



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN  
INGENIERIA**

**INSTITUTO DE INGENIERÍA**

**Eliminación de sulfatos en un reactor de lecho móvil  
anaerobio-aerobio.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INGENIERIA**

**ING. AMBIENTAL - AGUA**

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

**I.B.I Gastón Martínez de Jesús**

TUTOR:

**Dr. Germán Buitrón Méndez**

2008



Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de proyecto 46093 Y

Se agradece especialmente la colaboración y apoyo técnico de la M. en C. Gloria Moreno Rodríguez y el Maestro en Biotecnología Jaime Pérez Trevilla.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado oportunidad de existir.

A mi familia:

Por toda la felicidad que compartimos, por siempre estar cuando los he necesitado y sobre todo por la confianza que siempre me han tenido.

A todos los nuevos amigos:

Jaime (mi compadre), Nancy, Marianita, Diane, Karito, Dafne, Mónica, Claudia, Selene, Alfredo, Torner, Prato, Rodrigo, Pancho, Toño Bahena, Toño Gómez, Juan Luis, Gloria y James Bond, y a todos aquellos que me faltó enlistar, por todos los momentos de compañía, alegría y enseñanza que compartimos. "Por que la amistad es de los valores más importantes".

A mis angelitos, por su compañía, apoyo y cuidado.

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
RESUMEN .....	iv
NOMENCLATURA .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	4
ANTECEDENTES .....	4
1.1 Transformaciones del azufre .....	4
1.2 Reducción biológica de sulfato .....	10
1.3 Eliminación de sulfuro: métodos fisicoquímicos y Oxidación biológica .....	13
1.3.1 Métodos fisicoquímicos .....	13
1.3.2 Oxidación biológica .....	13
1.4 Sulfato reducción-sulfoxidación .....	17
1.5 Potencial redox .....	18
1.6 Reactores SBR .....	22
1.7 SBR con biopelícula y de lecho móvil .....	23
1.8 HIPÓTESIS .....	28
1.9 OBJETIVOS .....	28
CAPÍTULO 2.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
2.1 Materiales .....	29
2.1.1 Reactor piloto y empaque .....	29
2.1.2 Fuente de inóculo .....	30
2.1.3 Medio de cultivo .....	31
2.2 Metodología .....	32
2.2.1 Estrategia experimental .....	32
2.2.2 Proceso sulfato reductor (primera etapa) .....	32
2.2.3 Proceso sulfato reductor-sulfoxidante y colonización del empaque (segunda etapa) .....	33
2.2.4 Proceso sulfato reductor-sulfoxidante solo con biomasa fija (tercera etapa) .....	35
2.2.5 Respirometría y actividad sulfoxidante .....	36
2.2.6 Métodos analíticos .....	37
CAPÍTULO 3 .....	40
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	40
3.1 Proceso sulfato reductor .....	40
3.1.1 Efecto de la relación DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .....	40
3.2 Sulfato reducción-sulfoxidación .....	45
3.2.1 Desarrollo de la comunidad mixta de microorganismos y colonización del empaque .....	45
3.2.2 Reactor sólo con biomasa fija .....	56
CAPÍTULO 4 .....	62
CONCLUSIONES .....	62
Recomendaciones .....	63
REFERENCIAS .....	64
PUBLICACIONES .....	69

## RESUMEN

Muchas industrias como la papelera, química, farmacéutica, minera y algunas procesadoras de alimentos generan aguas residuales con un alto contenido de sulfato, mismos que si no son tratados de manera adecuada generaran muchos problemas ambientales.

El principal problema asociado a los efluentes contaminados con sulfato ocurre cuando estos se encuentran en condiciones anaerobias, lo cual provoca la generación de ácido sulfhídrico, un contaminante con olor muy desagradable, tóxico y corrosivo

Una alternativa para tratar estos efluentes es la conversión del sulfato a azufre elemental mediante la intervención de microorganismos. Para lograr esta transformación se lleva a cabo primero un proceso de sulfato reducción que lleva a la generación de ácido sulfhídrico, posteriormente, este compuesto puede ser oxidado parcialmente a azufre elemental. Estas dos reacciones son realizadas por dos grupos de bacterias, la primera es realizada por bacterias sulfato reductoras que son heterótrofas anaerobias, mientras que la segunda es realizada por bacterias sulfoxidantes, las cuales son quimioautótrofas aerobias.

En este trabajo se plantea la utilización de un reactor de lecho móvil secuencial, el cual fue empacado con un material plástico, en el que se desarrolló una biopelícula capaz de producir azufre elemental.

En la primera etapa del trabajo se estudiaron condiciones que favorecieron el proceso sulfato reductor con biomasa suspendida, encontrándose que una relación inicial DQO/Sulfato igual a 2 fue favorable para el proceso. En la segunda etapa, se procedió a la aclimatación de lodos que desarrollaron una comunidad mixta de bacterias sulfato reductoras y sulfoxidante, lo cual fue logrado por la aeración constante del sistema a un flujo de 25 ml/(min·L) ( $vvm=0.014$ ), de manera simultánea este grupo de bacterias formó una biopelícula activa en el soporte plástico, se comprobó que la biomasa en suspensión y la que formó la biopelícula tenían actividad sulfato reductora y sulfoxidante, y el sistema fue capaz de producir azufre elemental. En la tercera parte el reactor operó sólo con el empaque ya colonizado por los dos grupos de bacterias, en el cual también se comprobó su capacidad para producir azufre elemental.

## ABSTRACT

Many industries as paper, chemical, pharmaceutical, mining and some food processing generate wastewater with high content of sulfate, if they are not treated adequately cause many environmental problems.

The main problem associated with contaminated effluent sulfate occurs when these are in anaerobic conditions, causing the generation of hydrogen sulfide and this is undesirable because of its smell, its toxicity and its corrosive properties.

An alternative for treating these effluents is the conversion of sulfate to elemental sulphur with the intervention of microorganisms. To achieve this transformation the first process is sulfate reduction leading to the generation of hydrogen sulfide, this compound may be partially oxidized to elemental sulphur. These two reactions are carried out by two groups of bacteria, the first is carried out by sulfate-reducing bacteria microorganisms anaerobic heterotrophic, while the second is done by sulfoxidizing bacteria, which are aerobic chemolithoautotrophic.

This work employed a Sequential Batch Reactor packed with a plastic material, which developed a biofilm that produced elemental sulphur.

In the first phase of the work the favorable conditions to the process of sulfate reduction was looked for and an initial ratio COD/sulfate equal to 2 was the best condition. In the second stage, the sludge developed a mixed community of sulfate-reducing bacteria and sulfoxidizing, which was achieved by the aeration system to a constant flow of 25 mL/(min·L) ( $v_{vm} = 0.014$ ). Simultaneously this group of bacteria formed an active biofilm in the plastic material. It was found that the suspended biomass and the biofilm had sulfate-reducing and sulfoxidizing activities, and the system was capable of producing elemental sulphur. In the last experimental stage the reactor was only operated with the colonized packed by the two groups of bacteria, which also produced elemental sulphur.

## INTRODUCCIÓN

En la naturaleza pueden distinguirse tres tipos de almacenamiento de azufre: yeso ( $\text{CaSO}_4$ ), metales de sulfuro y azufre elemental ( $\text{S}^0$ ). Los cuales se encuentran en continua transformación de acuerdo al ciclo del azufre. Sin embargo el incremento de la actividad antropogénica ha alterado de manera local el balance del ciclo provocando que compuestos de azufre sean descargados en agua y aire principalmente, generando problemas de contaminación.

Los efluentes líquidos con altas concentración de sulfato se pueden encontrar en drenajes ácidos de minas y otras industrias químicas donde el ácido sulfúrico es usado en el proceso. Un efluente de las actividades mineras llega a tener 1980 mg/L de sulfato y DQO baja de 100 mg/L (Maree y Strydon 1985). Por otro lado, altas concentraciones tanto de sulfato como de materia orgánica se pueden encontrar en efluentes generados por industrias agrícolas, procesadoras de alimentos y papeleras (tabla 1.1). En condiciones anaerobias el sulfato presente en estos efluentes generará sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

El sulfuro de hidrógeno es un gas incoloro, inflamable y venenoso con un fuerte olor a huevo podrido. Puede ser percibido a concentraciones entre 0.01-0.3 partes por millón (ppm). Sin embargo, a concentraciones mayores a 100-200 ppm anula el sentido del olfato en pocos minutos, entre 200-500 ppm causa irritaciones variadas en el organismo o pérdida de la conciencia, entre 500-1000 ppm puede provocar paros respiratorios y muerte (Buisman *et al.* 1991). Cuando el  $\text{H}_2\text{S}$  se encuentra en forma gaseosa puede causar corrosión en los calentadores y motores de combustión interna. Cuando se encuentra disuelto en un efluente puede corroer paredes de concreto, sistemas de drenaje y tuberías de acero.

**Tabla 1.1** Concentración de sulfatos en diferentes efluentes industriales (Celis, 2004; Polanco y García, 2006)

Tipo de industria	Compuestos de azufre (g/L)		pH	DQO (g/L)
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> S		
Pulpa y papel, proceso químico-termomecánico	1.2-1.5	0.05-0.20	7-9	7.5-10.4
Pulpa y papel, proceso termomecánico	0.2-0.7	-	-	2-5
Viscosa y rayón (agua residual)	3	-	2-3	1-2
Planta de celofán y rayón	-	0-1	-	-
Fermentación (ácido cítrico)	2.5-4.5	-	-	30
Fermentación de melaza	2.5-3.45	-	-	44.8-55.6
Aceite comestible	10-50	-	2-3	2-6
Procesadora de mariscos	2.1-2.7	-	-	12.4-16.9
Tenería	1.2-2.0	0.15-0.3	8.6	4.8-8.0
Producción de TNT (trinitrotolueno)	51.4	-	7.6	68.5
Refinería (sosas gastadas)	20.3	48.5	13	320
Plantas farmacéuticas	14.8	-	-	28.5

En el caso de aguas contaminadas con compuestos carbonados y nitrogenados, se busca la eliminación de los mismos mediante su conversión a gases como el CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> respectivamente, el segundo de ellos, con impacto ambiental casi nulo (el CO<sub>2</sub> está involucrado en el fenómeno del calentamiento global). Sin embargo, la eliminación de compuestos azufrados por medio de sus formas gaseosas no es recomendable, dada la toxicidad y problemática mencionadas anteriormente.

