remoción de los metales se mantuvo por arriba de 99.8% en los periodos IV y V; a las velocidades de carga más altas para cada metal (periodo VI) las eficiencias de remoción fueron mayores que 99.4% (Fig. 4.2). La concentración en el efluente de Fe, Zn y Cd soluble al final del periodo VI (últimos 9 días), fueron en promedio menores que 1, 0.8 y 0.2 mg/L, respectivamente.



**Figura 4.2** Velocidad de carga aplicada al reactor LFI, Fe (Δ), Zn (◇) y Cd (○) soluble, eficiencias de remoción de Fe (▲), Zn (◆) y Cd (●) durante la operación.

Los sulfuros metálicos precipitados se recuperaron del sistema durante diferentes periodos. En la Tabla 4.3 se muestra la masa total de los metales adicionados durante diferentes periodos de 7 días cada uno, la masa teórica de los sulfuros metálicos esperados, y el porcentaje de sulfuros metálicos recuperados calculado a partir del contenido de sólidos fijos de la masa de sulfuros metálicos precipitados recuperados. Durante los periodos de adición de los metales al sistema, se recuperó entre 76 y 97% de la masa de los

sulfuros metálicos esperados, de esta manera la configuración del reactor LFI permitió la precipitación y recuperación de los sulfuros metálicos. Al final del experimento se recuperaron del fondo cónico del reactor, de la pared de la columna y del ecualizador de flujo 11.1 g de sulfuros metálicos precipitados (como sólidos fijos).

**Tabla 4.3** Balance de masa de los sulfuros metálicos precipitados y recuperados del reactor LFI en base a periodos de 7 días.

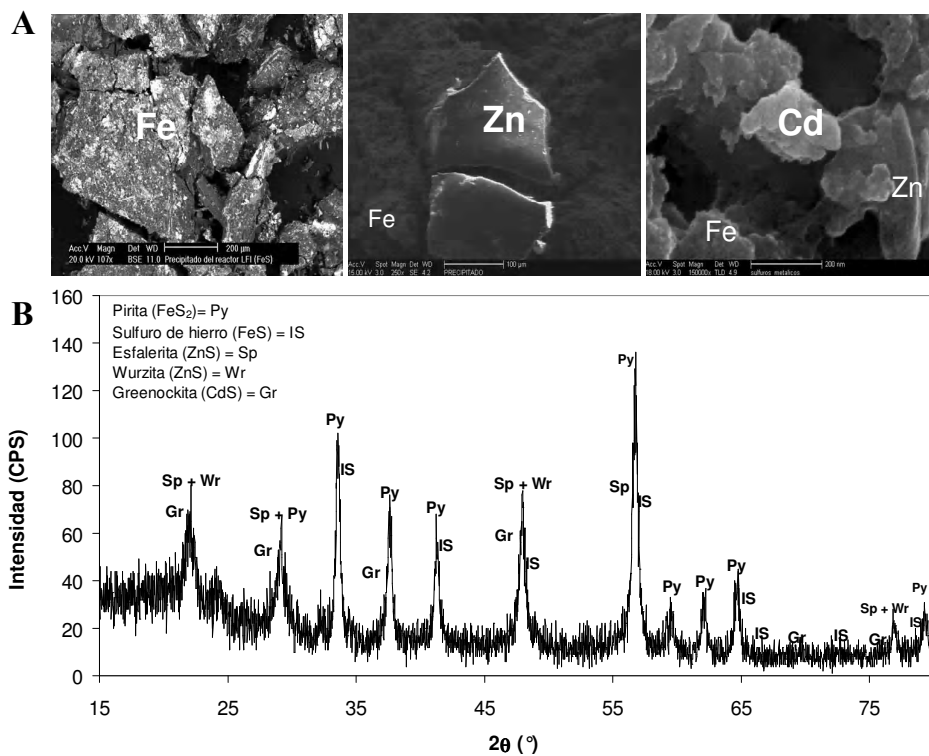
<b>Operación (días)</b>	<b>Masa total de los metales adicionados (mg)</b>	<b>Masa teórica de los sulfuros metálicos esperados<sup>a</sup> (mg)</b>	<b>Sulfuros metálicos recuperados (%)</b>
127 – 133	2,408	3,785	97
179 - 185	2,804	4,369	86
220 - 226	3,908	6,071	80
259 - 265	4,258	6,583	80
269 - 275	4,331	6,665	82
279 - 285	4,572	6,981	86
294 - 300	5,529	8,444	79
309 - 315	12,676	19,371	76

La masa de los sulfuros metálicos recuperados en porcentaje se calculó a partir los sólidos fijos contenidos en el precipitado.

<sup>a</sup>La masa teórica de los sulfuros metálicos esperados, se calculó a partir de la masa de los metales adicionados en un periodo de 7 días y la masa correspondiente de sulfuro que sería requerida para formar el sulfuro metálico correspondiente FeS, ZnS o CdS.

Las imágenes de los diagramas de DRX y MEB-EDAX permitieron verificar la composición química de los sulfuros metálicos precipitados y recuperados en el sistema (Fig. 4.3). De acuerdo al análisis elemental obtenido por el MEB-EDAX de las muestras de los metales precipitados recuperados del sistema en el día 292, el contenido promedio ( $\pm$  desviación estándar) de S, Fe, Zn y Cd fue de (% en peso)  $43.5 \pm 7.0$ ,  $37 \pm 3.3$ ,  $14 \pm 1.2$ , y  $4.1 \pm 1.9$ , respectivamente. El análisis de DRX confirmó que los cristales metálicos fueron predominantemente pirita ( $\text{FeS}_2$ ), esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y cantidades menores de greenockita ( $\text{CdS}$ ). El hierro estuvo presente en mayor proporción seguido del zinc, y el cadmio fue observado en menor proporción; también se identificó monosulfuro de hierro ( $\text{FeS}$ ).



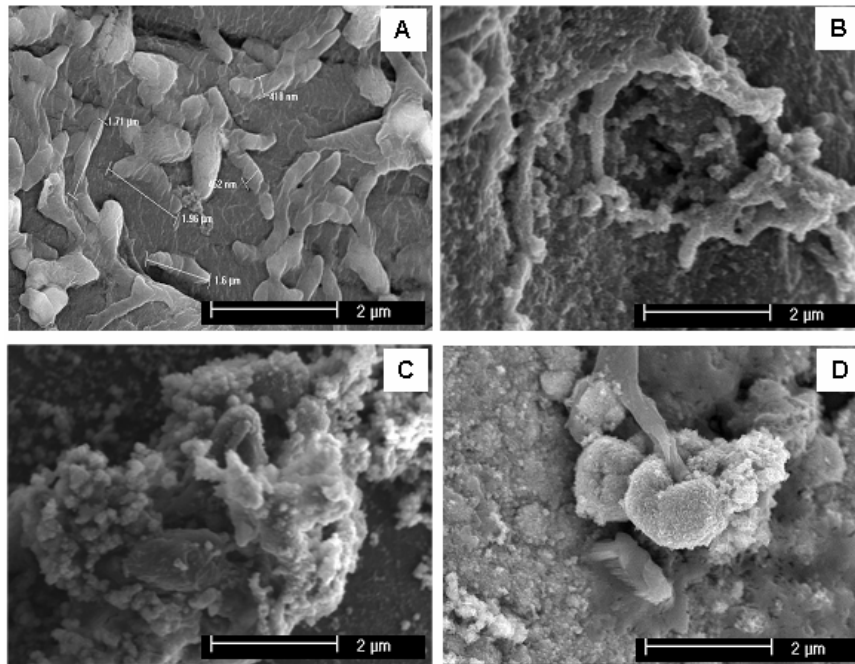


**Figura 4.3 A:** Imágenes por microscopía electrónica de barrido de los sulfuros metálicos recuperados en el reactor LFI, durante la adición de Fe (panel izquierdo); Fe y Zn (panel medio); Fe, Zn y Cd (panel derecho). **B:** diagrama de difracción de rayos-X de los precipitados.

#### 4.4.3 Actividad sulfatorreductora específica de la biopelícula

El desempeño de la biopelícula sobre el soporte se observó por microscopía electrónica de barrido (MEB) y por las pruebas de actividad específica sulfatorreductora. Las imágenes del soporte capturadas por MEB en el día 40 indican una colonización microbiana sobre el soporte, observándose predominantemente cocos y células en forma de vibrios (Fig. 4.4A).

A los 141 días, cuando el hierro fue adicionado a la alimentación las células en forma de vibrios todavía eran visibles y se observó la formación de estructuras que se asemejaban a sustancias exopoliméricas (EPS) (Fig. 4.4B). Al aumentar la carga de metales en el reactor se observó una sobreproducción de EPS en la biopelícula que cubrió a los microorganismos tal como se muestra en las Figuras 4.4C (194 días) y 4.4D (304 días).



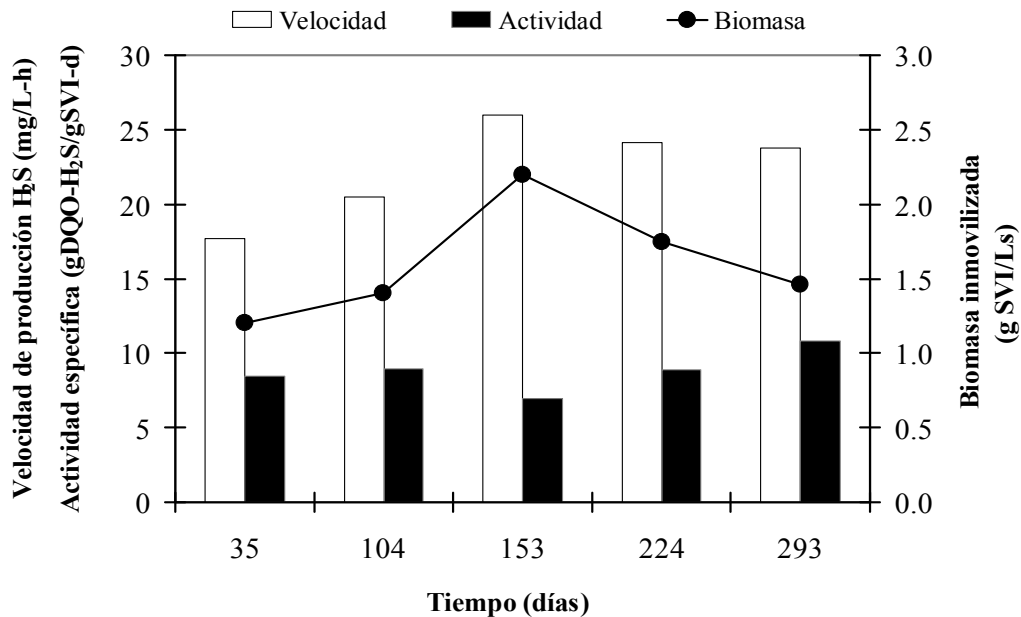
**Figura 4.4** Inmovilización de las bacterias sulfatorreductoras en el soporte, **A:** 40 días, **B:** 141 días, **C:** 194 días, **D:** 304 días de operación del reactor LFI. El tamaño de la barra es 2  $\mu\text{m}$ .

La actividad sulfatorreductora específica se determinó a diferentes tiempos durante la operación del reactor (Fig. 4.5). Antes de la adición de los metales la actividad sulfatorreductora incrementó de 8.5 a 8.9 g DQO- $\text{H}_2\text{S}$ /g SVI-d, lo que indicó el enriquecimiento de microorganismos que reducen el sulfato. Las velocidades correspondientes de producción del  $\text{H}_2\text{S}$  obtenidas fueron de 17.7 y 20.5 mg  $\text{H}_2\text{S}$ /L-h, respectivamente. Después de la adición de los metales, las velocidades de producción de sulfuro alcanzaron valores hasta de 26 mg  $\text{H}_2\text{S}$ /L-h a los 153 días, permaneciendo constante en valores de 24 mg  $\text{H}_2\text{S}$ /L-h en los días 224 y 293. Sin embargo, a los 153 días la actividad sulfatorreductora presentó una disminución a 6.9 g DQO-  $\text{H}_2\text{S}$ /g SVI-d.

Con respecto a los sólidos adheridos al soporte como SVI, nos podemos dar cuenta que antes de la adición de metales la biomasa inmovilizada alcanzó valores hasta de 1.4 g SVI/ $\text{L}_s$ ; después de la adición de metales los SVI determinados en la biopelícula a los 153 días incrementaron hasta 2.2 g SVI/ $\text{L}_s$ . Este incremento en el contenido de los SVI puede

ser atribuido a una sobreproducción de sustancias exopoliméricas tal como se observó en la Figura 4.5.

Para determinar los SVI sin EPS fue necesario remover las sustancias exopoliméricas de la biopelícula; las muestras tomadas del reactor a los 224 y 293 días se lavaron con una solución de EDTA 0.1 M antes de la determinación de los SSV para formar complejos con los exopolimeros y removerlos de las muestras, tal como reporta Martinez *et al.* (2000). El valor de los SVI en el día 293 fue de 1.46 g SVI/L<sub>s</sub>, similar al valor obtenido antes de la adición de metales a los 104 días.

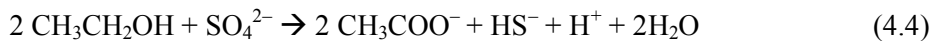


**Figura 4.5** Velocidad de producción de H<sub>2</sub>S, actividad específica y la biomasa adherida al soporte a diferentes tiempos de operación del reactor LFI en continuo.

#### 4.5 Discusión

El desempeño del reactor LFI en los periodos I-III mostró que la sulfatorreducción se llevó a cabo sin problemas a un pH inicial alrededor de 5.0. El decremento del TRH desde 2 hasta 1 día no afectó la eficiencia de remoción del sulfato que permaneció por arriba de 30%, las correspondientes velocidades de remoción de sulfato fueron 0.4 (periodo I), 0.81 (periodo II) y 0.99 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d (periodo III). Después de la adición de metales la mayor velocidad de

reducción del sulfato fue obtenida en el periodo V (1.2 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d), mientras que en los periodos IV y VI la reducción del sulfato fue similar a la obtenida en el periodo III. No obstante, la velocidad de reducción del sulfato en biopelículas tiende a ser mayor, por ejemplo Celis-García *et al.* (2007) obtuvieron hasta 5.3 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d en un reactor similar alimentado con una mezcla de lactato, propionato y butirato (12:1:1, en base a DQO, respectivamente). Mientras que las mayores velocidades de reducción del sulfato, reportadas por Nagpal *et al.* (2000) y Kaksonen *et al.* (2003a), fueron de 6.3 y 2.0 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d para reactores de lecho fluidificado alimentados con etanol y lactato, respectivamente. En términos de DQO, la remoción no fue completa durante todo el experimento, debido principalmente a la acumulación de acetato, la cual casi ascendió a la mitad de la DQO que se alimentó (Tabla II). Esta acumulación de acetato se debió muy probablemente a la presencia de bacterias sulfatorreductoras que oxidan incompletamente el sustrato a acetato y CO<sub>2</sub> como se muestra en las ecuaciones (4.4) y (4.5); miembros del género *Desulfovibrio* efectúan este tipo de reacciones. La presencia de *Desulfovibrio* en el inóculo utilizado para este experimento fue confirmada por análisis filogenético (Celis *et al.*, 2009).



Por otro lado, Nagpal *et al.* (2000) reportaron la acumulación de acetato en un reactor de lecho fluidificado alimentado con etanol. A un TRH entre 55 y 18.5 h el acetato representó cerca de la mitad de la DQO alimentada como etanol, sin embargo, en sus experimentos, el sulfato fue reducido entre un 90% y 68% en el mismo rango de TRH. La acumulación de acetato no solo ha sido observada en los reactores de biopelícula y parece ser un problema inherente de los reactores sulfurogénicos, en los cuales la presencia de metanógenos u otras bacterias consumidoras de acetato es insignificante. Se ha propuesto que la incapacidad de las BSR que usan el acetato para competir por el sulfato es una de las principales razones por la cual predominan las BSR que usan incompletamente el sustrato (Nagpal *et al.*, 2000). De lo anterior se deriva que deben efectuarse estudios con mayor

profundidad, referentes a la competencia entre las bacterias sulfatorreductoras que oxidan completa e incompletamente los sustratos, principalmente en biopelículas.