Con la aplicación de tecnologías ambientales basadas en el ciclo natural del azufre se busca la formación de intermediarios insolubles, CaSO<sub>4</sub>, sulfuros metálicos y S<sup>0</sup>, los cuales, además, pueden ser utilizados como materias primas para otros procesos, como la manufactura de ácido sulfúrico, la fabricación de pólvora, el

vulcanizado del caucho, como fungicida y en la manufactura de fertilizantes, el azufre elemental puede emplearse como sustrato de bacterias sulfato reductoras convirtiéndose nuevamente en  $H_2S$ , para la remediación de suelos contaminados con metales pesados.

# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1 Transformaciones del azufre

Los compuestos inorgánicos de azufre más comunes son sulfuro, polisulfuros, tiosulfato, politionatos, azufre elemental, bisulfito, y sulfato, los cuales aparecen en ambientes naturales. Compuestos de azufre con estados de oxidación intermedios pueden servir como aceptores o donadores de electrones en procesos redox. En contraste, el sulfuro ya no puede ser reducido y el sulfato ya no puede oxidado, por lo que son los productos finales de muchas vías de reducción u oxidación de compuestos de azufre. Los estados de oxidación de los compuestos azufrados más relevantes se muestran en la [tabla 1.2](#).

**Tabla 1.2** Estados de oxidación de los compuestos de azufre más relevantes. (Brüser *et al.*, 2000).

Compuesto	Estado de oxidación
S orgánico (R-SH)	-2
Sulfuro (H <sub>2</sub> S)	-2
Polisulfuros ( <sup>-</sup> S(S) <sub>n</sub> S <sup>-</sup> )	-1,0, y -1
Tiosulfato ( <sup>-</sup> S-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-2 y +6
Politionatos ( <sup>-</sup> O <sub>3</sub> S(S) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5+, 0 y 5+
Azufre elemental S <sub>n</sub> (anillos)	0
Bisulfito (HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	+4
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	+6

Es importante recalcar que los compuestos inorgánicos de azufre no son sólo producidos por procesos biológicos, procesos abióticos están interconectados con el ciclo biológico del azufre, ([figura 1.1](#)). A continuación se resumen los orígenes de compuestos inorgánicos de importancia biológica:

## SULFURO

El sulfuro se forma como producto principal de la respiración de sulfato por bacterias bajo condiciones anaerobias, cuando la materia orgánica y el sulfato no son limitantes. Otros compuestos de azufre como tiosulfato y azufre elemental pueden servir como aceptores de electrones para la respiración produciéndose sulfuro. El sulfuro es liberado también por desulfuración de compuestos orgánicos que contienen azufre reducido (proteínas). El sulfuro, es la forma más estable del azufre bajo condiciones anaerobias (Steudel, 2000). La disociación del sulfuro de hidrógeno en agua se presenta de acuerdo con las siguientes ecuaciones:



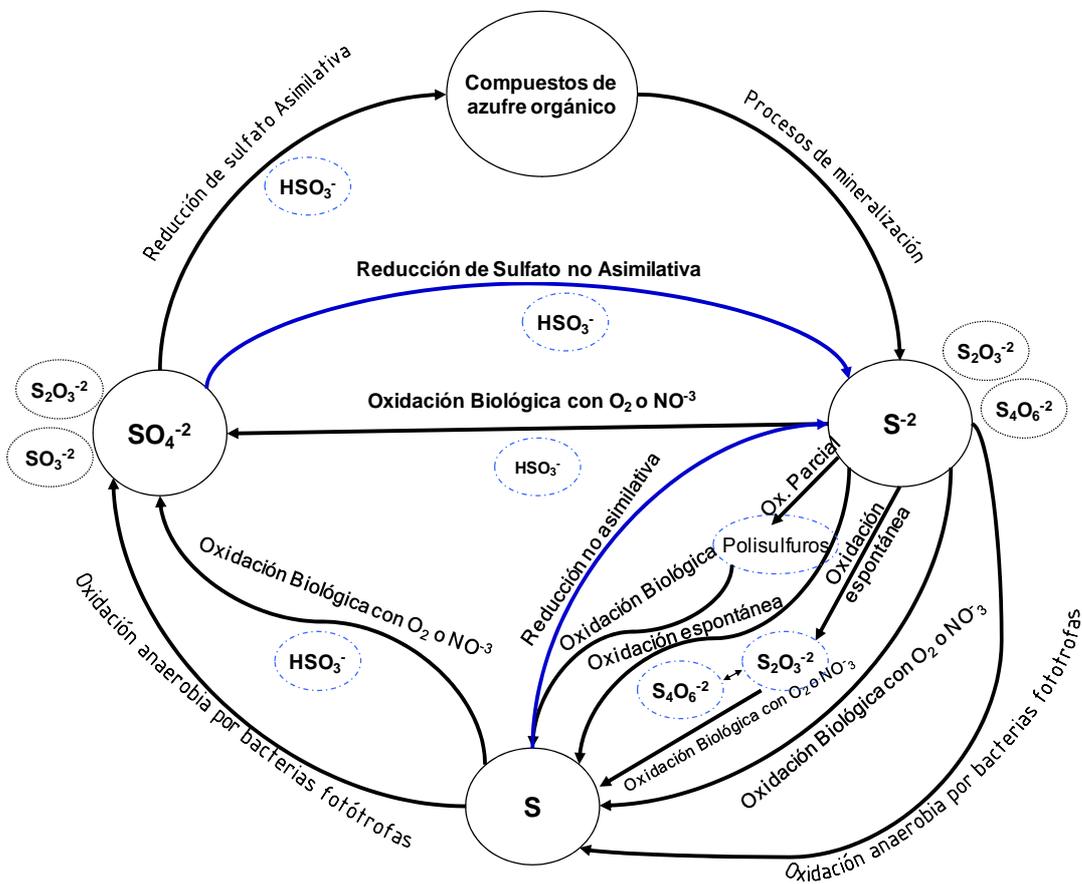
( $\text{H}_2\text{S}$ =ácido sulfídrico,  $\text{HS}^-$ =ión hidrosulfuro,  $\text{S}^{2-}$ =ión sulfuro)

La toxicidad del sulfuro tiene dependencia directa con el pH, porque sólo la forma no disociada, el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) puede pasar a través de la membrana celular (Speece, 1983). En la fase líquida, el sulfuro total disuelto está presente en la forma no disociada ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y como  $\text{HS}^-$ , como el valor de  $\text{pK}_a$  de este equilibrio ácido-base está cerca de 7, pequeñas variaciones en el pH en el intervalo de 6-8 afectará significativamente la concentración de sulfuro libre no disociado  $\text{H}_2\text{S}$ . A pH neutro, el  $\text{H}_2\text{S}$  representa el 50% del sulfuro total, mientras que a pH 8 es sólo el 10% (Figura 1.2).

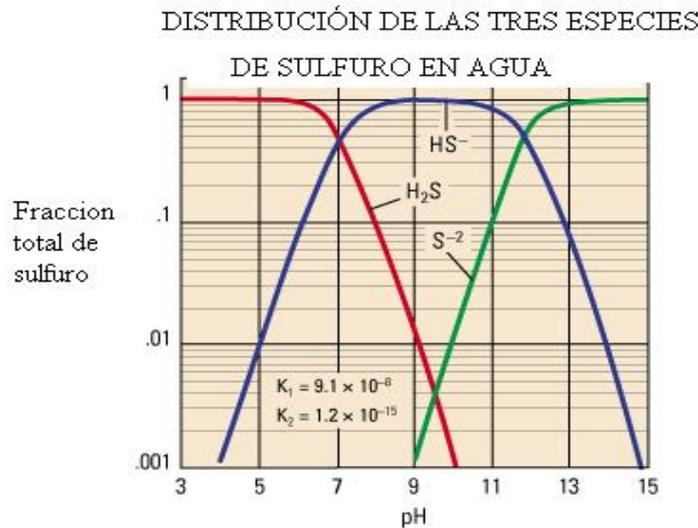
Una concentración alta de sulfuro puede ocasionar problemas en el tratamiento de efluentes via digestión anaerobia entre los que se encuentran:

- El efecto inhibitorio de  $\text{H}_2\text{S}$  sobre muchos grupos de bacterias involucradas en la digestión anaerobia.

- Reducción del rendimiento de metano y por tanto menor recuperación de energía.
- Acumulación de material inerte en el lodo (sulfuros metálicos).
- Problemas en el postratamiento aeróbico debido al crecimiento de bacterias filamentosas tales como *Thiothrix* y *Beggiotoa*
- Reducción en la eficiencia de remoción de DQO debida a la presencia de  $H_2S$  en el efluente y demanda de oxígeno sobre el medio acuático receptor además de muerte a la vida acuática.



**Figura 1.1.** Ciclo biológico del azufre, intermediarios (---), sustratos alternos (.....); (Roberson y Kuenen, 1992).



**Figura 1.2** Distribución de las diferentes especies de sulfuro en agua dependiendo del pH (Polanco y García, 2006).

Se encontró que el sulfuro de hidrógeno producido de la sulfato reducción tiene una toxicidad directa y reversible sobre un cultivo de bacterias sulfato reductoras creciendo sobre lactato y sulfato a diferente pH (5.8-7.0). Una concentración de sulfuro de 547 mg/L inhibió completamente el crecimiento del cultivo. (Reis *et al.*, 1992).