En la introducción se mencionó que la alcalinidad producida por la oxidación biológica del sustrato podría incrementar el pH del efluente y así contribuir a la neutralización de la acidez del agua residual. Contrario a los resultados esperados, no se observó un incremento en la alcalinidad, de hecho la alcalinidad por bicarbonato fue disminuyendo al retirar el lactato de la alimentación y la oxidación incompleta del sustrato fue la principal razón de esta disminución y la subsecuente ausencia de alcalinidad después del día 140 (periodo IV y en adelante). En la ecuación (4.4) podemos ver que la oxidación incompleta del etanol produce acetato, protones, sulfuro y no hay producción de CO<sub>2</sub> (que en solución formaría bicarbonato); la acumulación de acetato disminuye el pH debido a la formación de ácido acético en el medio (ver anexo 2), adicionalmente la precipitación de los metales también produce protones (Ec. 4.2), siendo éstas unas de las razones por las que el pH en el efluente fue menor que el pH en el afluente en los periodos IV-VI (Fig. 4.1B).

Este estudio mostró que a pesar del pH bajo dentro del reactor (cercano a 5.0), la sulfatorreducción procedió satisfactoriamente, ya que no se presentó ningún cambio en la remoción de DQO ni en la velocidad de reducción del sulfato de la biopelícula (Fig. 4.5). Este es el primer reporte de sulfatorreducción y precipitación de metales a pH tan bajo como 5.0 usando un consorcio bacteriano no acidófilo. Kimura *et al.* (2006) reportaron la reducción de sulfato y la precipitación de Zn a un pH entre 3.8 y 4.8 usando un cultivo mixto de bacterias acidófilas enriquecido de sedimentos ácidos. Otros estudios reportan el tratamiento de un agua residual ácida con un pH de entrada de 5.0 e incluso a 2.5, sin embargo el pH en el reactor (efluente) aumentó hasta 7.0 (Kaksonen *et al.*, 2003b; Jong y Parry, 2006), lo cual se debe principalmente a la alcalinidad producida. Por otra parte, la sulfatorreducción procedió satisfactoriamente en un reactor UASB acidificado; después de 70 días de operar en continuo a 55°C y controlando el pH a 5.0 aumentó la remoción de sulfato a 70%, sin embargo en este trabajo no se llevó a cabo la precipitación de metales (Lopes, 2007).

### 4.5.1 Recuperación de sulfuros metálicos

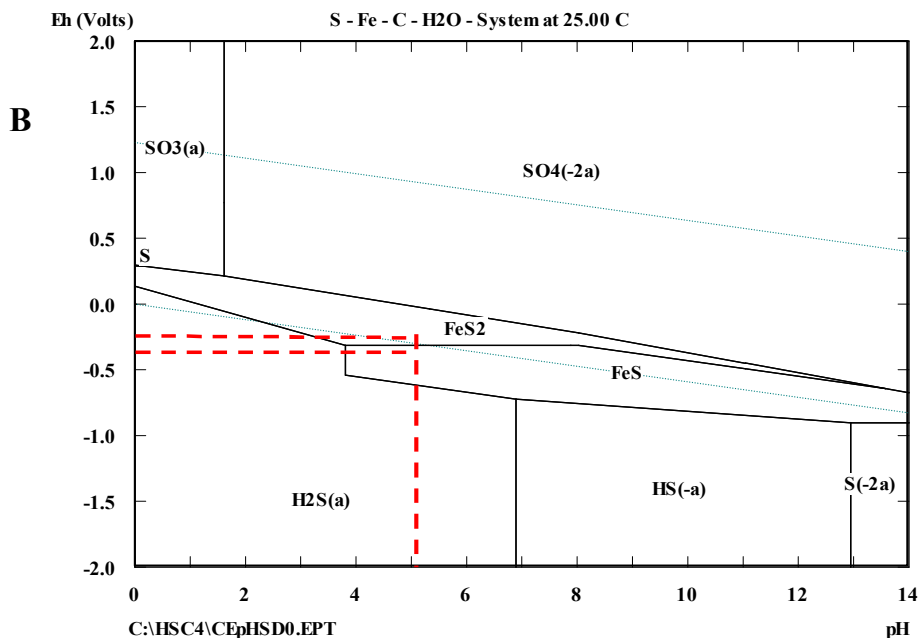
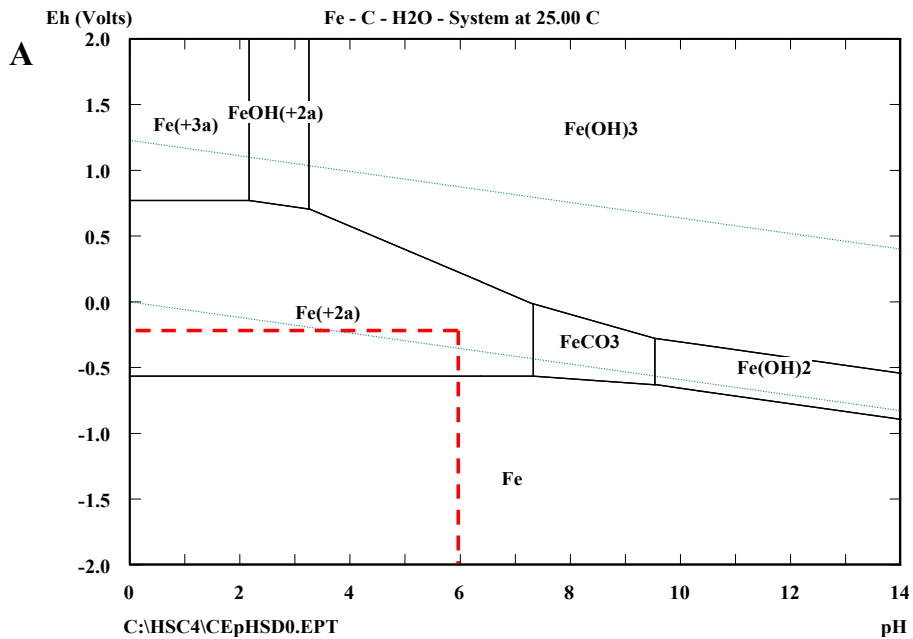
El presente estudio es el primero en reportar la recuperación de sulfuros metálicos separados de la biomasa en una sola etapa y, además, el balance de los sólidos fijos recuperados del precipitado en un proceso de sulfatorreducción para el tratamiento de un agua residual ácida. En estudios previos la precipitación de metales y la sulfatorreducción tomaron lugar en unidades separadas del reactor (de Vegt *et al.*, 1998; Sierra-Alvarez *et al.*, 2007) o bien se efectuaron en el mismo reactor, obteniendo los precipitados mezclados con la biomasa (Kaksonen *et al.*, 2004), y su recuperación no es fácil. En este estudio hasta un 97% de los precipitados fueron recuperados, principalmente del fondo del reactor y del equalizador, permaneciendo la biomasa en la parte superior del reactor. Sin embargo, no todo el precipitado pudo ser recuperado, y cuando el Zn y Cd fueron adicionados al reactor la recuperación de los precipitados fue por debajo de un 90% (Tabla 4.3). Esto puede ser debido a la formación de precipitados coloidales, partículas finas con propiedades poco estables y al bajo pH del reactor, el cual puede incrementar la solubilidad de los sulfuros metálicos. En experimentos realizados en un quimiostato, Bhagat *et al.* (2004) observaron que después de la precipitación del hierro con un gas que contenía H<sub>2</sub>S, la concentración de hierro en solución incrementó debido a los bajos valores de pH (alrededor de 2.0). Por otra parte, Esposito *et al.* (2006) encontraron que la eficiencia de precipitación del ZnS decrece a pH de 5.0, en un quimiostato alimentado con ZnSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>S.

Aunque el concepto de la recuperación de los precipitados en el fondo del reactor LFI fue factible, el balance de la recuperación de los precipitados (Tabla 4.3) muestra que la configuración del reactor necesita ser modificada para aumentar la recuperación de las partículas. La parte cónica del fondo del reactor podría ser más ancha y así reducir la velocidad del flujo descendente lo cual permitiría la formación de partículas más grandes. Una vez que el reactor se detuvo se recuperaron 19.4 g de precipitados acumulados en el fondo y las paredes del reactor. El contenido de cenizas de los precipitados fue de 57%, por lo que 11.1 g fueron de sólidos fijos. La cantidad total de los sulfuros metálicos que deberían ser recuperados al final de la operación del reactor fue estimada en 156 g. De las cenizas recuperadas de los precipitados durante los tres periodos operacionales con la adición de metales, la cantidad total de los sólidos fijos ascendió a 130.3 g de sulfuros metálicos en forma sólida. Sumando los 11.1 g de sólidos fijos recuperados al final de la

operación y el total de los sulfuros metálicos como sólidos fijos, la cantidad total recuperada fue de 141.1 g. La diferencia entre los sulfuros metálicos recuperados experimentalmente y la cantidad teórica esperada es de 14.9 g y, por lo tanto, 90% de los sulfuros metálicos fueron recuperados del reactor LFI. Cabe mencionar que al adicionar el primer metal ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y al reaccionar con el sulfuro, se observó un cambio rápido en la coloración de la biopelícula y en el líquido del reactor a color negro (ver anexo 3), color característico del  $\text{FeS}_2$  (pirita).

La construcción de los diagramas de Pourbaix para cada metal predijo que a un pH igual o menor de 6.0 los metales se encuentran en forma soluble, y bajo estas condiciones de pH los metales no precipitarán en la alimentación como carbonatos e hidróxidos, en la Figura 4.6A se presenta el diagrama de Fe, y los diagramas de Zn y Cd se presentan en el anexo 2. Para todos los metales se obtuvo una precipitación mayor que 98% a un THR de 1 día y un pH de 6.0 (Fig. 4.2) y la presencia de FeS, ZnS y CdS fue corroborada por el análisis de DRX y MEB-EDAX. Los precipitados fueron compuestos exclusivamente por sulfuros metálicos y no se observaron carbonatos o hidróxidos metálicos en fase cristalina tal como se predijo en los diagramas de Pourbaix construidos a las condiciones de pH y potencial de óxido reducción (Eh) dentro del reactor (el potencial se midió con un potenciómetro marca Termo Orion modelo 420 A<sup>+</sup> equipado con un electrodo combinado de platino con un electrodo de referencia Ag/AgCl, y cuyo potencial con respecto al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) es de 197 mV), en la Figura 4.6B se presenta el diagrama para  $\text{FeS}_2$ , y los diagramas para ZnS y CdS se presentan en el anexo 4.

Es importante hacer notar que en la mayoría de los trabajos relacionados con la precipitación de metales por sulfatorreducción, la precipitación de los metales se calcula usando la concentración de los metales solubles contenidos en la alimentación y en el efluente de los reactores, y de esta manera las eficiencias de precipitación son superiores a 98% (Bhagat *et al.*, 2004; Kaksonen *et al.*, 2004), incluso a bajas (8°C) y altas (69°C) temperaturas (Sahinkaya *et al.*, 2007), lo cual concuerda con los resultados mostrados en la Figura 4.2.



**Figura 4.6** Diagrama de Pourbaix (Eh vs. pH). **A:** para el sistema Fe-C-H<sub>2</sub>O. Las fases sólidas son Fe(OH)<sub>3</sub>, FeCO<sub>3</sub>, y Fe(S); carbono total =  $3.8 \times 10^{-6}$  M; concentración de Fe(II) =  $5.7 \times 10^{-3}$  M. **B:** Sistema Fe-S-H<sub>2</sub>O. Las fases sólidas son FeS y FeS<sub>2</sub>. Concentración de sulfuro =  $7.2 \times 10^{-3}$  M y la concentración de Fe(II) =  $5.7 \times 10^{-3}$  M (25°C) a un Eh = -0.25 a -0.30 Volts, las líneas punteadas representan el pH y Eh dentro del reactor. Diagramas construidos con la ayuda del software HSC Chemistry 4.1 (Outokumpu, Research Oy, Finlandia).



### **4.5.2 Desempeño de la biopelícula**

La biopelícula fue responsable del proceso de sulfatorreducción tal como fue mostrado por las velocidades de reducción del sulfato. Las concentraciones inhibitorias reportadas para las BSR para Zn y Cd están en el rango de 13 - 65 y >4 - 112 mg/L, respectivamente (Kaksonen y Puhakka, 2007). Las cargas de Cd y Zn de 20 y 220 mg/L-d, respectivamente, no afectaron la velocidad de reducción del sulfato de la biopelícula debido principalmente a las características hidráulicas (recirculación) del reactor. Adicionalmente, es probable que la formación de exopolímeros ayudó a la biopelícula a tolerar la presencia de los metales tóxicos (Kaksonen y Puhakka, 2007).

Para comparar el desempeño de la biopelícula con otros tipos de agregados microbianos, se consideraron los valores de la actividad sulfatorreductora específica. Antes de la adición de los metales (día 35) la actividad sulfatorreductora específica fue de 8.4 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d que incrementó a 10.8 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d en el día 293 cuando el Fe, Zn y Cd ya habían sido adicionados. Estos resultados indicaron que la biopelícula tuvo una mayor actividad sulfatorreductora cuando son comparados con los valores obtenidos de un lodo granular sulfurogénico (2.1- 0.45 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-d) con ácidos grasos volátiles como donadores de electrones (Visse *et al.*, 1993; Omil *et al.*, 1996) y con los 0.92 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SVI-d reportados para una biopelícula sulfidogénica desarrollada en un reactor LFI utilizando ácidos grasos como donadores de electrones (Celis-García *et al.*, 2007).

### **4.6 Conclusiones**

El reactor LFI demostró ser una opción conveniente para la precipitación y recuperación de los sulfuros metálicos producidos durante su operación en continuo. En el presente estudio el reactor LFI operó en valores de pH en la alimentación de 5.0 y no se observó ningún efecto inhibitorio sobre las BSR tal como lo demostró el desempeño del reactor. No obstante, valores de pH en la alimentación por debajo de 5.0 pudieran afectar la actividad sulfurogénica de las BSR, puesto que no habría suficiente alcalinidad producida por el sistema. Consecuentemente, es esencial una oxidación completa del sustrato orgánico por las BSR y la neutralización del agua producida por la alcalinidad producida, si el pH del agua residual es de 5 o menor.

Aún cuando es necesario realizar más investigación para conocer los límites del reactor LFI (por ejemplo, los niveles de metales en la entrada y salida del reactor, el TRH mínimo permisible, etc.), el reactor LFI tiene una potencial aplicación para el tratamiento de efluentes que contienen metales que reaccionan inmediatamente con el sulfuro producido y forman precipitados metálicos insolubles que pueden ser fácilmente recuperados del fondo del reactor y, muy importante, separados de la biomasa.

#### 4.6 Referencias bibliográficas

- American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard methods for examination of water and wastewater*. (20th edition). Washington D.C.
- Bhagat M., Burgess J.E., Antunes A.P.M., Whiteley C.G., Duncan J.R. (2004). Precipitation of mixed metal residues from wastewater utilizing biogenic sulphide. *Min Eng.* **17**, 925-932.
- Celis L.B., Villa-Gómez .D., Alpuche-Solís A., Ortega-Morales 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., Razo-Flores E., Monroy O. (2007). Performance of a down-flow fluidized bed reactor under sulfate reducing conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol Bioeng.* **97**, 771-779.
- Cord-Ruwisch R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulphides in cultures of sulphate-reducing bacteria. *J Microbial Methods.* **4**, 3-36.
- de Vegt A.L., Dijkman H., Buisman C.J. (1998). Hydrogen sulfide produced from sulfate by biological reduction for use in metallurgical operations. In: Asteljoki JA, Stephens RL, editors. Proceedings of the TMS Annual Meeting. Sulfide smelting '98: Current and future practices. Warrendale PA: *The Minerals, Metals & Materials Society*. p 463-471.
- Elliott P., Ragusa S., Catcheside D. (1998). Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Res.* **32**, 3724-3730.
- Esposito G., Veeken A., Weijma J., Lens P.N.L. (2006). Use of biogenic sulfide for ZnS precipitation. *Sep Purif Technol.* **51**, 31-39.
- García C., Moreno D.A., Ballester A., Blázquez M.L., González F. (2001). Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Min Eng.* **14**, 997- 1008.
- Hao O.J., Huang L., Chen J.M. (1994). Effects of metal addition of sulfate reduction activity in wastewaters. *Toxicol Environ Chem.* **44**, 197-212.
- Hao O.J. (2000). Metal effects on sulfur cycle bacteria and metal removal by sulfate reducing bacteria. In: Lens PNL, Hulshoff Pol L, editors. Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Principles and engineering*. London: IWA Publishing. pp. 393-414.
- Janssen A.J.H., Ruitenberg R., Buisman C.J.N. (2001). Industrial applications of new sulphur biotechnology. *Water Sci Technol.* **44**, (8), 85-90.
- Johnson D.B. (2000). Biological removal of sulfurous compounds from inorganic wastewaters. In: Lens PNL, Hulshoff Pol L, editors. Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Principles and engineering*. London: IWA Publishing. pp. 175-205.
- Jong T., Parry D.L. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Res.* **37**, 3379-3389.
- Jong T., Parry D.L. (2006) Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Water Res.* **40**, 2561-2571.
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D., Puhakka J.A. (2003a). Performance and ethanol oxidation kinetics of sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation.* **14**, 207-217.
- Kaksonen A.H., Riekkola-Vanhanen M.L., Puhakka J.A. (2003b). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Res.* **37**, 255-266.

- Kaksonen A.H., Franzmann P.D., Puhakka J.A. (2004). Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **86**, 332-343.
- Kaksonen A.H., Puhakka J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Eng Life Sci.* **7**, 541-564.
- Kimura S., Hallberg K.B., Jonson D.B. (2006). Sulfidogenesis in low pH (3.8-4.2) media by mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation.* **17**, 57-65.
- Lopes S.I.C. (2007). Sulfate reduction at low pH in organic wastewaters. Ph.D. Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands
- Martinez F., Favela-Torres E., Gomez J. (2000). Oscillations of exopolymeric composition and sludge volume index in nitrifying flocs. *Appl Biochem Biotechnol.* **87**, 177-188.
- Nagpal S., Chuichulcherm S., Peeva L, Livingston A. (2000). Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **70**, 370-380.
- Omil F., Lens P., Hulshoff P.L., 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.
- Sahinkaya E., Özkaya B., Kaksonen A.H., Puhakka J.A. (2007). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. *Biotechnol Bioeng.* **96**, 1064-1072.
- Sierra-Alvarez R., Hollingsworth J., Zhou M.S. (2007). Removal of copper in an integrated sulfate reducing bioreactor-crystallization reactor system. *Environ Sci Technol.* **41**, 1426-1431.
- Stumm W., Morgan J.J. (1996). *Aquatic Chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 425-514.
- Tabak H.H., Scharp R., Burckle J., Kawahara F.K., Govind R. (2003). Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. *Biodegradation.* **14**, 423-436.
- Visser A., Beeksmma I., van der Zee F., Stams A.J.M., Lettinga G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol.* **40**, 549-556.
- Zehnder A.J.B., Huser B.A., Brock T.D., Wuhrmann K. (1980). Characterization of an acetatedecarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch Microbiol.* **124**, 1-11.

## **Capítulo 5. Formación de una biopelícula sulfatorreductora de oxidación completa del sustrato para el tratamiento de un efluente sintético con sulfato**

### **5.1 Resumen**

En este capítulo se reporta la factibilidad de desarrollar una biopelícula capaz de oxidar completamente el sustrato orgánico mediante el proceso de sulfatorreducción, se utilizó un reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) a escala laboratorio. El reactor se alimentó con una mezcla de acetato/lactato como donador de electrones con las siguientes relaciones de DQO: 50/50, 80/20 y 90/10, respectivamente. La carga orgánica fue de 1 g DQO/L-d y una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.5 a un pH de 6.0, el reactor se operó durante 21 días con cada relación  $DQO/SO_4^{2-}$ . Las eficiencias de remoción de DQO a las relaciones acetato/lactato de 90/10, 80/20 y 50/50 fueron 71, 65 y 69%, respectivamente. La concentración total de sulfuro fue de 155, 145 y 136 mg/L, respectivamente. En las pruebas de actividad sulfatorreductora las velocidades de producción de sulfuro con acetato, para las relaciones acetato/lactato de 90/10, 80/20 y 50/50 fueron de 2.9, 1.0 y 0.6 mg  $S^{2-}/L-h$ . El mejor desempeño de la biopelícula en cuanto al consumo de acetato para la producción de sulfuro se obtuvo con la relación 90/10, bajo estas condiciones el reactor se operó en continuo durante 110 días, y el pH se disminuyó por etapas hasta 4.0. El consumo máximo de DQO y sulfato fue de 80 y 42%, respectivamente; la concentración total de sulfuro alcanzada fue de 205 mg/L. La alcalinidad total producida por la oxidación del sustrato orgánico fue de 795 mg  $CaCO_3/L$  y el pH dentro del reactor se mantuvo alrededor de 7.2. En este estudio se demostró la viabilidad de desarrollar en corto tiempo una biopelícula capaz de oxidar completamente el sustrato orgánico, y la estabilidad del reactor al ser operado a valores de pH tan bajos como 4.0.

**Palabras clave:** Acetato; biopelícula; reactor fluidificado; sulfatorreducción

Marisol Gallegos-García, Lourdes B. Celis, Elías Razo-Flores. "Formación de una biopelícula sulfato reductora de oxidación completa del sustrato para el tratamiento de un efluente sintético con sulfato". (En preparación)

## 5.2 Introducción

El proceso de sulfatorreducción para el tratamiento anaerobio de aguas residuales ha sido estudiado en diferentes configuraciones de reactores tales como los reactores de biopelícula. Sin embargo, uno de los problemas asociados con la formación de biopelículas es que las bacterias que predominan en mayor cantidad son las BSR que oxidan incompletamente el sustrato orgánico hasta acetato, debido a su mayor capacidad de inmovilización que las BSR que oxidan completamente el sustrato hasta  $\text{CO}_2$ , dando como resultado una acumulación de acetato en varios sistemas de reactores que operan bajo condiciones sulfatorreductoras. La baja eficiencia de oxidación del acetato da lugar a una baja producción de sulfuro y alcalinidad tal como se describió en el capítulo 4, donde se encontró que la acumulación de acetato representó la mitad de la DQO alimentada como etanol, lo que provocó una disminución del pH desde 6.9 hasta 5.0 y alcalinidad dentro del reactor. Sahinkaya *et al.* (2007a) reportan la acumulación de acetato, la disminución del pH y alcalinidad en un reactor de lecho fluidificado alimentado con etanol, operando a bajas temperaturas ( $8^\circ\text{C}$ ), para el tratamiento de un agua residual con metales. De igual manera la acumulación de acetato por la oxidación incompleta del sustrato orgánico en reactores de biopelícula fue observada por Nagpal *et al.* (2000a) y Kaksonen *et al.* (2004a). Por lo que la oxidación incompleta del acetato es la etapa limitante de muchos tipos de sistemas sulfatorreductores (Kaksonen *et al.*, 2004a).

Las BSR presentes en los reactores sulfatorreductores pueden ser de dos tipos: I) BSR que oxidan incompletamente el sustrato orgánico hasta acetato (*Desulfovibrio*) y II) BSR capaces de oxidar completamente el sustrato hasta  $\text{CO}_2$  (*Desulfobacter*) (Widdel, 1988). Las reacciones metabólicas involucradas en la degradación de la materia orgánica por los dos tipos de BSR se muestran en la Tabla 5.1.

La oxidación del sustrato se lleva a cabo mediante una ruta metabólica en donde la acetil-CoA producida desde piruvato es convertida en acetato por medio de una fosfotransacetilasa y acetato-quinasa, las cuales permiten la fosforilación de un ADP a ATP dando como resultado acetato (Fig. 5.1a). En el caso de las BSR de oxidación incompleta el acetato ya no puede ser oxidado hasta  $\text{CO}_2$ , debido a la ausencia de un mecanismo para la oxidación de la acetil-CoA (Kaksonen *et al.*, 2007), ya que el oxaloacetato y la enzima

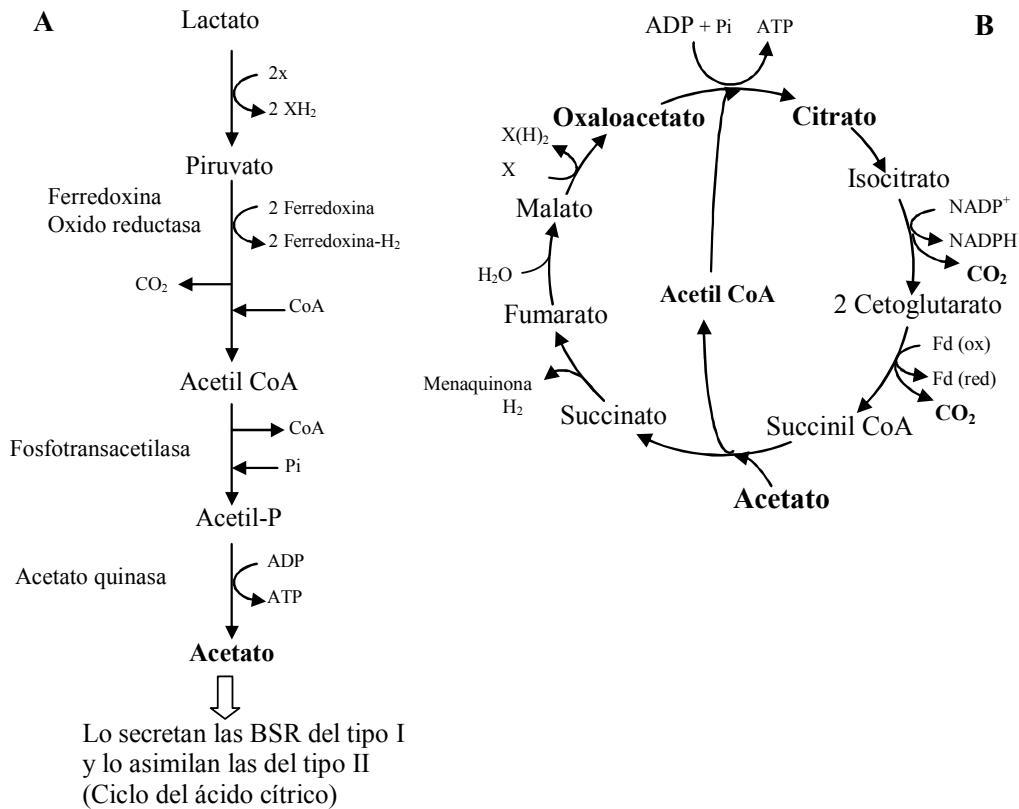
citrato liasa no están presentes en su metabolismo, por lo cual no puede entrar al ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs (Rabus *et al.*, 2006).

**Tabla 5.1** Reacciones de sulfatorreducción involucradas en la degradación de la materia orgánica. (McCartney y Oleszkiewicz, 1991).

Reacción	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)
<b>Oxidación completa</b>	
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \frac{3}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 3\text{HCO}_3^- + \frac{3}{2}\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}^+$	-127.6
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \frac{5}{2} \text{SO}_4^{2-} + \frac{1}{4}\text{H}^+ \rightarrow 4\text{HCO}_3^- + \frac{5}{2}\text{HS}^- + \frac{3}{4} \text{H}^+$	-123
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \frac{7}{4}\text{SO}_4^{2-} + \frac{1}{4}\text{H}^+ \rightarrow 3\text{HCO}_3^- + \frac{7}{4} \text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}^+$	-85.2
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-38.1
<b>Oxidación incompleta</b>	
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \frac{1}{2}\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}^+$	-80.0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \frac{3}{4} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \frac{3}{4} \text{HS}^- + \frac{1}{4}\text{H}^+$	-37.7
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \frac{1}{2}\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}^+$	-27.8

Acetato =  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ; Lactato =  $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ ; Propionato =  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ ; Butirato =  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ .

Las bacterias del género *Desulfobacter* nutricionalmente son capaces de oxidar el acetato a  $\text{CO}_2$  por vía del ciclo del ácido cítrico modificado (Fig. 5.1b). El acetato es activado vía succinil-CoA mediante la enzima acetato-CoA transferasa. Cabe destacar que la condensación de la acetil-CoA y oxaloacetato hasta citrato esta asociada a la síntesis de ATP. Las bacterias contienen una enzima llamada isocitrato deshidrogenasa que depende de  $\text{NADP}^+$ , sin embargo, la conversión de 2-cetoglutarato a succinil-CoA no ocupa  $\text{NAD}^+$ , pero si una ferredoxina como aceptor de electrones. El aceptor de hidrógeno para la oxidación de succinato a fumarato, hasta ahora se sabe que es la menaquinona oxidoreductasa. Las bacterias del grupo *Desulfobacter* están asociadas con la síntesis neta de un ATP vía fosforilación a nivel de sustrato (Thauer *et al.*, 1989; Mathews y van Holde, 2000; Rabus *et al.*, 2006).



**Figura 5.1** Ruta metabólica de oxidación del sustrato orgánico. A: oxidación incompleta del sustrato hasta acetato; B: oxidación completa del acetato hasta  $CO_2$  en base a la modificación del ciclo del ácido cítrico (Thauer *et al.*, 1989).

En general las BSR que realizan la oxidación incompleta del sustrato se caracterizan por ser nutricionalmente menos versátiles que las especies que oxidan completamente el sustrato y presentan velocidades de crecimiento más rápido, sus tiempos de duplicación están alrededor de 3-10 horas, mientras que las bacterias de oxidación completa crecen con un tiempo de duplicación de 16-20 horas (Oude Elferink *et al.*, 1994)

Uno de los factores que influye en la formación de una biopelícula sulfatorreductora es el tipo de sustrato orgánico, el cual dependiendo de su utilización va a definir el género de bacterias que van a predominar en la biopelícula. Otro de los factores que influye en su formación es la cantidad de BSR que exista en el inóculo. En un estudio reportado por Nagpal *et al.* (2000a) durante la formación de una biopelícula en un reactor de lecho fluidificado, inoculado con una mezcla de cultivos puros de *Desulfobacter posgatei* y

*Desulfovibrio desulfuricans* utilizando como donador de electrones etanol, el consumo de acetato no fue significativo posiblemente por la inhibición del consumidor de acetato (*D. posgatei*), o por la competencia con la BSR de oxidación incompleta del sustrato (*D. desulfuricans*), ya que el etanol favoreció el desarrollo de las BSR de oxidación incompleta en la biopelícula. Por otro lado, McMahon y Daugulis (2008) reportaron la oxidación incompleta del sustrato hasta acetato en un reactor de lecho empacado alimentado con lactato, el inóculo estaba compuesto por 95% de una cepa pura de *Desulfovibrio desulfuricans* y 5% de un consorcio de BSR. En donde el tipo de sustrato y la cantidad de inóculo determinó el género de BSR (oxidación incompleta) de mayor predominio en la biopelícula. En la Tabla 5.2 se presentan algunos géneros de BSR y el sustrato orgánico que utilizan.