### AZUFRE ELEMENTAL

El azufre elemental SE forma por la acción de bacterias oxidantes del sulfuro. En algunas especies es el producto final de la oxidación. Es un sólido amarillo, no tóxico, que forma cristales ortorrómbicos. Contiene más unidades de azufre por masa que cualquier otra forma química. Su molécula más estable es la que presenta un anillo octaédrico ( $S_8$ ). Es poco soluble en agua ( $5 \mu\text{g/L}$  de  $S_8$ ), pero muy soluble en bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes polares no análogos (Suzuki, 1999).

A presión y temperatura ambiente el azufre elemental existe como anillos de diferente tamaño ( $S_n$ ), o como cadenas poliméricas de alto peso molecular ( $S_\mu$ ). De todos los alótropos la ortorrómbica ( $S_8$ ) es la más estable termodinámicamente. La

formación de anillos con menor número de átomos es más inestable y menos favorecida.

Por síntesis química se pueden preparar anillos de entre 6 y 20 átomos, estas moléculas forman sólidos amarillos o amarillo-naranja. La solubilidad decrece con el incremento en el tamaño del anillo y con el incremento de la simetría de la molécula (Steudel, 2000).

### **TIOSULFATO, SULFITO, TETRATIONATOS Y POLISULFUROS**

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

El sulfito es un intermediario en la mayoría de las vías de oxido-reducción de los compuestos azufrados, es inestable, pero se puede encontrar permanentemente, en las fuentes hidrotermales submarinas.

Los tetracionatos pueden ser un sustrato de bacterias oxidadoras del azufre. Se originan de la oxidación incompleta y pueden ser producidos a partir de tiosulfato por algunas bacterias (Brüser *et al.*, 2000).

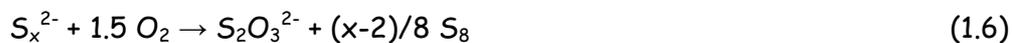
Los polisulfuros pueden ser producidos por la reducción de anillos de azufre elemental abiertos con sulfuro o por una oxidación parcial de sulfuro. Son cadenas de aniones de azufre de diferentes longitudes que tienden a oxidarse fácilmente en el ambiente, lo que les confiere su carácter inestable. Soluciones alcalinas de

sulfuro disuelven el azufre elemental con la formación de iones de polisulfuros, los cuales forman una mezcla en equilibrio de varias especies:



Estas reacciones reversibles dependen fuertemente del pH y de la concentración de sulfuro total. Valores bajos de pH dan como resultado la formación de H<sub>2</sub>S y la precipitación de azufre elemental, mientras que a valores altos de pH se favorece la formación de cadenas de azufre cortas sobre las de polisulfuros más largas. Los aniones de polisulfuro pueden además existir en agua sólo a pH > 6.

Las soluciones de polisulfuro, rápidamente se pueden autooxidar cuando están expuestas al aire y el mayor producto es el tiosulfato, el cual se forma de acuerdo a la siguiente ecuación:



El azufre elemental se observa sólo si el contenido promedio de azufre, x, de los polisulfuros de la solución es más grande que 2. Las soluciones de polisulfuro tienen un color entre amarillo y naranja, mientras que las de tiosulfato son incoloras, la decoloración de la solución original y la formación de un precipitado (para x > 2) indica que la reacción 1.6 ha ocurrido. Por esta razón, tiosulfato es un componente de las soluciones acuosas de polisulfuros (Steudel, 2000).

## 1.2 Reducción biológica de sulfato

Varios compuestos inorgánicos de azufre son aceptores importantes de electrones en las reacciones anóxicas (reacciones donde no existe oxígeno molecular,  $O_2$ , aunque el oxígeno puede encontrarse formando parte de otras moléculas, como por ejemplo sulfato o tiosulfato). El sulfato es la forma más oxidada del azufre (+6) y lo usan las bacterias sulfato reductoras (BSR), como aceptor final de electrones, convirtiéndolo en la forma más reducida, sulfuro (-2). Tal como ocurre con el nitrógeno, es importante distinguir entre la reducción asimilativa y no asimilativa del sulfato, [figuras 1.1 y 1.3](#). Muchos organismos como las plantas superiores, algas, hongos y la mayoría de los procariotas, usan sulfato como fuente de azufre en la biosíntesis, el sulfuro que se forma se convierte en azufre orgánico y se encuentra en forma de aminoácidos, por otro lado, la capacidad de utilizar sulfato como aceptor de electrones para procesos que generan energía implican una reducción de  $SO_4^{2-}$ , actividad que en gran escala está limitada a las BSR.

El sulfato es un aceptor de electrones menos favorable que el  $O_2$  o que el  $NO_3^-$ . Sin embargo cuando se usa un donador de electrones que produce NADH o FADH, se dispone de suficiente energía para fabricar ATP. A causa del rendimiento energético menos favorable, los rendimientos en cuanto a crecimiento son menores que cuando crecen con  $O_2$  ó  $NO_3^-$  (tabla 1.3). Se conocen más de 20 géneros de bacterias reductoras desasimiladoras de sulfato distinguiéndose dos grupos:

El grupo (a) que comprende las especies que oxidan incompletamente sus sustratos hasta acetato y lo acumulan (ver tabla 1.3, reacción 1 y 3): *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobotulus*, *Desulfofustis*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonile*, *Desulfobacula*, *Archaeoglobus*, *Desulfobulbus*, *Desulforhopalus*, *Thermodesulfobacterium*.

El grupo (b) que incluye a las especies que en principio son capaces de oxidar los compuestos orgánicos incluyendo acetato completamente a CO<sub>2</sub> (tabla 1.3, reacción 2, 4 y 5): *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *desulfosarcina*, *Desulfoarculus*, *Desulfacinum*, *Desulforhabdus* y *Thermodesulforhabdu*.

Las BSR son anaerobias estrictas que usan el sulfato y otros compuestos oxidados de azufre como aceptores terminales de electrones, se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres que se vuelven anóxicos. El género mejor estudiado es *Desulfovibrio* que es común en ambientes acuáticos o en suelos encharcados con abundante materia orgánica y suficientes niveles de sulfato. El pH que prefieren es cercano a la neutralidad (Madigan *et al.*, 2004)

**Tabla 1.3.** Reacciones metabólicas de las bacterias sulfato reductoras y sus cambios de energía libre de Gibbs (Celis 2004; Madigan *et al.* 2004\*)

Reacción	AG <sup>0</sup> (kJ/mol)	Genero representativo
2LA <sup>-</sup> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 2HA <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + HS <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> (1)	-160	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfotomaculum</i>
2LA <sup>-</sup> + 3SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 6CO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3HS <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> (2)	-255.3	<i>Desulfobacter</i>
4PA <sup>-</sup> + 3SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 4HA <sup>-</sup> + 4HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3HS <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> (3)	-150.6	<i>Desulfobulbus</i>
4PA <sup>-</sup> + 7SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 12HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 7HS <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> (4)	nd	<i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfobacterium</i>
4HA <sup>-</sup> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + HS <sup>-</sup> (5)	-150.6	<i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacterium</i>
glucosa + 3NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3H <sub>2</sub> O <sup>-</sup> → 6HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (6)*	-1796	Bacterias nitrificantes
glucosa + 6O <sub>2</sub> → 6CO <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O (8)*	-2880	Organismos aerobios y facultativos

LA<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>CHOHCOO<sup>-</sup> (lactato); PA<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> (propionato); HA<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> (acetato); nd, no determinado

Los sustratos orgánicos comunes (donadores de electrones y fuente de carbono) para las BSR son: acetato, lactato, propionato, tabla 1.3.

Ya que el sulfato es una molécula muy estable, primero tiene que ser activada a la expensa de dos moléculas de ATP por cada molécula de sulfato. Esta activación es catalizada por ATP sulfurilasa para producir APS (adenosina-5' - fosfo sulfato). En el caso de la reducción desasimilativa, APS es reducido directamente a sulfito y este es convertido en varias etapas hasta H<sub>2</sub>S, figura 1.3. Se destaca el hecho que H<sub>2</sub>S es siempre el producto final y la reducción incompleta del sulfato no ha sido reportada. Esto puede ser atribuido a la máxima recuperación de energía (si se supone que se forman 3 moléculas de ATP) en el caso de la reducción completa hasta H<sub>2</sub>S. Una explicación bioquímica puede ser argumentada en el sentido de que el H<sub>2</sub>S es fácilmente excretado a través de las membranas celulares, mientras que S<sup>0</sup> que es insoluble puede presentar problemas para la célula. Por lo tanto la formación de S<sup>0</sup> en un solo reactor anaerobio no podría ser llevada a cabo (Brüser *et al.*, 2000), por lo que se hace necesario el acoplamiento de una etapa aerobia que permitiría la oxidación de sulfuro a azufre elemental.

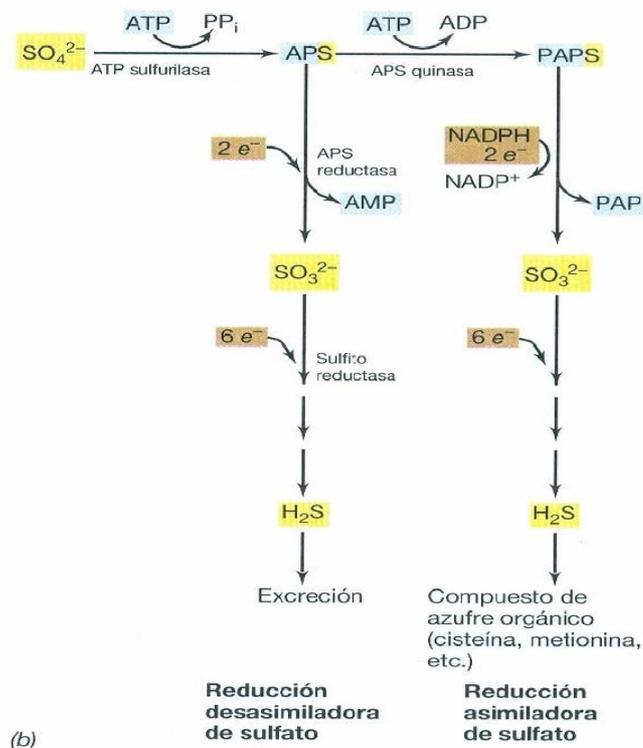


Figura 1.3 Bioquímica de la reducción de sulfato (Madigan *et al.*, 2004).

## **1.3 Eliminación de sulfuro: métodos fisicoquímicos y Oxidación biológica**

### **1.3.1 Métodos fisicoquímicos**

Se conocen procesos químicos que implican oxidación, precipitación, o una combinación de ellos o los de tipo físico tales como absorción, adsorción o volatilización.

De las corrientes de hidrocarburos y gases de combustión por ejemplo, el sulfuro presente puede ser arrastrado por contacto con soluciones alcalinas formando sulfuro en solución. Existen diferentes procesos que difieren en el tipo de oxidante usado para transformar el sulfuro en azufre elemental: el proceso Stretford y el Sulfolin emplea vanadio (Hammond, 1986), en el proceso Lo-Cat se aplica hierro (III) (Heisel *et al.* 1987), El peróxido de hidrógeno, recomienda para eliminar el olor en efluentes industriales con nivel de sulfuro entre 50-10000 mg/L (Us-Peroxide, 2000). Sin embargo muchos de estos procesos, transfieren el problema a otra corriente de desechos o implican procesos complejos y costosos (Cadena y Peter, 1988). Los procesos mencionados son de alto costo, en particular cuando se trata de eliminar concentraciones bajas de compuestos sulfurados. En este sentido los procesos biológicos pueden llegar a ser una alternativa favorable.

### **1.3.2 Oxidación biológica**

En ambientes controlados el sulfuro puede ser oxidado con oxígeno vía microbiana, lo cual tiene las ventajas tales como la eliminación de químicos y el empleo de condiciones ambientales de temperatura y presión, por lo que el costo disminuye considerablemente, no se necesita el tratamiento de lodos con contenido excesivo

de reactivos, mejora la remoción de materia orgánica y el azufre elemental es el producto final.

Los compuestos del azufre más comunes que se usan como fuente de energía son el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), azufre elemental ( $S^0$ ) y el tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ). En la mayor parte de los casos, el producto final de la oxidación es el sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), el número total de electrones que intervienen entre el  $H_2S$  y el sulfato es de ocho. Hay menos energía disponible cuando se usa uno de los estados de oxidación intermediarios, [tabla 1.4](#).

Las bacterias rojas del azufre utilizan sulfuro de hidrógeno como un donador de electrones para la reducción fotosintética del  $CO_2$ . El sulfuro es oxidado a azufre elemental que es almacenado como gránulos dentro de las células, más tarde el azufre desaparece oxidándose a sulfato. La mayor desventaja de usar bacterias fotosintéticas a gran escala reside en su naturaleza anaerobia, así como el requerimiento de energía luminosa que implica tener un área extensa y transparente. También se necesita tener un buen mezclado pues la formación de  $S^0$  produce suspensiones turbias, incrementando los costos de iluminación (Jensen y Webb, 1995).

**Tabla 1.4.** Liberación de energía en la oxidación de compuestos reducidos de azufre.

Reacción	$\Delta G^{0r}$ (KJ/reacción)
$H_2S + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$ (1)	-798.2
$HS^- + 0.5O_2 + H^+ \rightarrow S^0 + H_2O$ (2)	-209.4
$S^0 + H_2O + 0.5O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$ (3)	-587.1
$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2O_2 \rightarrow 2SO_4^{2-} + 2H^+$ (4)	-587.1

El género *Thiobacillus* es el más estudiado de los quimiolitótrofos del azufre, sus ventajas son: 1) tienen pocos requerimientos nutricionales, 2) producen azufre elemental extracelular y 3) tienen una mayor afinidad por el sulfuro,

permitiéndoles competir exitosamente con la oxidación química del sulfuro (Gadre, *et al.* 1989), Buisman *et al.* (1994) encontraron que a una concentración de 150 mg/L de sulfuro, la tasa de oxidación biológica fue 7 veces más alta que la tasa de oxidación química y a 10 mg/L de sulfuro la tasa de oxidación biológica fue 75 veces mas alta que la oxidación química.

Muchos trabajos se han realizando intentando aclarar las vías de oxidación a sulfato, para establecer el mecanismo y la eficiencia de acoplamiento de la energía liberada utilizada para el crecimiento de las bacterias. Un factor que ha impedido la aclaración de estos aspectos es que, contrario a lo que se pensaba, existen dos o más vías de oxidación.

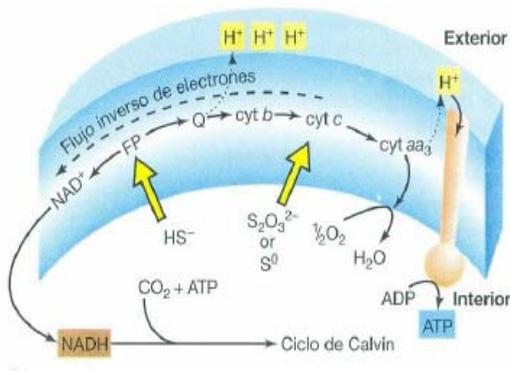
In vitro, el sulfuro de hidrógeno es oxidado a azufre por algunas bacterias fototróficas y quimiotótrofas (entre ellas *Thiobacillus sp.*) vía flavocitocromo *c*-sulfuro deshidrogenada (reacción 1.7), (Visser *et al.* 1997) y una sulfuro quinona reductasa (reacción 1.8) confirmando que la producción de azufre puede ser debida a una enzima específica.



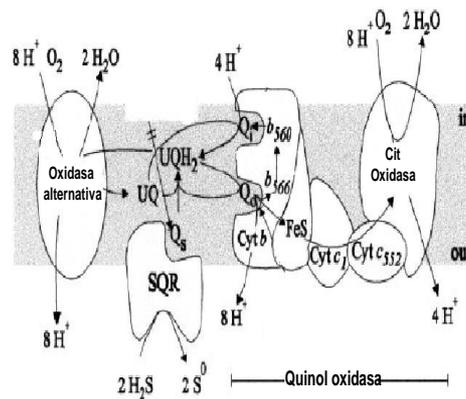
El flavocitocromo *c* está localizado en el periplasma de varias bacterias, son enzimas solubles que muestran actividad citocromo *c* oxidorreductasa in vitro, por esta razón, se ha sugerido que flavocitocromo *c* juega un papel esencial en la oxidación del sulfuro en vivo (figura 1.4 a). Sin embargo, flavocitocromo *c* no aparece en otras bacterias sulfoxidante, además de que bacterias que no lo contienen, tienen la capacidad de oxidar tiosulfato. Esta actividad se ha atribuido a la sulfuro-quinona reductasa (SQR). La sulfoxidación por SQR con la

participación del complejo citocromo *bc* en el flujo de electrones del sulfuro al citocromo *c* se muestra en la [figura 1.4 \(b\)](#), (Schütz *et al.* 1998).

Bajo estos esquemas en el proceso respiratorio de las bacterias sulfoxidante, el sulfuro de hidrógeno provee electrones para la reducción del  $\text{NAD}^+$ , que es requerido para la fijación del  $\text{CO}_2$  en el Ciclo de Calvin-Benson. Los compuestos reducidos pueden incorporarse por varios puntos según sus potenciales de reducción, utilizando oxígeno como aceptor final de electrones. En el caso de la [figura 1.4 \(b\)](#), el potencial redox del par  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a pH 7 es aproximadamente 50 mV más negativo que el potencial del par  $\text{S}^0/\text{H}_2\text{S}$ . Por lo tanto, se requiere energía para transportar los electrones del sulfuro de hidrógeno hacia el  $\text{NAD}^+$ .



(a) Madigan *et al.* (2004)



(b) Schütz, *et al.* (1998)

**Figura 1.4.** Oxidación de compuestos reducidos de azufre por quimiolitotrofos del azufre. (a) Los electrones de los compuestos de azufre alimentan la cadena de transporte de electrones para obtener una fuerza protón motriz; los electrones del tiosulfato y azufre elemental entran al nivel del citocromo *c*. (b) Modelo del transporte de electrones de sulfuro a oxígeno en membranas de *Paracoccus denitrificans* GB17

Los electrones del sulfuro entran a la cadena a nivel de la quinona (UQ), vía la SQR, dependiendo de las especies de quinona el potencial del par  $\text{UQ}/\text{UQH}_2$  es de 100 a 300 mV más positivo que el par  $\text{S}^0/\text{H}_2\text{S}$ . Los electrones también pueden entrar a nivel del citocromo tipo *c* (Cit *c*) vía sulfuro Citocromo *c* oxidorreductasa

(Cyt oxidasa), con potenciales de 500 a 700 mV más positivo que el potencial del par  $S^0/H_2S$ . Si los electrones entran a la cadena a nivel de quinona vía SQR, entonces el complejo citocromo *bc* contribuye a la generación del gradiente protónico necesario para el transporte de electrones al  $NAD^+$ . Así la sulfoxidación por la SQR proporciona más energía que la sulfoxidación por la Cit oxidasa (Griesbeck *et al.* 2000, citado por González 2006)

Por otro lado, un sistema enzimático oxidante de tiosulfato presente en *Thiobacillus versutus* realiza la siguiente reacción:



Dependiendo del pH existen dos tipos de bacterias que oxidan el sulfuro, aquéllas que crecen a pH neutro (6-8) *T. thioparus*, *T. denitrificans*, *T. neapolitanus* y las que lo hacen a pH ácidos (2-4) *T. thiooxidans*, *T. ferrooxidans* (Madigan y Martinko, 2004).

## 1.4 Sulfato reducción-sulfoxidación

En los ambientes naturales las rutas del ciclo del azufre están interconectadas y los ecosistemas en los que las transformaciones del azufre se llevan a cabo de manera cíclica se llaman *Sulfuretum*, intervienen de manera continua tanto organismos sulfato reductores como sulfoxidante. Se encuentran en diferentes ambientes como en las fuentes hidrotermales, sedimentos marinos y mantos microbianos (van den Ende *et al.*, 1997).