**Tabla 5.2** Donadores de electrones utilizados por diversos géneros de BSR (Widdel, 1981; Lien y Beeder, 1997; Rabus *et al.*, 2006).

Género o especie	Donador de electrones							
	H <sub>2</sub>	Acetato	Propionato	Ácidos grasos	Etanol	Lactato	Succinato Malato	Fructuosa Glucosa
<i>Desulfovibrio</i>	+	-	-	-	+	+	±	±
<i>D. desulfuricans</i>	+	-	-	-	+	+	±	±
<i>Desulfobulbus</i>	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>Desulfomicrobium</i>	+	-	-	-	±	+	+	-
<i>Desulfohalobium</i>	+	-	-	nr	+	+	-	-
<i>Desulfobacterium</i>	±	(+)	(±)	±	±	±	±	±
<i>Desulfococcus</i>	-	(+)	+	+	+	+	-	-
<i>Desulfosarcina</i>	+	(+)	+	+	+	+	±	-
<i>Desulfonema</i>	(±)	(+)	+	+	-	±	+	-
<i>Desulfotomaculum</i>	±	±	±	±	+	±	±	±
<i>Desulfobacter</i>	±	+	-	-	±	+	-	-
<i>D. posgatei</i>	-	+	nr	-	-	-	-	-
<i>D. hydrogenofilus</i>	+	+	nr	-	-	-	-	-
<i>D. halotolerans</i>	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>D. curvatus</i>	(+)	+	-	-	+	-	-	nr

nr, no reportado; +, utilizado; (+), pobremente utilizado; ±, utilizado o no utilizado; (±), pobremente utilizado o no; -, no utilizado.



El acetato es un intermediario importante en la mineralización de la materia orgánica (Ingvorsen *et al.*, 1984), el cual puede ser oxidado completamente hasta CO<sub>2</sub> por las BSR del género *Desulfobacter* como se muestra en la Tabla 5.2. Uno de los sustratos que enriquece selectivamente la población de BSR es el lactato, este puede llegar a ser oxidado completa e incompletamente por ambos tipos de BSR ver Tabla 5.2 (Widdel, 1988). La oxidación completa de acetato y de lactato por las BSR favorece la capacidad buffer del sistema, ya que por cada mol de acetato se producen 2 moles de bicarbonato, mientras que la oxidación completa de lactato produce 3 moles de bicarbonato por cada mol de sustrato, tal como se muestra en las ecuaciones de la Tabla 5.1.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una biopelícula sulfatorreductora capaz de oxidar completamente el sustrato orgánico (acetato y lactato), en un corto tiempo y sin la acumulación de acetato. Se esperaba que la alcalinidad producida por la oxidación del sustrato permitiera operar el reactor a un pH ácido.

## **5.3 Materiales y métodos**

### **5.3.1 Operación del reactor LFI**

Los experimentos se llevaron a cabo en el reactor LFI descrito en el capítulo 2. El reactor LFI fue inoculado con 40 mL con un contenido de 4.08 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de lodo granular sulfatorreductor proveniente de un reactor UASB operado bajo condiciones sulfatorreductoras con pulsos de metales, el pulso máximo de Fe (+II) fue 474 mg/L de y de Cd (+II) fue 337 mg/L. Como material de soporte se utilizaron 260 mL de partículas finas de polietileno de baja densidad (500µm de diámetro promedio y una densidad aparente de 400 Kg/m<sup>3</sup>). El soporte se fluidificó a lo largo de la columna mediante el flujo de recirculación que fue de 700 mL/min, resultando en una velocidad superficial del líquido de 17.7 m/h. La velocidad de recirculación aseguró condiciones de mezcla completa dentro del reactor LFI.

El reactor se alimentó con medio mineral (Capítulo 2), con una mezcla de acetato/lactato como donador de electrones a tres relaciones de acetato/lactato que definieron tres experimentos diferentes: Experimento I, 50/50; experimento II, 80/20 y

experimento III, 90/10. Cada experimento se inició con soporte limpio y se inoculó con la cantidad señalada de lodo granular. Se adicionó sulfato de sodio como aceptor de electrones, la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> fue de 0.5 en los 3 experimentos y el pH inicial se ajustó a 6.0, primero con NaOH hasta un valor de 5.0 y posteriormente con bicarbonato de sodio hasta 6.0. En cada experimento el reactor se operó en lote durante 2 días y posteriormente se operó en continuo por 21 días a un TRH de 1 día. Al final de cada prueba la biopelícula se retiró del reactor para determinar la velocidad de producción de sulfuro en ensayos en lote. Las condiciones de operación para cada uno de los experimentos se muestran en la Tabla 5.3.

En el experimento III (relación acetato/lactato, 90/10), después de los 21 días de operación para formar la biopelícula, el reactor se operó en continuo por 89 días más. Durante este tiempo se redujo gradualmente el pH en el afluente desde 6 hasta 4 (períodos IIIa a IIIc) tal como se muestra en la Tabla 5.3. El desempeño del reactor se evaluó mediante las eficiencias de remoción de DQO y sulfato, así como mediante la producción de sulfuro. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, entre 25 – 30°C.

**Tabla 5.3** Condiciones de operación en continuo para el desarrollo de biopelícula sulfatorreductora de oxidación completa del sustrato en el reactor LFI.

Parámetros	Experimento			Periodo experimental		
	I	II	III	IIIa	IIIb	IIIc
Días de operación	0-21	0-21	0-21	22-75	76-89	90-110
DQO afluente (g/L)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Acetato/Lactato (en base a	50/50	80/20	90/10	90/10	90/10	90/10
TRH (d)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Carga orgánica (g DQO/L-d)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Carga de sulfato (g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L-d)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
pH del afluente	6.0	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0-4.0

### **5.3.2 Medios de cultivo**

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

### **5.3.3 Ensayos de actividad sulfatorreductora específica**

La actividad específica sulfatorreductora (ASR) de la biopelícula se determinó utilizando como sustrato acetato o lactato (1 g DQO/L) (Capítulo 2). La actividad fue calculada mediante la pendiente de la curva de producción de sulfuro (concentración de sulfuro vs. tiempo) y la cantidad de biomasa en el reactor fue calculada mediante el contenido de sólidos volátiles adheridos al soporte en cada botella (Sección 2.3.5).

### **5.3.4 Análisis**

Los análisis para determinar DQO, alcalinidad, pH, sulfuro, sulfato, SSV y AGV se describen en la sección 2.2.5 del capítulo 2.

## **5.4 Resultados**

### **5.4.1 Desempeño del reactor LFI en los experimentos I, II y III**

La Figura 5.2 muestra el desempeño del reactor con respecto al tiempo y las eficiencias de remoción promedio para cada experimento se presentan en la Tabla 5.4.

Durante los primeros 15 días de operación en continuo bajo condiciones sulfatorreductoras en el reactor LFI, para el experimento I se obtuvo una eficiencia de remoción de DQO y producción de sulfuro de 42% y 130 mg H<sub>2</sub>S/L-d, respectivamente; con una remoción de DQO por las BSR de 40%, estos resultados fueron mayores con respecto a los obtenidos en los otros dos experimentos (II y III). En el experimento II se observó una baja eficiencia remoción de DQO y velocidad de producción de sulfuro, fue hasta el día 13 que se obtuvo un aumento en éstas, alcanzando valores de 40% y 72 mg/L-d, respectivamente; mientras que en el experimento III la eficiencia de remoción de DQO alcanzó un valor de 53% y una producción de sulfuro de 85 mg/L-d.

Al final de la operación del reactor (21 días), la eficiencia de remoción de DQO y la concentración de sulfuro fueron muy similares en cada uno de los experimentos I, II y III. La remoción de DQO fue de 69, 65 y 71%, respectivamente y la concentración de sulfuro fue de 136, 145 y 155 mg/L, respectivamente. Mientras que la DQO removida por vía sulfatorreducción fue de 43, 46 y 44%, para los experimentos I, II y III, respectivamente (Fig. 5.2A).

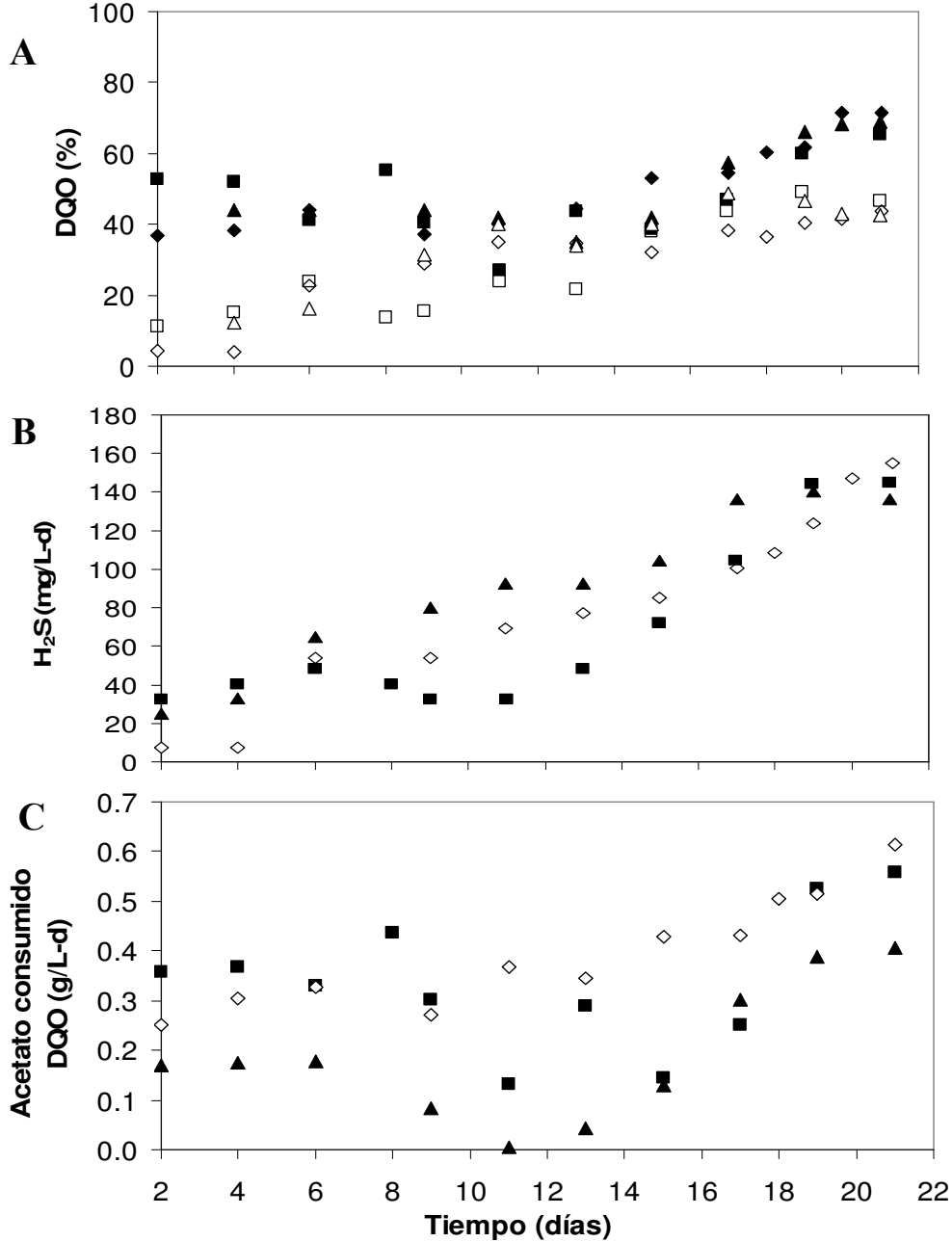
Durante el desarrollo de la biopelícula en cada experimento se encontró una mayor concentración de acetato a la salida del reactor con respecto a la entrada, debido a la presencia de BSR que oxidaban incompletamente el lactato hasta acetato. Por lo que para determinar el consumo de acetato total en cada experimento se realizó el balance de acetato en base a la cantidad de acetato alimentado, el acetato generado por las BSR que oxidan incompletamente el lactato hasta acetato y el acetato residual en el efluente. El acetato generado se calculó mediante la estequiometría de la oxidación incompleta del lactato (ver Tabla 5.1).

Los resultados del balance de acetato generado y consumido total, se presentan en la Tabla 5.5. Durante los primeros días de operación del reactor se puede observar que la velocidad de consumo de acetato es muy similar en los experimentos II y III alrededor de 0.3 g DQO/L-d. Mientras que, en el experimento I se obtuvo una menor velocidad de consumo de acetato de 0.18 g DQO/L-d (Fig. 5.2C). Sin embargo a partir de los 10 días de operación del reactor la velocidad de consumo de acetato para los experimentos I y II disminuyó hasta valores de 0.06 y 0.14 g DQO/L-d, respectivamente; entre los días 11 y 15, lo que indicó una pobre participación de las BSR que oxidan completamente el sustrato orgánico, específicamente el acetato.

Al final de la operación del reactor (21 días), en los experimentos I y II se observó un aumento en la velocidad de consumo de acetato de 0.36 y 0.44 g DQO/L-d. (Fig. 5.2C). En el experimento III se puede observar que el consumo de acetato se incrementó hasta alcanzar un valor de 0.61 g/DQO/L-d al final de la operación del reactor.

En la Tabla 5.5 se muestra el consumo de DQO como lactato y acetato vía sulfatorreducción, las cuales se determinaron a partir de la cantidad de sulfato removido en cada experimento y las concentraciones de lactato y acetato en el efluente. Durante los

primeros 9 días, en el experimento I el consumo de lactato fue de 0.42 g DQO/L-d, mientras que en el experimento II solo se consumió 0.15 g DQO/L-d de lactato.



**Figura 5.2** Desempeño del reactor LFI durante 21 días de operación, **A:** Eficiencia de remoción de DQO total en los experimentos I (▲), II (■) y III (◆); porcentaje de DQO utilizada por las BSR en los experimentos I (△), II (□) y III (◇). **B:** velocidad de sulfuro producido en los experimentos I (▲), II (■) y III (◇). **C:** velocidad de consumo de acetato en los experimentos I (▲), II (■) y III (◇).

**Tabla 5.4** Desempeño del reactor LFI operado en continuo bajo condiciones sulfatorreductoras. (Promedio  $\pm$  desviación estándar).

Parámetros	Experimento			Periodo Experimental		
	I ( <i>n</i> = 11)	II ( <i>n</i> = 11)	III ( <i>n</i> = 11)	IIIa ( <i>n</i> = 21)	IIIb ( <i>n</i> = 5)	IIIc ( <i>n</i> = 7)
Días de operación	0-21	0-21	0-21	22-75	76-89	90-110
Eficiencia de remoción de DQO (%)	49 $\pm$ 10.5	47.2 $\pm$ 10.8	52.4 $\pm$ 12.8	80.3 $\pm$ 8.4	88 $\pm$ 13	75 $\pm$ 10
Eficiencia de remoción de sulfato (%)	21.6 $\pm$ 3.2	25.0 $\pm$ 7.8	26.5 $\pm$ 7.6	52 $\pm$ 5.6	47 $\pm$ 8.1	42 $\pm$ 3.5
Sulfuro disuelto (mg/L)	82.4 $\pm$ 47.9	67.1 $\pm$ 43.8	95.9 $\pm$ 41.6	210 $\pm$ 31.8	198 $\pm$ 12.0	196 $\pm$ 11.4
Alcalinidad por bicarbonato (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	772 $\pm$ 155	1382 $\pm$ 728	748 $\pm$ 157	1075 $\pm$ 94.4	1008 $\pm$ 34	795 $\pm$ 137
pH efluente	7.0 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.3	7.6 $\pm$ 0.2	7.2 $\pm$ 0.2

En el experimento III el lactato se consumió completamente desde el inicio y la velocidad de consumo de acetato se incrementó hasta 0.4 g DQO/L-d a los 15 días del desarrollo de la biopelícula, lo que indicó un aumento en la participación de las BSR que oxidan completamente ambos sustratos (Tabla 5.5). Con respecto al consumo de lactato y acetato por sulfatorreducción en los días 16 a 21, en el experimento I el lactato consumido fue 72%, mientras que no hubo consumo de acetato. El lactato se consumió totalmente lo que indicó que el 28% del lactato restante fue consumido por otro tipo de bacterias presentes en la biopelícula que pueden utilizar el lactato (acetogénicas). Ya que la cantidad de sulfato que se removió (0.44 g  $\text{SO}_4^{2-}$ /L-d) fue menor que la que en teoría debía de usarse para la oxidación del lactato por sulfatorreducción (0.75 g  $\text{SO}_4^{2-}$ /L-d). Por otro lado, el acetato consumido fue de 0.36 g DQO/L-d que pudo deberse a la presencia de microorganismos que son capaces de utilizar el acetato pero no el sulfato (Steed *et al.*, 2000), de tal forma que el sulfuro producido en este experimento fue debido solo a la oxidación de lactato (Fig. 5.2b).