En los sistemas de tratamiento de agua la oxidación de sulfuro ha sido estudiada en años recientes. Muchos de los estudios se han enfocado a controlar la toxicidad del sulfuro para las bacterias metanogénicas. El sulfuro se puede oxidar a azufre

elemental bajo condiciones limitadas de oxígeno ( $<0.1$  mg/l) por bacterias sulfoxidantes (Burguess y Stuetz, 2002).

Por otro lado en una planta moderna de lodos activados se determinó la cinética de sulfato reducción, esta planta trata el agua residual de una población de cien mil personas, donde las BSR estuvieron sometidas a ciclos alternados de condiciones óxicas y anóxicas. La sulfato reducción comenzaba inmediatamente después de iniciar el ciclo anóxico. Los resultados mostraron un firme y eficiente acoplamiento metabólico entre las BSR y las bacterias aerobias y facultativas (Ingvorsen K, *et al.* 2003), con lo cual queda evidenciada la capacidad de las bacterias sulfato reductoras para resistir periodos de aereación.

## 1.5 Potencial redox

Muchas reacciones enzimáticas son reacciones de óxido reducción. La habilidad de un organismo para llevar a cabo estas reacciones depende del estado de óxido reducción del medio. En una solución la relación de compuestos oxidados y reducidos constituye el potencial redox (Eh). Algunos microorganismos pueden ser activos solamente en ambientes oxidantes, mientras que otros sólo en ambientes reducidos.

El potencial redox es una medida del valor relativo contra el valor 0 de un electrodo normal de hidrógeno. Un medio que acepta electrones de un electrodo normal de hidrógeno se le asigna un valor redox positivo, si un medio dona electrones al electrodo se le asigna un valor redox negativo.

Un potencial redox positivo indica que el medio favorece reacciones de oxidación, a valores negativos indican un ambiente reductor. Microorganismos estrictamente

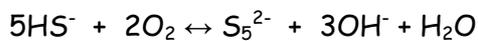
aerobios pueden estar activos solamente a valores positivos de Eh, mientras que anaerobios estrictos solamente a valores negativos de Eh. Anaerobios facultativos pueden operar sobre un amplio rango de valores de Eh (ORP) usando oxígeno como aceptor final de electrones a valores altos de Eh y fermentando o usando un aceptor de electrones alternativo.

El potencial redox es influenciado por la presencia o ausencia de oxígeno molecular. Ambientes en contacto con el oxígeno atmosférico tienen Eh cercanos a +800 mV, ambientes que se encuentran a tensiones de oxígeno reducidas tienen valores más bajos. En los sedimentos acuáticos valores de Eh son usualmente negativos. Sedimentos ricos en materia orgánica pueden tener valores de Eh tan bajos como -450 mV. A estos valores el sulfato es reducido a  $H_2S$  y la reducción de  $CO_2$  produce  $CH_4$  de manera rápida (Atlas y Bartha, 1993).

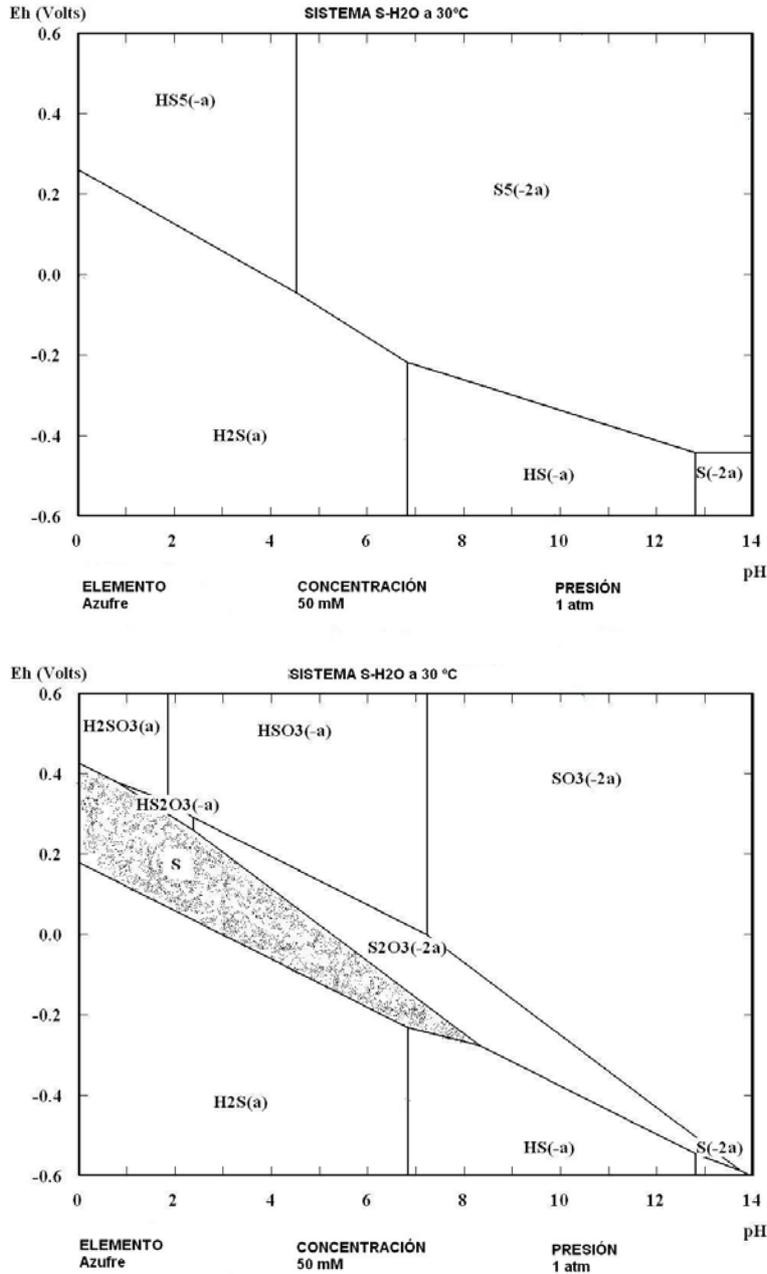
La oxidación de sulfuro a azufre y posteriormente a sulfato, y la reducción de oxígeno en agua son los cambios redox más importantes. El valor del potencial redox está determinado principalmente por la concentración de sulfuro ya que éste es un compuesto que tiene una alta capacidad para intercambiar corriente con la superficie de los electrodos de platino, apoyado en esto Janssen *et al.* (1998), lograron controlar un reactor sulfoxidante, encontrando que la formación de azufre elemental se favorecía en el intervalo de -147 a -137 mV (valores con respecto al electrodo de  $H_2$  a 30°C y pH 8), así buscaron que el reactor operará en ese intervalo y cuando el registro del ORP se encontraba fuera del intervalo se modificaba la aeración, de esta manera también se evitaba una aeración excesiva, haciendo mínima la formación de sulfato. Además encontraron que existe una relación lineal entre el potencial redox y el logaritmo de la concentración de sulfuro.

Buitrón *et al.* (2003) desarrollaron un algoritmo denominado de control robusto y confiable, basado en la medición del potencial de óxido reducción (ORP). Con este algoritmo se detectó el final de la etapa anaerobia en un reactor SBR (Sequencing Batch Reactor) anaerobio/aerobio, utilizado para la degradación de p-nitrofenol (PNF). Se observó que durante la etapa anaerobia se presentaba un punto de inflexión en el ORP medido en línea, el cual indica el fin de la reducción del PNF a p-aminofenol (PAF). De esta manera el ORP es utilizado como el parámetro de control para la etapa aerobia donde el PAF será degradado por los microorganismos.

Una herramienta útil son los diagramas de zonas de predominio de especies azufradas en función del pH y el ORP, que predicen los productos de oxidación de una solución de sulfuro que se aérea de forma constante. A pH alcalino, la primera fase en la oxidación química de sulfuro es la formación de polisulfuros ([figura 1.5 a](#)) de acuerdo con la siguiente ecuación:



la oxidación subsecuente de pentasulfuros a sulfito y tiosulfato son las reacciones predominantes a pH alcalinos ([figura 1.5 b](#)). De acuerdo con estos diagramas se observa que la oxidación química del sulfuro, bajo condiciones químicas tiene una alta tendencia hacia la producción de polisulfuros y después a tiosulfato y sulfito, mientras el azufre puede ser estable a pH menores a 8 y ORP superiores a -200 mV (zona sombreada [figura 1.5 b](#)). Si la aeración continúa el producto final de la oxidación química del sulfuro será el sulfato, (González y Revah, 2007).



**Figura 1.5** Diagrama de zonas de predominio de especies azufradas en la oxidación química de sulfuro (en ausencia de microorganismos). a) Los posibles productos que en cuestión de minutos aparecerían, cuando una solución de sulfuro es aireada, b) los productos de oxidación que se formarían al airear por horas la solución inicial de sulfuro (González y Revah 2007).

## 1.6 Reactores SBR

Un reactor discontinuo secuencial (*Sequencing Batch Reactor*, SBR) es un sistema de lodos activados para tratamiento del agua residual que utiliza ciclos de llenado y descarga. Las operaciones involucradas en un SBR son equivalentes a las de un sistema de lodos activados convencionales: aireación y sedimentación-clarificación. La diferencia entre estos sistemas, es que, en sistemas convencionales de lodos activados, estos dos procesos son realizados en dos diferentes tanques, mientras que en sistemas SBR, estas operaciones ocurren secuencialmente en el mismo tanque (figura 1.6). Son sistemas versátiles pues durante la fase de reacción de un SBR pueden implementarse fases anaerobias y aerobias alternadas, con la finalidad de remover nutrientes como nitrógeno y/o fósforo (Bernardes y Klapwijk, 1996), así como compuestos xenobióticos (Buitrón *et al.*, 2003). El volumen de intercambio corresponde a la fracción descargada con relación al volumen total de operación

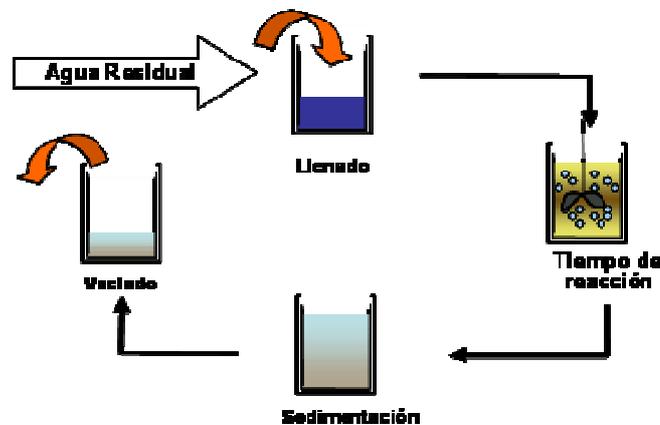


Figura 1.6. Fases de un reactor discontinuo secuencial.

Los sistemas SBR han sido utilizados con éxito para tratar aguas residuales tanto municipales como industriales. Entre 1914 y 1920 Arden y Lockett pusieron en marcha varios procesos que operaban de acuerdo a la tecnología de SBR. El interés en los SBR se revivió a finales de la década de 1970 e inicios de la década de 1980 con el desarrollo de nuevos equipos y tecnología. Las mejoras de los sistemas de

aeración y de controles permitieron que los SBR compitieran con éxito con los sistemas convencionales de lodos activados.

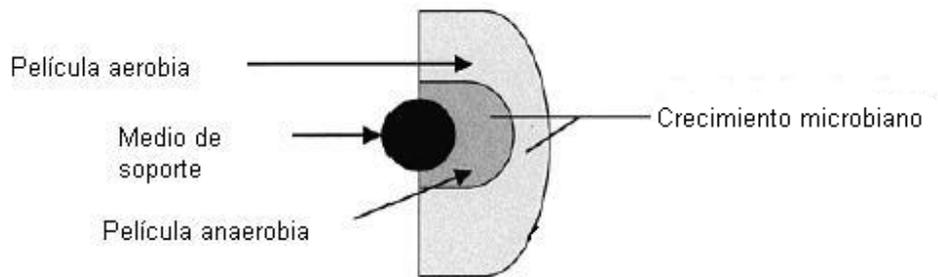
Los sistemas SBR pueden producir un efluente de mejor calidad que el obtenido por un tratamiento secundario y pueden operar en un amplio rango de variaciones de flujos y cargas orgánicas, pueden adaptarse fácilmente a variaciones continuas de las concentraciones de los contaminantes. Otra de las ventajas sobre los sistemas de lodos activados es que los SBR generan una fuerte presión de selección, adaptando bacterias a condiciones cambiantes pues se utiliza una secuencia de tiempo controlada. Este tipo de reactor realiza también, en algunos casos, la sedimentación secundaria (Metcalf y Eddy, 2003).

## **1.7 SBR con biopelícula y de lecho móvil**

Durante los últimos años, un gran número de aplicaciones basadas en el funcionamiento de SBRs han sido desarrolladas, todas ellas han tenido el objetivo común de controlar la composición y la actividad de las comunidades microbianas, así como tratar de alcanzar las más altas eficiencias en la remoción de los contaminantes (Mace y Mata-Alvarez, 2002).

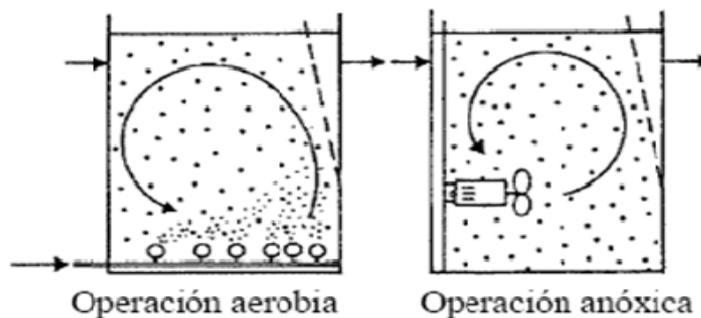
Una de las mejoras se obtuvieron al incorporar empaques en los reactores, en cuya superficie se desarrolla una biopelícula (Rusten y Neu, 1999), las cuales constituyen un conglomerados de microorganismos donde predominan las bacterias heterótrofas, la biopelícula se desarrolla con el objeto de buscar protección ante posibles condiciones adversas del medio (González, 1996). Puesto que el oxígeno tiene una limitada penetración a través de la biopelícula se genera una zona aerobia y una anaerobia en la biopelícula (figura 1.7).

Chozick e Irvin (1991) empacaron un SBR con carbón activado, por lo que, durante la etapa de llenado ocurrieron procesos de adsorción y la concentración de los contaminantes críticos disminuyó considerablemente. Durante la etapa de reacción, biodegradación y desorción son los procesos predominantes (Zwerger *et al.* 2000) probaron el uso de zeolita como material de empaque para el crecimiento de una biopelícula. La zeolita tiene una alta capacidad de absorción, y su bioregeneración es controlada mediante la actividad biológica de los microorganismos.



**Figura 1.7.** Biomasa adherida a un soporte en un SBR (Sequencing Batch Reactor) con biopelícula

En los reactores de lecho móvil la biopelícula crece en la superficie de materiales acarreadores (empaves) que se mantienen en libre movimiento con el líquido del reactor mediante la agitación generada por sistemas de aireación (reactores aerobios) o por sistemas mecánicos (en reactores anóxicos o anaerobios), (figura 1.8).



**Figura 1.8** Principio de funcionamiento de un reactor de lecho móvil (Ødegaard et al., 1993)

Los empaques se han fabricado de polietileno o polipropileno de alta densidad, en la [tabla 1.4](#) se muestran algunas características de empaques comerciales utilizados en plantas reales y plantas piloto. En el 2003 había más de 300 instalaciones alrededor del mundo que operaban con esta tecnología (Rodgers y Zhan, 2003).

**Tabla 1.5.** Propiedades de empaques utilizados en reactores de lecho móvil

Empaque	Kaldnes 1 <sup>a</sup>	Kaklnes 2 <sup>a</sup>	Natrix Maxi <sup>a</sup>	Natrix Optima <sup>a</sup>	Flocor-RMP <sup>b</sup>	ABC4 <sup>c</sup>
Longitud (mm)	7	15	50	50	20-30	14
Diámetro (mm)	9	15	52-64	60	15-20	14
Área específica (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> )	500	350	200	300	160	600

<sup>a</sup>Datos obtenidos de la página electrónica: [http://www.ny.anox.se/eng/b2\\_2\\_barare.htm](http://www.ny.anox.se/eng/b2_2_barare.htm).

<sup>b</sup>Andreottola *et al.* 2000

<sup>c</sup>Datos obtenidos de la página electrónica:

<http://www.aqwise.com/new/page.asp?cat=155&type=2&lang=1>

El porcentaje de llenado y el área específica del empaque empleado son los dos principales parámetros de diseño. Los porcentajes de llenado se encuentran entre 30-70% del volumen total de reactor y se recomienda que el porcentaje de llenado sea menor al 70 %, con esto se consigue que el empaque pueda moverse libremente (Ødegaard 2000).

La tecnología de lecho móvil puede aplicarse en plantas de tratamiento para la biodegradación de materia orgánica y en instalaciones para eliminación de nutrientes, nitrificación y desnitrificación tanto en aguas residuales urbanas como industriales. Otra aplicación es el empleo de esta tecnología en el rediseño de procesos actuales de lodos activados que tratan únicamente materia orgánica para su ampliación a la eliminación de nitrógeno de forma sencilla y sin la necesidad de construir nuevos reactores biológicos (Rodgers y Zhan, 2003).

Los parámetros de control típicos de un proceso de lodos activados, como el tiempo de retención celular o edad del lodo dejan de tener relevancia, por lo que la operación del mismo se simplifica notablemente.

En comparación con los sistemas de tratamiento de aguas con biomasa en suspensión, las ventajas de los sistemas de biopelícula son:

- Reducción de volumen del reactor biológico por empleo de un soporte que proporciona una superficie específica elevada.
- Son procesos con gran flexibilidad, ya que en función del porcentaje de soporte plástico empleado en el reactor, se consigue aumentar la superficie disponible para la formación de biopelícula y en consecuencia la eficiencia del proceso.
- No requiere recirculación de biomasa del reactor.
- Permite la generación de una biomasa característica de cada tipo de reactor (aerobio, anóxico o anaerobio) dando lugar a la obtención de una biopelícula con una elevada actividad.
- La biomasa no depende de la separación final del lodo y en consecuencia los problemas habituales encontrados en procesos convencionales de lodos activados, relacionados con la sedimentabilidad del lodo, son menos relevantes.
- Mayor resistencia a la toxicidad y cambios de las condiciones ambientales.

Se ha demostrado que en los reactores con lecho móvil la biomasa adherida es muy eficiente, en reactores de tratamiento de agua municipal e industrial (Ødegaard *et al.*, 1994). Se han aplicado en condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias, en procesos de oxidación de compuestos carbonados y nitrificación-desnitrificación (Rodgers y X.-M. Zhan, 2003).

Pueden aprovecharse las ventajas de un reactor SBR con lecho móvil para el tratamiento de aguas contaminadas con sulfato. Por un lado, durante la etapa de reacción del SBR pueden establecerse ciclos anaerobio y aerobios, para dar lugar

primero a la reducción de sulfato a sulfuro (fase anaerobia) y posteriormente la oxidación de sulfuro a azufre elemental (fase aerobia), el lecho móvil le daría la ventaja de que se puede prescindir de la biomasa suspendida ya que se formaría una biopelícula formada por bacterias sulfato reductoras y sulfoxidantes, con ello se facilitaría la recuperación del azufre elemental, el cual puede precipitar dada su baja solubilidad.