En los experimentos II y III el consumo del lactato alimentado vía sulfatorreducción fue de 100% para ambos experimentos, ya que la cantidad de sulfato removido (cercana a 0.5 g  $\text{SO}_4^{2-}$ /L-d) fue mayor que la esperada teóricamente a partir de la oxidación del lactato. El consumo de acetato vía sulfatorreducción en la prueba II fue de 68%, mientras que en la prueba III alcanzó un valor de hasta 79% (Tabla 5.5), lo que indicó una mayor participación de las BSR que oxidan completamente el sustrato hasta  $\text{CO}_2$  en el experimento III.

El pH en el afluente fue de 6.0, y el pH en el efluente fue alrededor de 7.0 para cada experimento. Con respecto a la alcalinidad se observó un incremento gradual durante los experimentos I, II y III, los valores alcanzados fueron de 1500, 1128 y 1008 mg  $\text{CaCO}_3$ /L respectivamente; al final de la operación de cada prueba.

**Tabla 5.5** Balance de acetato consumido y lactato por sulfato reducción, durante los 21 días de operación del reactor LFI en cada experimento. (Promedio  $\pm$  desviación estándar)

Experimento	I			II			III			
	Tiempo (días)	0 - 9	10 - 15	16 - 21	0 - 9	10 - 15	16 - 21	0 - 9	10 - 15	16 - 21
Acetato entrada + acetato generado del lactato (g DQO/L-d)	0.67 $\pm$ 0.008	0.70 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.003	0.91 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.001	0.96 $\pm$ 0.001
Acetato consumido (g DQO/L-d)	0.15 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.09	0.44 $\pm$ 0.2	0.29 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.06
Lactato consumido (g DQO/L-d)	0.42 $\pm$ 0.002	0.46 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.001	0.15 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.03	0.2 $\pm$ 0.02	0.097 $\pm$ 0.01	0.099 $\pm$ 0.01	0.094 $\pm$ 0.005	0.094 $\pm$ 0.005
Lactato residual (g DQO/L-d)	0.024 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.0	0.065 $\pm$ 0.04	0.061 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.0
Acetato removido por SR (%)	nSR	nSR	nSR	45 $\pm$ 20	47 $\pm$ 5.9	68 $\pm$ 14	67 $\pm$ 10	50 $\pm$ 18	79 $\pm$ 8.0	79 $\pm$ 8.0
Lactato removido por SR (%)	65 $\pm$ 2.1	67 $\pm$ 20	72 $\pm$ 0.6	100	100	100	100	100	100	100

Los valores del acetato consumido ( $P < 0.002$ ) muestran diferencias significativas entre cada prueba I, II y III con un límite de confianza de 95%.

SR = sulfatorreducción

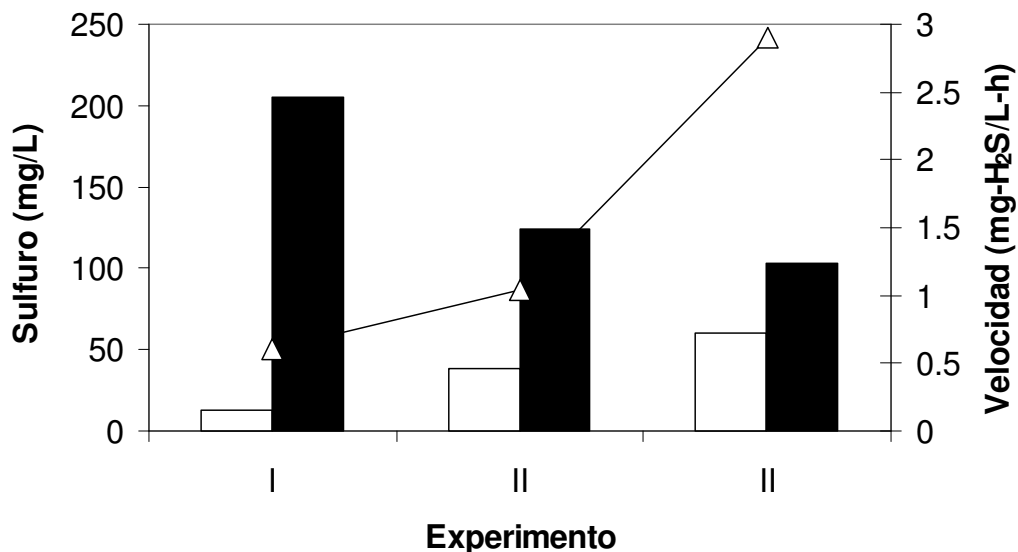
nSR= No hubo remoción del sustrato por sulfatorreducción



### 5.4.2 Velocidad de producción de sulfuro en la biopelícula

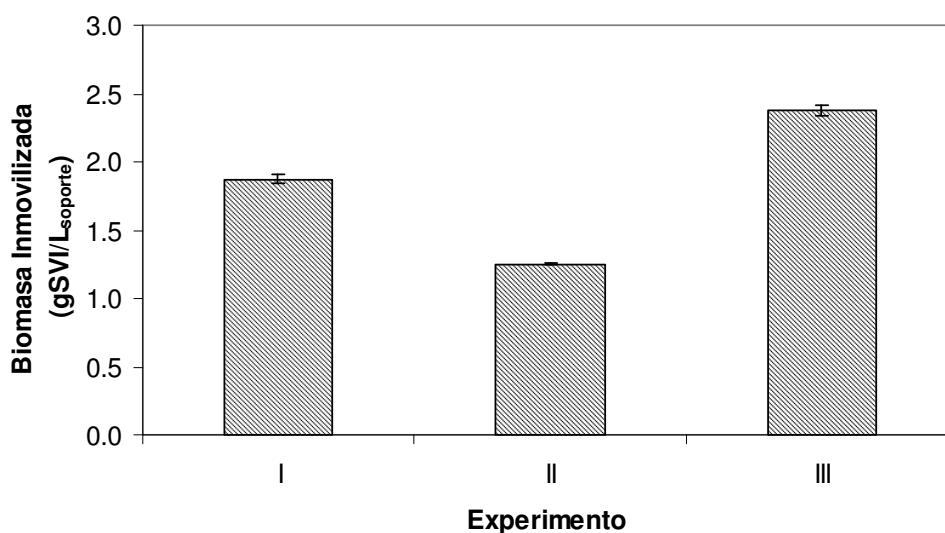
El desempeño de la biopelícula desarrollada en cada experimento, se evaluó mediante ensayos en lote para determinar la velocidad de producción de sulfuro con acetato o lactato como sustratos. Las velocidades correspondientes de producción de sulfuro a los 21 días de operación del reactor en los experimentos I y II fueron de 0.6 y 1.04 mg-H<sub>2</sub>S/L-h, respectivamente; en el experimento III la velocidad de producción de sulfuro fue de 2.9 mg-H<sub>2</sub>S/L-h lo que indicó un mayor enriquecimiento de microorganismos que reducen el sulfato comparado con las otras dos pruebas (Fig. 5.3).

La concentración máxima de sulfuro producido en cada experimento I, II y III con acetato como sustrato fue de 13, 38 y 60 mg/L y a partir de lactato fue de 205, 124 y 103 mg/L, respectivamente; podemos apreciar que la mayor producción de sulfuro se obtuvo con lactato ya que este sustrato es el de mayor preferencia por las BSR. Sin embargo, con respecto al acetato como sustrato se observa que se logró producir mayor concentración de sulfuro con la biopelícula desarrollada en el experimento III, que tenía la mayor concentración de acetato en la alimentación.



**Figura 5.3** Velocidad de producción de sulfuro utilizando acetato como sustrato (-Δ-). Concentración de sulfuro producido con acetato (□) y lactato (■) en las pruebas en lote después de 21 días de operación del reactor en cada experimento.

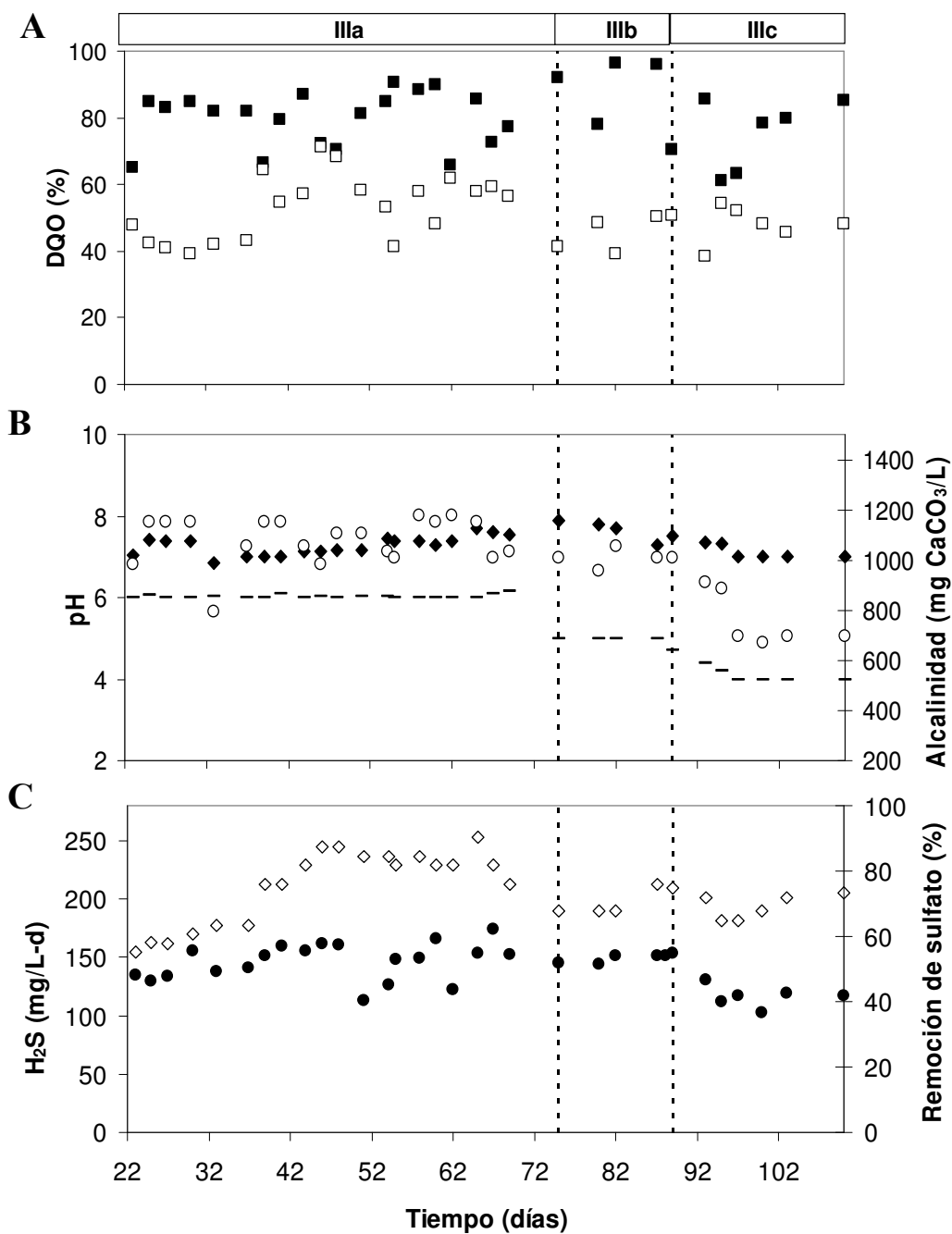
En la Figura 5.4 se presenta la cantidad de sólidos volátiles inmovilizados en el soporte en cada experimento a los 21 días. En el experimento I la cantidad de sólidos inmovilizados en el soporte fue de 1.9 g SVI/L<sub>s</sub>, En el experimento II se obtuvo una menor cantidad de sólidos de 1.3 g SVI/L<sub>s</sub>, mientras que en el experimento III se observó un aumento en la cantidad de sólidos inmovilizados de 2.4 g SVI/L<sub>s</sub>.



**Figura 5.4** Cantidad de biomasa adherida a los 21 días de operación del reactor LFI en cada experimento, expresada como sólidos volátiles inmovilizados por litro de soporte.

### 5.4.3 Reducción del pH en el experimento III

La Figura 5.5 muestra el desempeño del reactor con respecto al tiempo y las eficiencias de remoción promedio se presentan en la Tabla 5.4. Durante el periodo IIIa las eficiencias de remoción de DQO y sulfato fueron en promedio de 80.3 y 52%, respectivamente; el sulfuro producido alcanzó una concentración de 210 mg/L, en donde la remoción de DQO por sulfatorreducción fue de 52.7%. El pH en el efluente fue de 7.5 durante los primeros 75 días de operación (Fig. 5.5 B).



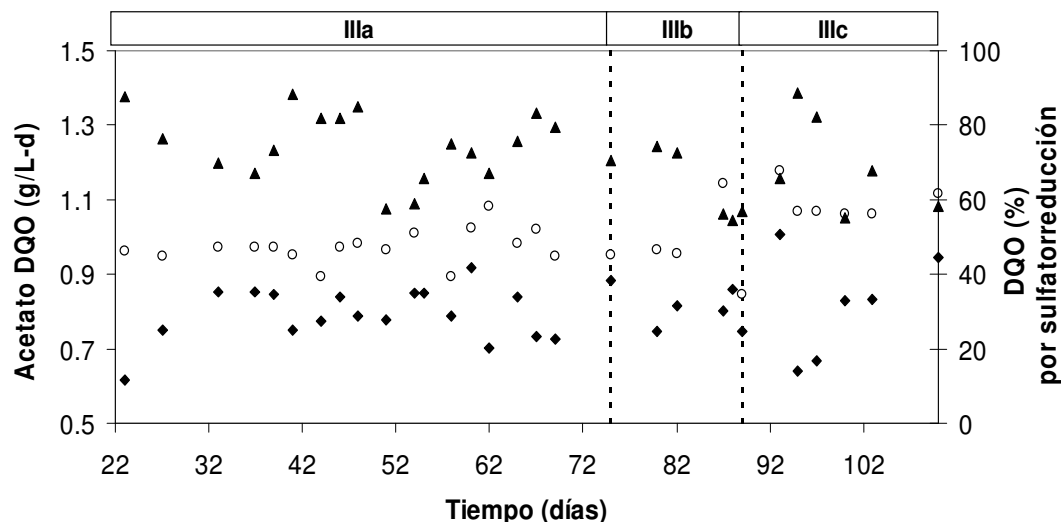
**Figura 5.5.** Desempeño del reactor LFI operado por 89 días más, a partir de los 21 días iniciales, con una relación acetato/lactato en base a DQO de 90/10. **A:** Eficiencia de remoción de DQO total (■), porcentaje de DQO utilizada por las BSR (□). **B:** pH afluente (-), pH efluente (◆), alcalinidad por bicarbonato (○), **C:** velocidad de producción de H<sub>2</sub>S (◇) y eficiencia de remoción de sulfato (●).

A los 76 días de operación del reactor (periodo IIIb), el pH en el afluente se disminuyó a 5.0. Después de este cambio de pH en la alimentación, la eficiencia de remoción de DQO se mantuvo en promedio alrededor de 88% y la eficiencia de remoción de sulfato disminuyó ligeramente a 47%, obteniendo en promedio una concentración de sulfuro de 198 mg/L (Tabla 5.4).

La alcalinidad por bicarbonato y el pH dentro del reactor se mantuvieron alrededor de 1008 mg CaCO<sub>3</sub>/L y 7.6, respectivamente. Durante el periodo IIIc el pH se disminuyó paulatinamente hasta un valor de 4.0, este cambio de pH afectó el desempeño de la biopelícula en términos de eficiencia de remoción de DQO, alcalinidad y sulfuro producidos (Fig. 5.5), por lo que las BSR necesitaron algunos días para adaptarse a las condiciones ácidas. El pH de la alimentación fue neutralizado por la alcalinidad producida por la oxidación de ambos sustratos orgánicos, aumentando el pH dentro del reactor hasta 7.0 al final de la operación (Fig. 5.5B). A partir del día 95 el sistema se estabilizó hasta alcanzar una eficiencia de remoción de DQO de 85%. La concentración de sulfuro producido en el sistema aumentó hasta 205 mg/L con una eficiencia de remoción de sulfato de 42%.

#### **5.4.4 Consumo de acetato en los periodos experimentales IIIa, b y c.**

En la Figura 5.6 se muestra el consumo de acetato en el reactor LFI durante 89 días de operación en continuo a partir de los 21 días iniciales. La velocidad de acetato consumido durante los periodos experimentales IIIa, IIIb y IIIc fue de 0.81, 0.78 y 0.83 g DQO/L-d, respectivamente. En los periodos IIIa y IIIb la cantidad de acetato alimentado más la generada por la oxidación incompleta del lactato se mantuvo alrededor de 0.96 g DQO/L-d. Sin embargo durante el periodo IIIc se observó un aumento en la cantidad de acetato de hasta 1.06 g DQO/L-d. El consumo de acetato vía sulfatorreducción durante el periodo IIIa se mantuvo alrededor de 75%, mientras que en los periodos IIIb y IIIc se observaron variaciones y un decremento en consumo de acetato, el valor promedio en cada periodo fue de 68 y 60%, respectivamente. El porcentaje se calculó a partir del acetato consumido.



**Figura 5.6** Desempeño del reactor LFI con respecto al consumo de acetato. El reactor se operó por 89 días más después de los 21 días iniciales con una relación de acetato:lactato (como DQO) de 90/10. Acetato en el afluente más el generado por la oxidación incompleta del lactato (○); acetato total consumido (◆) expresados como g DQO/L-d; porcentaje de acetato consumido vía sulfatorreducción (▲).

## 5.5 Discusión

### 5.5.1 Velocidad de sulfuro producido y acetato consumido

La concentración máxima de sulfuro (155 mg/L) después de 21 días de operación se obtuvo en el experimento III, en el cual la concentración de acetato representaba el 90% de la DQO alimentada, esto indicó el desarrollo de la biopelícula en un corto tiempo con una producción de sulfuro mayor a la reportada en otros estudios, en los cuales se requirieron tiempos más largos para obtener una concentración de sulfuro de alrededor de 100 mg/L. Por ejemplo, Celis-García *et al.* (2007) reportaron una concentración de sulfuro producido de 100 mg/L, a partir de los 50 días de operación de un reactor de lecho fluidificado inverso alimentado con ácidos grasos volátiles. En otro trabajo reportado por Celis *et al.* (2009) coinciden con esto ya que a los 65 días de operación en continuo en un reactor similar alimentado con etanol y lactato, solo obtuvieron una concentración de sulfuro de 69 mg/L. Por otra parte Sahinkaya *et al.* (2007a) reportaron que la máxima concentración de sulfuro alcanzada fue de 58 mg/L, en un reactor de lecho fluidificado alimentado con etanol, a los 321 días de operación en continuo. Mientras que McMahon y Daugulis (2008) demostraron

que con una relación en el inóculo de 95% de *Desulfovibrio desulfuricans* y 5% de un consorcio de BSR, obtienen una concentración de sulfuro alrededor de 317 mg/L en 8.3 días en un reactor de lecho empacado alimentado con lactato, sin embargo, observaron una acumulación de acetato en el efluente.

El incremento de la producción de sulfuro fue a la par con el aumento en la remoción de DQO. Al cabo de 21 días en los 3 experimentos la remoción de lactato fue de 100%, sin embargo solo en los experimentos II y III el lactato se consumió totalmente vía sulfatorreducción. Probablemente en el experimento I la mayor concentración de lactato favoreció el crecimiento de otras bacterias que consumen este sustrato pero que no son sulfatorreductoras. En los tres experimentos hubo consumo de acetato, dicho consumo se incrementó al aumentar la proporción de acetato en la alimentación. Sin embargo, solo en los experimentos II y III se consumió acetato por sulfatorreducción lo que indicó la importancia del sustrato con el que se desarrolle la biopelícula, al existir mayor concentración de acetato se favorece a las BSR de oxidación completa, en cambio las BSR de oxidación incompleta se encontraban limitadas por sustrato, lo que pudo limitar su desarrollo en la biopelícula. El aumento en el consumo de acetato redujo su acumulación en el sistema, lo que indicó la permanencia de las BSR que oxidan completamente el acetato dentro de la biopelícula. Contrario a lo reportado en el capítulo 4, en donde la acumulación de acetato fue de 1.4 g DQO/L-d, que representa la mitad de la carga de DQO alimentada como etanol, en donde las BSR de oxidación incompleta del sustrato predominaron en la biopelícula. Celis *et al.* (2009) reportan la acumulación de acetato (1g DQO/L-d) equivalente a la mitad de la DQO alimentada como etanol y lactato, en un reactor similar, ya que las BSR adheridas a la biopelícula eran del género *Desulfovibrio* (que oxidan incompletamente el sustrato). La acumulación de acetato también ha sido reportada por Nagpal *et al.*, (2000a); Kaksonen *et al.*, (2003) y Sahinkaya *et al.*, (2007a,b) bajo condiciones mesofílicas, termofílicas y psicofílicas.

### **5.5.2 Desempeño de la biopelícula**

Los resultados obtenidos en ensayos en lote con la biopelícula desarrollada en el experimento I, mostraron que la velocidad de producción de sulfuro con acetato fue menor que en los otros dos experimentos en donde existía un mayor porcentaje de acetato en la

alimentación, en cambio la velocidad de producción de sulfuro con lactato fue mayor comparada con la obtenida en los experimentos II y III. Esto indicó una pobre inmovilización de las BSR que oxidan completamente el acetato y una mayor participación de las BSR que usan lactato. En los experimentos II y III a pesar de que la relación acetato/lactato era muy similar (80/20 y 90/10), en el experimento III la velocidad de producción de sulfuro con acetato y la cantidad de sólidos inmovilizados en el soporte fue casi el doble que en el experimento II. Lo anterior puede estar relacionado con un enriquecimiento selectivo de BSR que oxidaban completamente el acetato en la biopelícula desarrollada a los 21 días en el experimento III. La diferencia en la cantidad de sólidos inmovilizados en el soporte pudo deberse a que en los experimentos I y III el lodo granular con el que se inoculó el reactor se disgregó previamente, permitiendo a los microorganismos tener mas contacto con el soporte y adherirse fácilmente. Mientras que en el experimento II el lodo se adicionó en forma de gránulo, el cual se fue disgregando poco a poco al pasar por la bomba de recirculación, lo que pudo propiciar un retardo en la colonización del soporte y en consecuencia se observó una menor cantidad de sólidos volátiles inmovilizados a los 21 días. En contraste se observó que en los experimentos en los que el lodo granular se disgregó (I y III) la cantidad de sólidos volátiles inmovilizados fue muy similar.

La mayor cantidad de sólidos inmovilizados se obtuvo con el experimento III (2.4 g SVI/L<sub>s</sub>) en un periodo corto de tiempo, 21 días. La cantidad de sólidos inmovilizados fue mayor en comparación con otros estudios realizados en un reactor similar y con el mismo soporte plástico, en los que reportan tiempos más largos para poder obtener una cantidad de sólidos inmovilizados similar a la reportada en este trabajo. Celis-García *et al.* (2008) reportan que después de 55 días la cantidad de sólidos volátiles adheridos al soporte fue de 2.5 g SVI/L<sub>s</sub>. En otro estudio se reporta una cantidad de sólidos inmovilizados de 0.8 g SVI/L<sub>s</sub> después de 33 días, dicha cantidad de sólidos se mantuvo constante después de 130 días de operación del reactor (Celis *et al.*, 2009). Cabe señalar que en ambos trabajos el reactor se operó en lote por más de 30 días antes de operarlo en continuo.

Muy probablemente la cantidad de sólidos inmovilizados en un corto tiempo (21 días), se favoreció por el tiempo de operación en lote que solo fue de 2 días y la operación en continuo con un TRH de 1 día. Ya que bajo estas condiciones los microorganismos en

suspensión se ven forzados a adherirse al soporte y los que se encuentran libres (microorganismos planctónicos) en el líquido del reactor son lavados (Cresson *et al.*, 2008). En otros estudios se reportan tiempos largos de operación en lote de semanas o meses, en los que la formación de la biopelícula es lenta debido a que el desarrollo de los microorganismos planctónicos se favorece al permanecer más tiempo dentro del sistema (Ye *et al.*, 2005; Sahinkaya *et al.*, 2007a; Celis-García *et al.*, 2008; Cresson *et al.*, 2008). Mientras que otros autores coinciden con nuestros resultados, McMahon y Daugulis (2008) reportaron una mayor colonización del soporte a un TRH de 8.3 min, utilizando BSR de un cultivo puro y mixto en un reactor de lecho empacado.

La concentración de acetato y lactato en la alimentación de cada experimento jugó un papel muy importante en la formación de la biopelícula, ya que cuando la cantidad de lactato fue igual a la de acetato (experimento I), el lactato se consumió preferentemente por las BSR, mientras que el acetato pudo consumirse o no por las BSR. Termodinámicamente, las BSR obtienen más energía libre de Gibbs de la degradación de lactato que de acetato (Tabla 5.1), además de que el lactato es el sustrato de mayor preferencia por las BSR y mayormente por las que oxidan incompletamente la materia orgánica (Nagpal *et al.*, 2000b; Kaksonen *et al.*, 2003), favoreciendo el desarrollo de las BSR de rápido crecimiento que oxidan el sustrato hasta acetato, con ello un aumento en la concentración de acetato en el sistema y el crecimiento de otras especies metabólicas que utilizan el acetato, que no necesariamente son sulfatorreductoras. En consecuencia, las BSR consumidoras de acetato tienen una menor posibilidad de adherirse al soporte.

Sin embargo el ensayo en lote con acetato (Fig. 5.3, experimento I) muestra la producción de sulfuro (0.6 mg H<sub>2</sub>S/L-h), debido a la existencia de BSR que oxidan el acetato (en una mínima cantidad). Lo que indica que tal vez en un tiempo más largo de operación del reactor, las BSR que utilizan el acetato podrían llegar a aumentar en número, lo que se reflejaría en una mayor velocidad de producción de sulfuro a partir de acetato. Por lo que entre mayor sea la concentración de acetato con respecto a la de lactato, se favorecerá el desarrollo de las BSR que oxidan completamente el sustrato, especialmente el acetato (experimentos II y III). Por otro lado, la adición de lactato durante la formación de la biopelícula es también de gran importancia, ya que la oxidación completa del lactato



contribuye a la capacidad buffer del sistema y a la producción de sulfuro, puesto que por cada mol de lactato se producen 1.5 moles de sulfuro de hidrógeno (ver Tabla 5.1).

A partir de los ensayos en lote, la máxima velocidad de producción de sulfuro fue de 2.9 mg H<sub>2</sub>S/L-h con acetato como sustrato con la biopelícula obtenida en el experimento III, este resultado indica la capacidad de inmovilización de las BSR que oxidan completamente el acetato en un soporte polimérico amorfo. La inmovilización de las BSR depende de las características del soporte, las condiciones hidrodinámicas del sistema y el tipo de sustrato, probablemente la combinación de estos factores dio como resultado una biopelícula que fue capaz de oxidar hasta 79% del acetato inicial por sulfatorreducción. McMahon y Daugulis (2008) demuestran la capacidad de inmovilización de las BSR sobre diferentes tipos de soportes y condiciones de operación en un reactor de lecho empacado. Otros autores reportan la capacidad de inmovilización de las BSR sobre un soporte plástico en forma de disco bajo condiciones microaerofilas (Ito *et al.*, 2002).

### **5.5.3 Desempeño del reactor LFI con reducción de pH (periodos IIIa-c)**

El mejor desempeño de la biopelícula en un periodo de 21 días fue el que se obtuvo en el experimento III, posteriormente esta biopelícula fue sometida a cambios de pH en la alimentación del reactor para evaluar la capacidad de las BSR de soportar valores de pH ácidos, en un sistema continuo.

El desempeño del reactor LFI en los periodos IIIa-IIIb corroboró que la sulfatorreducción continuó sin problemas a un pH de 5.0 en la alimentación. Obteniendo una eficiencia de remoción de sulfato alrededor de 50%, las correspondientes velocidades de remoción de sulfato fueron 1.2 (periodo IIIa) y 1.08 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d (periodo IIIb). Después del decremento en el pH (4.0) durante el periodo IIIc la velocidad de remoción de sulfato fue de 0.84 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d. Esta disminución estuvo asociada al decremento en la eficiencia de remoción de DQO y por lo tanto de acetato, al mantener el pH de la entrada constante en un valor de 4.0 se observó que los valores se mantuvieron constantes (Fig. 5.5).

Estos resultados indicaron que las BSR que oxidan completamente el acetato y que están adheridas en el soporte, son capaces de soportar valores de pH tan bajos como 4.0, ya que por cada mol de acetato se producen 2 moles de alcalinidad por bicarbonato (ver Tabla 5.1) neutralizando la acidez de la alimentación hasta un pH de 7.0, lo que en consecuencia

ayuda a mantener la capacidad buffer dentro del reactor. En el capítulo 4 se reporta la estabilidad de una biopelícula sulfatorreductora, en un reactor similar alimentado con etanol con un pH de 5.0 en el efluente, las velocidades de remoción del sulfato fueron alrededor de 0.99 y 1.2 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d. En otros trabajos se reporta la capacidad de una biopelícula sulfatorreductora de soportar pH menores de 4.0, debido a la alcalinidad producida por la oxidación del sustrato orgánico (Kaksonen *et al.*, 2003; Jong y Parry, 2006; Sahinkaya *et al.*, 2007b). Sin embargo en estos trabajos no se usó acetato como sustrato.

En este estudio a pesar de que la eficiencia de remoción del sulfato permaneció alrededor de 50%, la eficiencia de conversión de DQO alcanzó valores de hasta 80%. Las eficiencias de remoción de lactato y acetato vía sulfatorreducción fueron de 100% y alrededor de 68%, respectivamente (Fig. 5.6); el resto del acetato pudo consumirse por otro tipo de bacterias. Lens *et al.* (1998) reportaron que la oxidación del acetato hasta CO<sub>2</sub> en sistemas sulfatorreductores, se debe principalmente a la presencia de actividad metanogénica. Sin embargo, en el presente estudio la actividad metanogénica no fue detectada (datos no mostrados), lo que indicó que el consumo de acetato puede ser debido a la presencia de otros tipos de bacterias que son capaces de utilizar el acetato pero no el sulfato (Steed *et al.*, 2000). Sin embargo la presencia de otras especies metabólicas que oxidan el acetato a bicarbonato y CO<sub>2</sub>, favorecen la capacidad buffer del sistema, siempre y cuando no predominen sobre las BSR que oxidan el acetato.