## 1.8 HIPÓTESIS

En un reactor de lecho móvil secuencial (SBR, Sequencing Batch Reactor), el acoplamiento de un sistema anaerobio-aerobio permitirá la transformación biológica de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) mediante la acción consecutiva de bacterias sulfato reductoras y bacterias sulfoxidantes.

## 1.9 OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar la eliminación de sulfatos en un reactor de lecho móvil anaerobio-aerobio mediante su conversión a azufre elemental ( $\text{S}^0$ ), por métodos biológicos, con las reacciones acopladas, reducción de sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y oxidación de hidrosulfuro ( $\text{HS}^-$ ) en un reactor de lecho móvil secuencial.

### Objetivos particulares

- Estudiar las condiciones bajo las cuales se realiza de manera satisfactoria el proceso de sulfato reducción.
- Aclimatar una comunidad mixta de microorganismos compuesta por bacterias sulfato reductoras y sulfoxidante, en un reactor discontinuo secuencial.
- Evaluar condiciones de aeración y alimentación que permitan la producción de azufre elemental en un reactor de lecho móvil anaerobio-aerobio.

## CAPÍTULO 2

## MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Materiales

## 2.1.1 Reactor piloto y empaque

Se utilizó un reactor que tuvo un volumen de 2 L, con un volumen de trabajo de 1.6 L (figura 2.1).

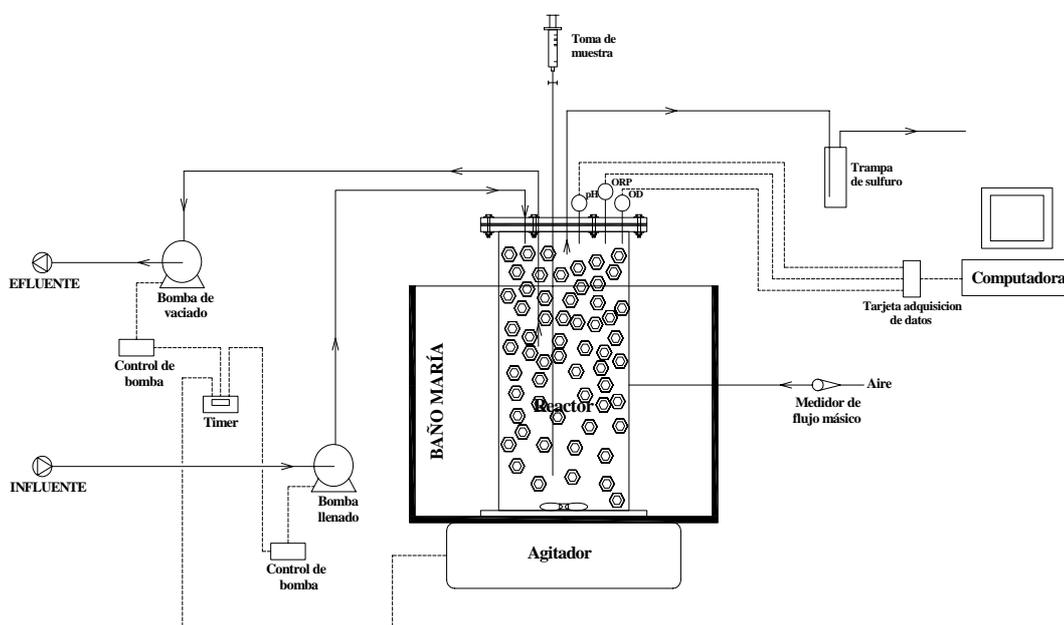


Figura 2.1 Diagrama del reactor discontinuo secuencial de lecho móvil.

El reactor se instrumentó con sensores de ORP, pH (ORION 720A+) y de oxígeno disuelto (YSI 58). Para el registro del ORP y oxígeno se contó con un programa desarrollado en LabVIEW 7.1, apoyado con una tarjeta de adquisición de datos de National Instruments (figura 2.1).

El reactor operó en ciclos de forma automática. Un temporizador controlaba cada uno de los periodos para las etapas: llenado, reacción con agitación/aeración, paro

de agitación/aeración y sedimentación y finalmente vaciado. De esta manera, estaban conectados al temporizador 4 controladores: agitador, suministro de aire, bomba de llenado, bomba de vaciado. El sistema contó con una salida para el biogás producido, el cual era burbujeado en una solución alcalina de sosa contenida en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, para atrapar y cuantificar el H<sub>2</sub>S producido. La aeración se realizó por medio de un difusor de piedra porosa de pecera.

El empaque utilizado (HSA filter media) tuvo las siguientes características: cilindros de polietileno con un área específica de 963 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, densidad 0.95 g/cm<sup>3</sup> y porosidad 80%\*. Cada anillo contenía una especie de aletas, tanto dentro como por fuera para incrementar el área superficial (figura 2.2).



**Figura 2.2.** Empaque utilizado

\*Datos obtenidos de la página electrónica: <http://www.pisces-aqua.co.uk/acatalog/>

### 2.1.2 Fuente de inóculo

Tanto para los experimentos de sulfato reducción y los experimentos de sulfoxidación se utilizaron lodos provenientes de un reactor UASB de la planta de tratamientos de agua residual de la UAM-Iztapalapa, que trata aguas municipales y las generadas en el campus. Los lodos fueron disgregados y lavados con una solución isotónica al 0.9% de cloruro de sodio antes de inocular los reactores.

### 2.1.3 Medio de cultivo.

Para la sulfato reducción se utilizó el medio descrito en la [tabla 2.1](#) y una solución concentrada de oligoelementos, [tabla 2.2](#), de la cual se tomaba 1 mL por cada litro de medio alimentado al reactor (Celis, 2004).

Para la sulfoxidación los nutrientes necesarios fueron proporcionados por los productos del metabolismo de las bacterias sulfato reductoras.

**Tabla 2.1.** Medio mineral usado para el proceso

Compuesto	mg/L
NH <sub>4</sub> Cl	280
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	169
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	150
KCl	500
CaCl <sub>2</sub>	10
Extracto de levadura	18

**Tabla 2.2** Solución concentrada de oligoelementos

Compuesto	mg/L
FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	200
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	785
ZnCl <sub>2</sub>	150
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	50
AlCl <sub>3</sub>	50
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	50
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	50
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	72
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	50
EDTA	500
HCl (37%)	1ml/L

Como fuente de carbono y electrones se utilizó ácido láctico y sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), como aceptor de electrones.

## 2.2 Metodología

### 2.2.1 Estrategia experimental

De manera resumida el reactor operó en tres etapas:

- En la primera, el reactor contenía biomasa suspendida, para estudiar condiciones de sulfato reducción.
- En la segunda, el reactor se operó con biomasa suspendida y empaques (lecho móvil). En este caso se estudió la aclimatación de biomasa sulfato reductora y sulfoxidante y la formación de biopelícula en el empaque, se mantuvo una aeración continua, a un nivel tal que no se detectara oxígeno disuelto, de esta manera hubo condiciones para el desarrollo de bacterias sulfato reductoras y sulfoxidante.
- En la tercera, el reactor se operó únicamente con empaque colonizado por los dos grupos de bacterias, operando cíclicamente entre fases anaerobias y aerobias

### 2.2.2 Proceso sulfato reductor (primera etapa)

Para conocer las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el proceso sulfato reductor se varió la relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , ya que dependiendo de ésta, el proceso puede ser conducido hacia la producción de sulfuro o hacia la generación de metano (Celis, 2004; El Bayoumy *et al.*, 1999). Para un proceso de biomasa suspendida, se estudiaron las relaciones iniciales de: 0.66, 1, 2 y 2.5. Para cada relación el reactor se reinoculaba con lodo nuevo, dando las concentraciones iniciales de SSV mostradas en la [tabla 2.3](#):

**Tabla 2.3.** Concentraciones Iniciales de Sólidos Suspendidos Volátiles SSV empleadas en la medición el efecto de la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  en el proceso sulfato reductor.

$DQO/SO_4^{2-}$	SSV/L
0.66	6000
1	1920
2	1996
2.5	2115

La temperatura de operación fue  $30^{\circ}C.$ , el pH se ajustó inicialmente a 8.0 en cada una de las pruebas y no se controló a lo largo de los experimentos.

La duración de cada lote para las diferentes relaciones fue determinada por los resultados observados en cuanto a la reducción de sulfato. De esta manera, la duración de los ciclos fue variable en función de la aclimatación y de las diferentes relaciones  $DQO/SO_4^{2-}$  estudiadas.

En ciclos normales de operación del reactor en cada recarga se tenía un volumen de intercambio del 80%, previo a la realización de las cinéticas, para evitar la posible inhibición del sulfuro que quedaba disuelto en el 20% del volumen al final de un ciclo, se lavaba la biomasa con medio mineral, se dejaba sedimentar, se retiraba el sobrenadante y se regresaba al reactor para mezclarse con el medio nutritivo con la condición a evaluar.

### **2.2.3 Proceso sulfato reductor-sulfoxidante y colonización del empaque (segunda etapa)**

Una vez encontradas las condiciones bajo las cuales se llevaba a cabo, de manera favorable el proceso sulfato reductor, se reinoculó el reactor con lodo nuevo, previamente lavado y disgregado, dando una concentración aproximada de 2500 mg SSV/L, en esta etapa se quería favorecer el crecimiento de bacterias sulfato reductoras y bacterias sulfoxidante, simultáneamente. El reactor fue operado en

lote por un mes con una relación inicial  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 2 y aereado de forma continua, con un flujo de aire de 25 mL/(min·L) ( $vvm = 0.014$ ). En esta etapa se introdujeron 800 mL de empaque para que comenzara la formación de la biopelícula en la superficie del mismo (colonización). La forma en la que el reactor operó fue: 5 min. de llenado, 11 horas de reacción, tiempo durante el cual se llevaba a cabo la sulfato reducción y sulfoxidación de manera simultánea la aeración fue tal que no se detectó oxígeno disuelto, 45 min. de sedimentación y 10 min. de vaciado.