Este trabajo es el primero en reportar una velocidad de consumo de acetato de hasta 0.9 g DQO/L-d, y una reducción de sulfato de 0.84 g SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L-d, estos valores obtenidos son mayores a lo reportado por otros autores. Steed *et al.* (2000) reportan una máxima velocidad de oxidación de acetato y reducción de sulfato de 0.23 y 0.3 g/L-d, respectivamente; en un reactor de filtro anaerobio de flujo ascendente alimentado con acetato durante 130 días. Otros estudios reportan una velocidad de oxidación de acetato de 0.48 g/L-d y una reducción de sulfato de 0.5 g/L-d, en un reactor de lecho fluidificado alimentado con acetato y operando a una temperatura de 65°C (Sahinkaya *et al.*, 2007a).

## 5.6 Conclusiones

En este trabajo se demostró la factibilidad de desarrollar una biopelícula capaz de oxidar completamente el sustrato orgánico a sulfuro y bicarbonato en un corto tiempo, debido a las condiciones de operación impuestas al reactor LFI durante 21 días tales como, la relación acetato/lactato, el tipo de inóculo, un tiempo corto de operación en lote y un TRH de 1 día fueron determinantes en el desarrollo de la biopelícula.

De los tres experimentos el más adecuado para degradar acetato fue el experimento III, con una relación acetato/lactato de 90/10 ya que las BSR que oxidan completamente el sustrato fueron favorecidas por la alta concentración de acetato desde el inicio, y la baja concentración de lactato que de alguna forma limitó el desarrollo de las BSR que oxidan incompletamente el sustrato.

En el presente estudio el reactor LFI se operó en continuo a valores de pH en la alimentación de 4.0 y no se observó ningún efecto inhibitorio sobre las BSR tal como lo demostró el desempeño del reactor, puesto que existe la suficiente alcalinidad producida por el sistema. Finalmente se puede concluir que el reactor LFI tiene una potencial aplicación para el tratamiento de corrientes líquidas con pH tan bajo como 4.0.

Aún cuando fue posible el desarrollar una biopelícula de oxidación completa del sustrato, es importante realizar en estudios posteriores la caracterización del inóculo mediante análisis molecular para determinar las diferentes comunidades microbianas existentes, y poder establecer las condiciones de operación del reactor para enriquecer a la comunidad que sea de nuestro interés. Además realizar diversas pruebas con diferentes concentraciones de carga orgánica, para incrementar la remoción del sulfato y producir una mayor concentración de sulfuro y alcalinidad en el sistema. Esto con el fin de tratar aguas residuales con un alto contenido de sulfatos y pH ácidos, y su posible aplicación en la precipitación de metales como sulfuros metálicos.

## 5.7 Referencias bibliográficas

- Celis L.B., Villa-Gómez .D., Alpuche-Solís A., Ortega-Morales 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., González-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., Ramirez F., Revah S., Razo-Fores E., Monroy O. (2004). Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter influence of microbial immobilization type. *Environ Technol.* **25**, 1265-1275.
- Celis-García L.B., Razo-Flores E., Monroy O. (2007). Performance of a downflow fluidized bed reactor under sulfate reducing conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol Bioeng.* **97**, 771-779.
- Cresson R., Escudié R., Steyer J.P., Delgenes J.P., Bernet N. (2008). Competition between planktonic and fixed microorganisms during the start-up of methanogenic biofilm reactors. *Water Res.* **42**, 792-800.
- Ingvorsen K.J.G., Zehnder A.J.B., Jorgensen B.B. (1984). Kinetics of sulphate and acetate uptake by *Desulfobacter posgatei*. *Environ Microbiol.* **47**, 403-408.
- Ito T., Okabe S., Satoh H., Watanabe Y. (2002). Successional development of sulphate-reducing bacteria populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 1392-1402.
- Jong T, Parry D.L. (2006). Microbial sulphate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Water Res.* **40**, 2561-2571.
- Kaksonen A.H., Puhakka J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Eng Life Sci.* **7**, 541-564.
- Kaksonen H., Franzmann P., Puhakka J. (2004a). Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **88**, 332-343.
- Kaksonen H., Plumb J., Franzmann D. y Puhakka J. (2004b). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 279-289.
- Kaksonen H., Riekkola-Vanhanen., Puhakka J. (2003). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Res.* **37**, 255-266.
- Lens P.N.L., Visser A.J.H., Janssen L.W., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters, *Crit Rev Environ Sci Technol.* **28**, 41-88.
- Lien T., Beeder J. (1997). *Desulfobacter vibrioformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. *Int J Syst Bacteriol.* **47**, 1124-1128.
- Mathews K.C., Van Holde K.E. (2000). Bioquímica. Segunda edición. Oregon State University. *McGraw-Hill* pp. 534-545.
- McCartney D.M., Oleszkiewicz J.A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res.* **25**, 203-209.
- McMahon J.L., Daugulis J.A. (2008). Enhancement of biogenic sulfide production in a packed-bed bioreactor via critical inoculum design and carrier material selection. *Biotechnol Bioeng.* **100**, 855-863.
- Michaud S., Bernet N., Buffiere P., Delgenes J.P. (2005). Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilm. *Proc. Biochem.* **40**, 2751-2755.
- Nagpal S., Chuichulcherm S., Livingston A., Peeva L. (2000a). Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **70**, 533-543.
- Nagpal S., Chuichulcherm S., Peeva L., Livingston A. (2000b). Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: An experimental and modeling study. *Biotechnol Bioeng.* **70**, 534-543.
- 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., T. Hansen., Widdel F. (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H y Stackebrandt E. (ed) *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology and biochemistry*. Springer-Verlag, New York. pp. 659-768.
- Sahinkaya E., Ozkaya B., Kaksonen HA., Puhakka J.A. (2007a). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at 8 and 65°C temperatures is limited by acetate oxidation. *Water Res.* **41**, 2706-2714.
- Sahinkaya E., Ozkaya B., Kaksonen HA., Puhakka J.A. (2007b). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. *Biotechnol Bioeng.* **96**, 1064-1072.
- Steed VS, Suidan MT, Gupta M, Miyahara T, Acheson CM, Sayles GD. (2000). Development of a sulfate-reducing biological process to remove heavy metals from acid mine drainage. *Water Environ Res.* **72**, 530-5.
- Thauer R.K., Möller-Zinkhan D., Spormann A.M. (1989). Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **43**, 43-67.

- Widdel, F (1981). Studies of dissimilatory sulphate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of sulphate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter posgatei* gen. nov. and sp nov. *Arch Microbiol.* **129**, 395-400.
- 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.
- Ye F.X., Chen Y.X., Feng X.S. (2005). Advanced start-up of anaerobic attached film expanded bed reactor by pre-aeration of biofilm carrier. *Biores Technol.* **96**, 115-119.

## Capítulo 6. Conclusiones generales y perspectivas

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la aplicación de procesos biológicos de sulfatorreducción en reactores de biopelícula, específicamente de lecho fluidificado inverso, para la precipitación y recuperación de sulfuros metálicos en una sola etapa. Lo anterior con el fin de tratar efluentes ácidos ricos en metales y recuperarlos separados de la biomasa; a la fecha esto solo es posible en sistemas de dos etapas. Para tal efecto, se trabajó en primera instancia en el desarrollo de biomasa sulfatorreductora a partir de lodo granular metanogénico en un reactor UASB.

El desempeño del reactor UASB indicó que las condiciones impuestas al sistema como es la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  y el sustrato permitieron establecer condiciones sulfatorreductoras, como lo demostró la producción de sulfuro que alcanzó valores de hasta 320 mg/L. El sistema se mantuvo estable ya que las eficiencias de remoción de DQO al final de la operación del reactor se mantuvieron por arriba de un 90%.

Las pruebas de actividad sulfatorreductora al final de la operación del reactor, demostraron que es factible utilizar diferentes sustratos para llevar a cabo el desarrollo de BSR, lo anterior debido a que en un lodo granular existen diversos grupos bacterianos afines a diferentes sustratos. Sin embargo, las pruebas de actividad metanogénica demostraron la presencia de organismos metanogénicos después de más de 240 días de operación bajo condiciones sulfatorreductoras, lo cual puede atribuirse a que parte de las BSR que están presentes en el lodo granular solo oxidan incompletamente el sustrato orgánico hasta acetato y a la presencia de otro tipo de especies metabólicas (acetogénicas). Debido a esto los organismos metanogénicos no estuvieron limitados por sustrato (acetato), permaneciendo en el lodo granular hasta el final de la operación del reactor consumiendo el 70% de la materia orgánica.

A partir de los estudios realizados se puede concluir que es posible el desarrollo de biomasa sulfatorreductora a partir de biomasa metanogénica en un reactor UASB. Sin embargo, se necesitan largos tiempos de operación del reactor para que las BSR puedan desplazar completamente a los organismos metanogénicos y acetogénicos, convirtiéndose en la especie predominante.

De los resultados obtenidos del desempeño del reactor LFI operado en continuo podemos decir que la precipitación de metales y su recuperación en forma de sulfuros metálicos a partir de un agua sintética con metales en solución (Fe, Zn y Cd), fue posible por el sulfuro biogénico producido por la biopelícula sulfatorreductora alcanzando una concentración de 250 mg/L antes de adicionar los metales. La eficiencia de precipitación de cada uno de los metales fue alrededor de 99% y la recuperación de metales como sulfuros metálicos fue de 90%. La configuración del reactor LFI fue un factor importante para la formación y recuperación de los sulfuros metálicos en una sola etapa, ya que la biopelícula flota en la parte superior del reactor y los sulfuros metálicos precipitados fueron recuperados fácilmente del fondo del reactor y separados de la biomasa. No obstante, las condiciones impuestas al sistema tales como la hidrodinámica, carga orgánica, el tipo de inoculo y el sustrato orgánico, favorecieron el desarrollo y estabilidad de una biopelícula sulfatorreductora que oxidaba incompletamente el sustrato hasta acetato.

El estudio desarrollado con el reactor LFI demostró que a pesar del pH bajo dentro del reactor (cerca a 5.0) y a la ausencia de alcalinidad, la sulfatorreducción procedió satisfactoriamente ya que no se presentó ningún cambio en la remoción de DQO ni en la velocidad de reducción del sulfato de la biopelícula, cuyos valores obtenidos fueron de 55% y 41%, respectivamente. Este trabajo es el primer reporte de sulfato reducción y precipitación de metales a pH tan bajos como 5.0 usando un consorcio bacteriano no acidofílico. Sin embargo, la acumulación de acetato en el sistema puede incrementar la acidez y disminuir el pH dentro del reactor, por lo que es esencial una oxidación completa del sustrato orgánico por las BSR y la neutralización del agua producida por la alcalinidad, sobre todo si el pH del agua residual es menor a 5.0.

Finalmente los resultados obtenidos de la producción de sulfuro e inmovilización de la biomasa durante la formación de una biopelícula alcanzaron valores de 155 mg/L y 2.4 g SVI/L<sub>s</sub> respectivamente, a los 21 días de operación del reactor. Otros autores reportan una cantidad similar de sólidos inmovilizados y producción de sulfuro en un periodo de tiempo más largo (Celis *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en los ensayos de la actividad sulfatorreductora con acetato a una relación 90/10 (en base a DQO) mostraron mayor velocidad de producción de sulfuro con acetato que con lactato, ya que al haber una mayor cantidad de acetato presente en el

sistema, la presión de selección por sustrato permitió el establecimiento en la biopelícula de BSR que utilizan el acetato. Por lo que podemos decir que fue posible el desarrollo de una biopelícula sulfatorreductora capaz de oxidar completamente el sustrato orgánico hasta CO<sub>2</sub>, con la consecuente producción de alcalinidad en un reactor LFI en un tiempo de arranque corto.

La presión de selección impuesta por la relación acetato/lactato en la alimentación, así como los cortos tiempos de operación en lote del reactor, el TRH y la velocidad descendente, permitieron el desarrollo de una biopelícula sulfatorreductora madura capaz de oxidar completamente los sustratos.

Los resultados obtenidos durante los 89 días de operación del reactor en continuo, indicaron un comportamiento estable al alcanzar eficiencias de remoción de DQO alrededor de 80% y valores de pH de 7.0 en el efluente.

Los valores de acetato total consumido durante la operación del reactor fueron alrededor de 80%, del cual un 60% fue por vía sulfatorreducción lo que indicó la inmovilización de BSR que oxidan completamente el sustrato a CO<sub>2</sub> demostrando la eficiencia del proceso. Este trabajo es el primero en obtener una oxidación del sustrato por arriba de lo reportado en otros estudios en reactores de bioelícula utilizando acetato como sustrato (Steed *et al.* 2000; Sahinkaya *et al.*, 2007). Por lo que la oxidación completa del sustrato juega un papel muy importante ya que permitió la producción de alcalinidad, neutralizando la acidez dentro del reactor. La estabilidad del reactor LFI al operar a pH de 4.0 indica la robustez del sistema, haciendo factible la aplicación del reactor LFI para el tratamiento de aguas con pH ácidos.

En conclusión el proceso de sulfatorreducción en un reactor LFI con una biopelícula capaz de producir sulfuro y alcalinidad tiene importantes implicaciones tecnológicas ya que es una alternativa prometedora en el tratamiento de efluentes ácidos contaminados con metales, los cuales pueden ser recuperados en forma de sulfuros metálicos y separados de la biomasa en procesos de una sola etapa.

A manera de recomendaciones se propone estudiar más a fondo la configuración del reactor LFI con el fin de aumentar la recuperación de los sulfuros metálicos en el fondo del reactor sin la presencia del equalizador. De la misma forma, es necesario conocer los límites del reactor sobre todo en lo que se refiere a cargas orgánicas volumétricas, carga de



metales, TRH mínimos, etc., sobre todo si se quiere aplicar el sistema al tratamiento de drenados ácidos de minas.

Los resultados sugieren que TRH cortos durante el arranque son adecuados para el rápido desarrollo de una biopelícula, por lo que es necesario determinar el TRH mínimo para desarrollar una biopelícula estable en un menor tiempo. Es deseable complementar estos estudios con la caracterización por técnicas de ecología microbiana de las biopelículas para determinar las diferentes comunidades microbianas presentes y entender los mecanismos que permitan el desarrollo de biopelículas de interés específico.

Como perspectiva de este trabajo es el utilizar una biopelícula de oxidación completa del sustrato desarrollada bajo las mejores condiciones en base al sustrato orgánico. El pH en el afluente del reactor se disminuirá a valores de alrededor de 3.0 -2.0, y a la par se aplicaran cargas incrementales de materia orgánica para aumentar la producción de sulfuro. Bajo estas condiciones se pretende tratar un efluente con un pH ácido, altas concentraciones de sulfato y metales pesados disueltos, como es el caso de los drenados ácidos de mina (DAM).

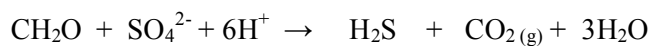
Otras de las perspectivas de este trabajo es el determinar la distribución de especies metálicas en función del pH del reactor para maximizar la recuperación selectiva de metales de interés industrial (industria electrónica, metal mecánica, etc.) como es el caso del Cu, Zn y Fe entre otros.

## 6.1 Referencias bibliográficas

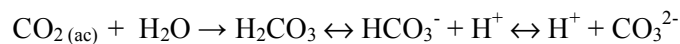
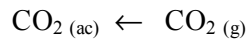
- Celis L.B., Villa-Gómez .D., Alpuche-Solís A., Ortega-Morales O., Razo-Flores E. (2009). Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **36**, 111-121.
- Sahinkaya E., Ozkaya B., Kaksonen HA., Puhakka J.A. (2007a). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at 8 and 65°C temperatures is limited by acetate oxidation. *Water Res.* **41**, 2706-2714.
- Steed VS, Suidan MT, Gupta M, Miyahara T, Acheson CM, Sayles GD. (2000). Development of a sulfate-reducing biological process to remove heavy metals from acid mine drainage. *Water Environ Res.* **72**, 530-5.

## ANEXO 1

La reacción estequiométrica de la degradación de la materia orgánica produce  $\text{CO}_2$  gaseoso, el cual al estar en un sistema cerrado el  $\text{CO}_2$  (g) es disuelto en el medio produciendo ácido carbónico. El ácido carbónico reacciona junto con los cationes del medio formando bicarbonato como se presenta en las siguientes ecuaciones.

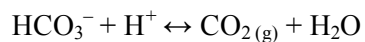


Donde  $\text{CH}_2\text{O}$  = Materia orgánica (donador de electrones)



Donde  $\text{Me}^{2+}$  = Cationes del medio como  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Na}^+$

Si la cantidad de  $\text{H}^+$  esta en exceso en el medio el equilibrio se favorecerá hacia la formación de  $\text{CO}_2$  (g) con la consecuente ausencia de alcalinidad. Sin embargo si existe la cantidad suficiente de cationes en el medio el equilibrio se desplazara hacia la formación de bicarbonatos.

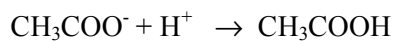


## ANEXO 2

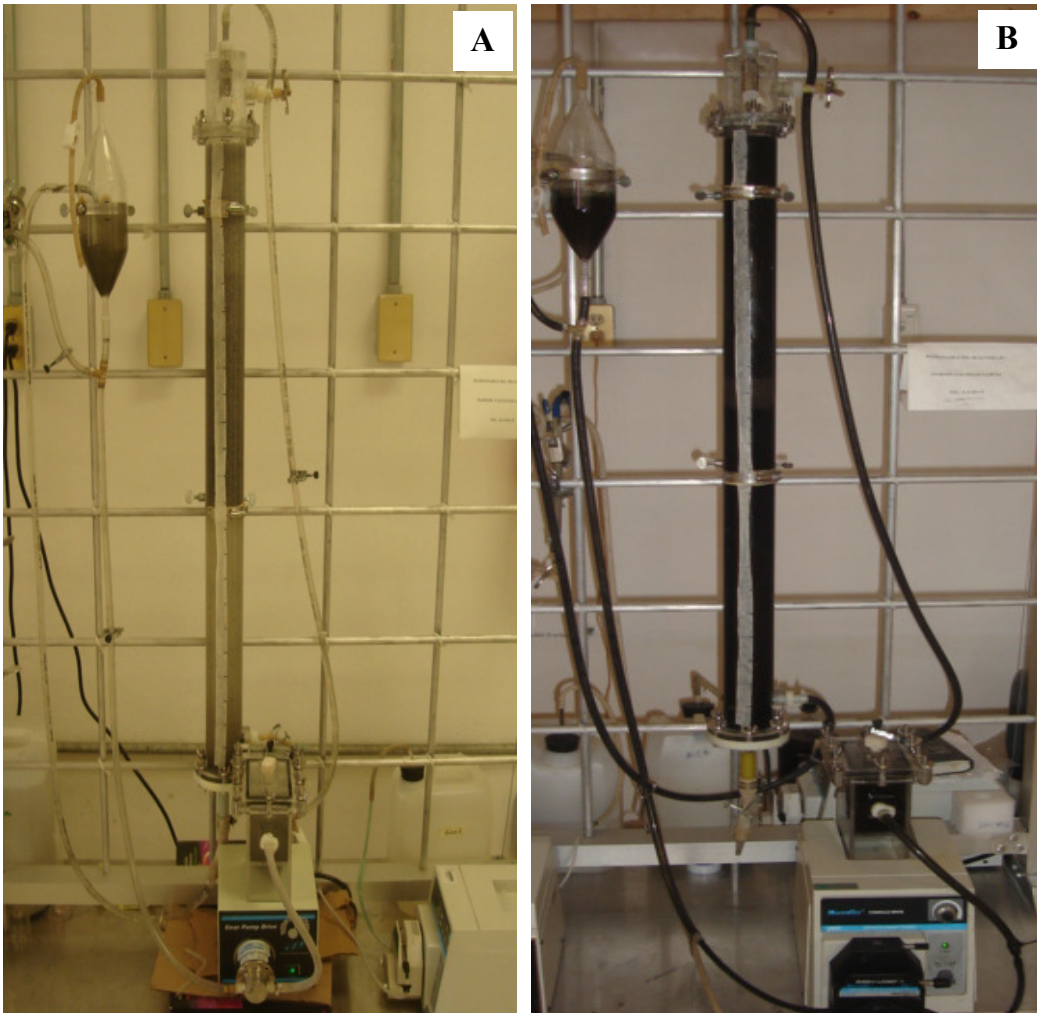
La oxidación incompleta del sustrato orgánico por las BSR genera acetato. Una solución que contiene ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) y acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) con un  $\text{pK}_a = 4.8$  resiste un cambio de pH desde 3.8 a 5.8 con una capacidad de amortiguamiento a un  $\text{pH} = 4.8$ . A un valor de pH menor que el  $\text{pK}_a$ , la forma ácida protonada ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) es la especie predominante. A valores de pH mayores que el  $\text{pK}_a$  la forma desprotonada ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) es la especie predominante en la solución. Sin embargo la acumulación del acetato en el medio puede formar el ácido acético el cual va a cambiar el pH haciéndolo más ácido.



Donde  $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- = \text{Lactato}$

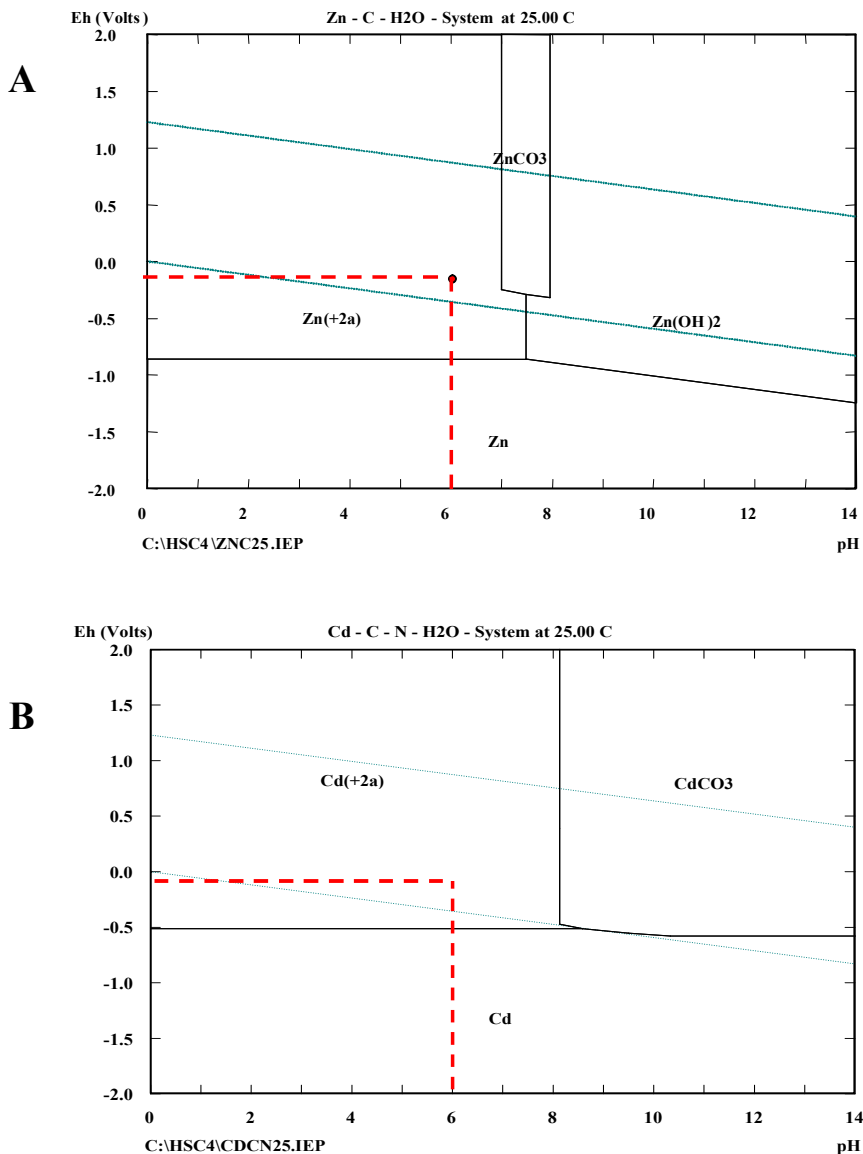


### ANEXO 3

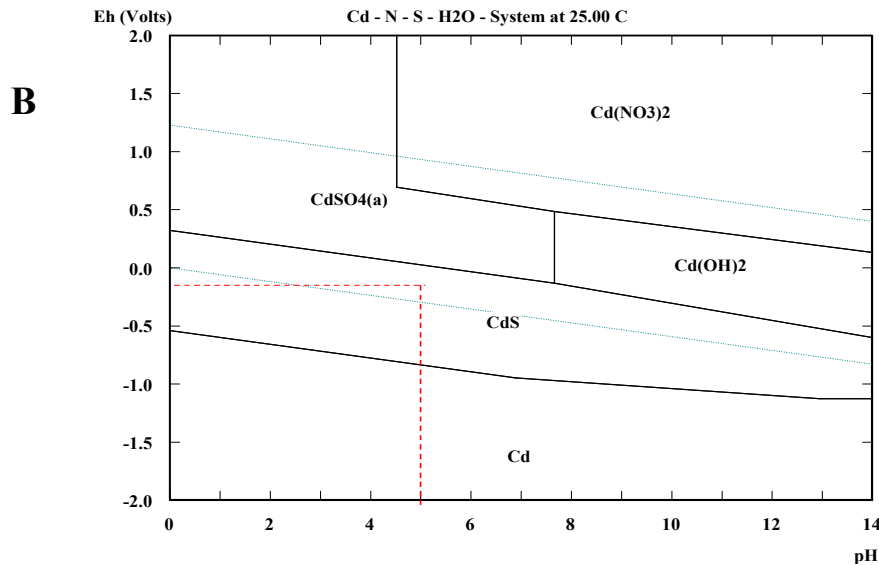
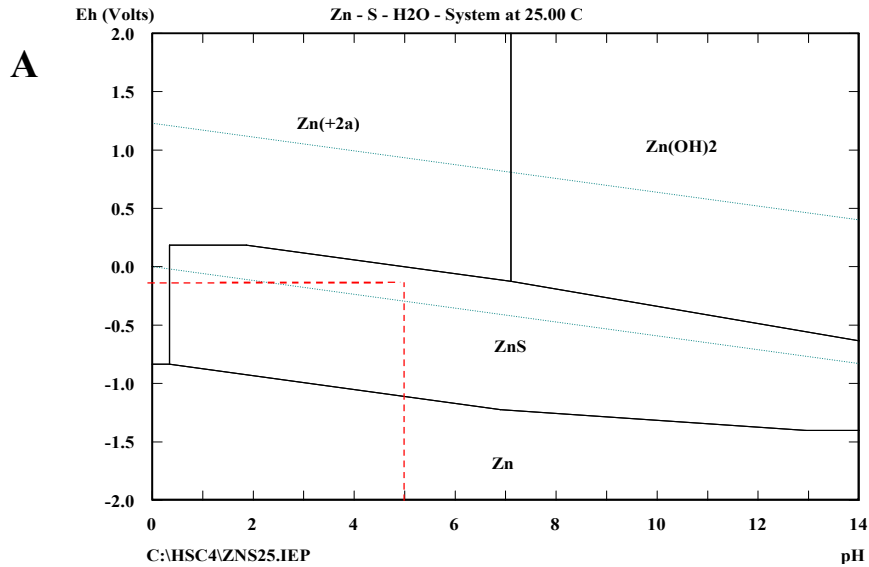


**Figura A.1.1.** Fotografía del aspecto visual del reactor de lecho fluidificado inverso (LFI).  
**A:** antes de la adición de metales; **B:** después de la adición de metales.

## ANEXO 4



**Figura A.2.1** Diagrama de Pourbaix (Eh vs. pH). **A:** para el sistema Zn-C-H<sub>2</sub>O. Las fases sólidas son Zn (OH)<sub>2</sub>, ZnCO<sub>3</sub> y Zn(S); CT=3.8x10<sup>-6</sup> M, la concentración de Zn (II) = 3.46x10<sup>-3</sup> M. **B:** sistema Cd-N-C-H<sub>2</sub>O. Las fases sólidas son CdCO<sub>3</sub>, y CdS; CT=3.8x10<sup>-6</sup> M, la concentración de Cd (II) = 1.78x10<sup>-4</sup> M, a un pH = 6.0 y un Eh= -0.25 Volts, las líneas punteadas representan el pH y Eh a las condiciones del medio de alimentación del reactor LFI. Diagramas construidos con la ayuda del software HSC Chemistry 4.1 (Outokumpu, Research Oy, Finlandia).



**Figura A.2.2** Diagrama de Pourbaix (Eh vs. pH). **A:** para el sistema Zn-S-H<sub>2</sub>O. Las fases solidas son ZnS y Zn(OH)<sub>2</sub>. La concentración de sulfuro fue de  $7.2 \times 10^{-3} \text{M}$  y la concentración de Zn (II) =  $3.46 \times 10^{-3} \text{M}$  (25°C). **B:** sistema Cd-S-N-H<sub>2</sub>O. Las fases solidas son CdS y Cd(OH)<sub>2</sub>. La concentración de sulfuro fue de  $7.2 \times 10^{-3} \text{M}$  y la concentración de Cd (II) =  $1.78 \times 10^{-4} \text{M}$  (25°C), a un pH = 5.0 y un Eh = -0.25 y - 0.30 Volts, las líneas punteadas representan el pH y Eh dentro del reactor LFI. Diagramas construidos con la ayuda del software HSC Chemistry 4.1 (Outokumpu, Research Oy, Finlandia).

## Curriculum Vitae

Marisol Gallegos García, nació en San Luis Potosí, México el 11 de mayo de 1978. Ella recibió el grado de Licenciado en Química en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en la Facultad de Ciencias Químicas en el 2000. El grado de Maestría en Ciencias en Ingeniería de Minerales fue obtenido en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en la Facultad de Ingeniería en el 2004. El tema de su tesis fue la estabilización física y química de los residuos ácidos de la Refinería Electrolítica de Zinc en San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Marcos G. Monroy Fernández.

A partir de agosto del 2005, la autora inició sus estudios doctorado en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica en la División de Ciencias Ambientales bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores y la Co-dirección de la Dra. Ma de Lourdes Berenice Celis García.

En febrero del 2009 la autora iniciara una estancia posdoctoral en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica en la División de Ciencias Ambientales bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores.

E-mail: [mgg@ipicyt.edu.mx](mailto:mgg@ipicyt.edu.mx)  
Instituto Potosino de Investigación Científica  
Camino a la presa San José 2055.  
Col. Lomas 4 sección C.P. 781216  
San Luis Potosí, S.L.P., México

## Lista de Publicaciones

- Marisol Gallegos-García, Lourdes B. Celis, René Rangel-Méndez, Elías Razo-Flores (2009). Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acidic wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **102**, 91-99.
- Marisol Gallegos-García, Lourdes B. Celis, René, Elías Razo-Flores. (2008) "Competencia por sustrato durante el desarrollo de Biomasa sulfato reductora a partir de un lodo metanogenico en un reactor UASB". **Sometido**, a la *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*.
- Marisol Gallegos-García, Lourdes B. Celis, Elías Razo-Flores. "Formación de una biopelícula sulfato reductora de oxidación completa del sustrato para el tratamiento de un efluente sintético con sulfato. **En preparación**