Se había observado que en aproximadamente 6 horas se podían tener eficiencias de reducción de sulfato cercanas al 80%, sin embargo, había que dar un mayor tiempo para que las bacterias sulfoxidantes permanecieran en contacto con sus sustratos (sulfuro y  $CO_2$  en forma de bicarbonatos), así los ciclos se extendían hasta 11 horas de reacción. Esta forma de operación del reactor se mantuvo constante a lo largo del desarrollo de la biomasa sulfato reductora y sulfoxidante, en la biomasa suspendida y la colonizada en el empaque. El reactor operó así durante un periodo aproximado de 60 días, después de lo cual se retiró la biomasa suspendida, dejando que el reactor operara únicamente con empaque.

La temperatura a la que se llevaron a cabo los experimentos fue  $30^\circ C$ , el pH de inicio fue 8.0 y no se controló a lo largo de los experimentos.

Semanalmente durante el primer mes se siguió la evolución del proceso en cuanto a las eficiencias de reducción de sulfato y producción de sulfuro. Después de este tiempo, la evolución del proceso también se midió a través de respirometrías, de esta manera se evaluó la actividad de las bacterias sulfoxidante presentes en la biomasa suspendida y las que habían colonizado el empaque a dos concentraciones de sulfuro: 0.5 mM (concentración no inhibitoria) y 4 mM (concentración inhibitoria), Van Gemerden (1984), encontró que de 2-4 mM de sulfuro, las bacterias sulfoxidantes presentan inhibición.

Durante el segundo mes, una vez que el sistema presentó ambas capacidades, sulfato reductora y sulfoxidante, se procedió a la determinación de azufre elemental producido por el sistema (biomasa suspendida + biomasa en el empaque), en cinéticas realizadas semanalmente, en las que se probaron los flujos de aire de 3.5, 10, 25, 50 y 150 mL/(min·L).

Al igual que en la primera etapa, antes de realizar las cinéticas se lavaba la biomasa suspendida y el empaque para eliminar el sulfuro residual del ciclo precedente.

Una vez que se determinó la producción de azufre elemental por el sistema, pasados 60 días de operación, se determinó la actividad sulfato reductora y sulfoxidante de la biomasa colonizada en los empaques y retiró la biomasa suspendida para que el reactor operará únicamente con empaque.

### **2.2.4 Proceso sulfato reductor-sulfoxidante solo con biomasa fija (tercera etapa)**

Se retiró toda la biomasa suspendida, dejando en el reactor únicamente el empaque, en el cual ya se había formado la biopelícula. El contenido de biomasa total adherida a los 800mL de empaque, medido como proteína total, fue 15 mg prot.

La forma en que operaría el reactor en esta etapa fue decidida tomando en consideración la posible toxicidad del sulfuro por lo que se decidió utilizar una cantidad de sulfato tal que produjera como máximo 2 mM (64 mg/L) de ión sulfuro y como la reacción es uno a uno molar se decidió utilizar 2 mM (192 mg/L) de sulfato para la alimentación con una relación  $DQO/SO_4^{2-} = 2$ . El medio con el que se alimentaba al reactor en esta etapa fue ajustado a pH 8.

Para esta etapa, el reactor operó en ciclos anaerobios y ciclos aerobios. Diariamente se realizaban 4 ciclos con duración de 6 horas cada uno, 3.5 horas para la fase anaerobia, 2.3 horas para la fase aerobia con un flujo de aire de 100 mL/(min·L), y 7 minutos para la fase de vaciado y 3 minutos para la fase de llenado.

### **2.2.5 Respirimetría y actividad sulfoxidante**

Estas pruebas se realizaron con un respirómetro de 50 mL, el cual estaba equipado con un oxímetro YSI Modelo 5300 Biological Oxygen Monitor, un sensor de oxígeno YSI Modelo 5331, un registrador Cole Palmer; el sensor está soportado por un tapón de hule y tienen contacto directo con el medio líquido. En la prueba se agrega el medio mineral, previamente saturado con oxígeno, dentro del respirómetro y se sella con el tapón que contiene el sensor, teniendo especial cuidado en que no existan burbujas de aire dentro del reactor, posteriormente la biomasa y/o el sustrato, en este caso sulfuro, se inyectan por medio de unas agujas que atraviesan el tapón de hule. Se genera un gráfico que va registrando la variación de la concentración de oxígeno en el tiempo y de esta forma puede calcularse la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno puede deberse a dos factores: la actividad de los microorganismos sulfoxidante (respiración endógena y el necesario para la oxidación de los sustratos) y a la oxidación química del sulfuro,

Para medir el consumo debido a la oxidación química, las pruebas se realizaron en ausencia de microorganismos y con la 0.5 y 4 mM de sulfuro, mismas que se utilizaron para medir el consumo biológico.

Para determinar el consumo debido a la respiración endógena, en el caso de la biomasa suspendida, se utilizaron 5 mL del lodo del reactor después de haber sido lavadas y resuspendidas en solución mineral. Para el caso del empaque, 15 anillos

eran extraídos del reactor y lavados suavemente con medio mineral y colocados dentro del respirómetro.

Para determinar el consumo total de oxígeno se emplearon otros 5 mL de lodo y otros 15 anillos recientemente extraídos del reactor, lavados y resuspendidos en medio mineral y se colocaban dentro del respirómetro, al mismo tiempo que se inyectó un volumen de una solución concentrada 50 mM (1600 mg/L) de sulfuro que proporcionaba las concentraciones de 0.5 y 4 mM.

Por lo que sustrayendo el consumo químico y el endógeno del consumo total, podía conocerse el utilizado para la oxidación de sulfuro y de esta manera conocer la actividad sulfoxidante. Todas las respirometrías se realizaron a un pH de 8 y 30°C.

### **2.2.6 Métodos analíticos**

Para la determinación de sulfato se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión equipado con un detector de arreglo de diodos (HP series 1100) y una columna 200mm x 3mm IonoSpher-A de intercambio iónico empacada con sílica. La fase móvil fue biftalato de potasio 0.04 M, pH 4 a un flujo de 0.8 mL/min. La detección se lleva a cabo a 308 nm. La temperatura de la columna y del detector fue de 40°C.

La determinación de sulfuro se realizó con un equipo Hach DR/2010. Para esta prueba se utiliza un kit de ácido sulfúrico y dicromato de potasio, con la formación de una solución de color azul, que se lee a una longitud de onda de 665 nm. Este método es equivalente al método 376.2 de USEPA o al 4500-S2- de la APHA (1995) para aguas residuales.

La cuantificación de azufre elemental se realizó por el método colorimétrico, que consiste en la reacción de cianuro de sodio con azufre elemental para formar tiocianato de sodio. En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona

rápida y cuantitativamente con cianuro formando tiocianato. El tiocianato se determinó por la adición de acetona con cloruro férrico a 590 nm. (Barlett y Scoog 1954). El procedimiento es como sigue: se tomaron 10 mL líquido del reactor, la muestra fue evaporada a 65°C. una vez secas, el polvo resultante fue molido y resuspendido en 25 mL éter por 24 horas, de esta forma el azufre se disolvió en el éter, 5 mL de esta solución eran mezclados en un matraz aforado de 25 mL con 15 mL de una solución de cianuro de sodio, dejando la reaccionar por 2 minutos para que se formara tiocianato y el matraz se aforaba con 5 mL de acetona. De la solución resultante 5 mL eran mezclados con 5 mL de una solución de cloruro férrico en un tubo Hach, formándose un complejo colorido que pudo determinarse por absorbancia, comparándola con una con una curva de calibración preparada con estándares de azufre elemental. El blanco se preparó con 5 mL de acetona y 5 mL de cloruro férrico.

Los sólidos suspendidos volátiles, sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos fijos en el lodo se determinaron por el método gravimétrico descrito en los Métodos estándar (APHA, 1995). Los sólidos suspendidos totales se determinan después de filtrar a través de un filtro de fibra de vidrio a peso constante una alícuota y dejándolo secar en la estufa a 105°C por una hora. Los sólidos suspendidos fijos se determinan después de 15 min. a 550°C. El contenido de SSV de la muestra se calcula por la diferencia de los sólidos totales y los sólidos fijos.

La determinación de proteína, se realizó por el método colorimétrico, descrito por Lowry (1951), el cual se basa en la reacción de la proteína con tartato de cobre en medio alcalino y la subsiguiente reducción del reactivo de Folin por el complejo tartato de cobre-proteína, produciéndose el característico color azul, que posee un máximo de absorbancia a 750 nm. Para la curva patrón se utilizó albumina sérica bovina a diferentes concentraciones entre 0 y 60 mg/L. Para el desprendimiento de la biomasa adherida al empaque este se sometía a 30 minutos de sonicación.

Las muestras para la determinación de acetato, se centrifugaron por 5 minutos a 3500 rpm, se filtraron con un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ , se tomó una alícuota de 950  $\mu\text{L}$  y se acidificó con 50  $\mu\text{L}$  de HCl diluido 1:1 con agua desionizada. El acetato se determinó por cromatografía de gases usando un cromatógrafo Agilent modelo GC6890N equipado con una columna Zebron ZB-FFPA 15m x 0.53mm x1  $\mu\text{m}$  y detector de ionización de flama (FID). El flujo de nitrógeno como gas acarreador fue de 3.4 mL/min. Las temperaturas del inyector y detector fueron 230 y 250°C respectivamente, la del horno fue de 65°C por 20 min., incrementándose una velocidad de 50°C/min. hasta 135°C, misma que se mantuvo por 4.5 min.

El carbono inorgánico (CI) fue determinado con un analizador de carbono orgánico total modelo TOC-5050 Shimadzu, las muestras se filtraron con un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ .

Para la determinación de lactato se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión equipado con un detector de arreglo de diodos (HP series 1100) y una columna Phenomenex Luna 5u C8(2). La fase móvil fue fosfato dibásico de amonio 0.1 M a pH 7 a un flujo de 0.5 mL/min. La detección se realizaba a 210 nm. La temperatura de la columna y del detector fue de 40°C.

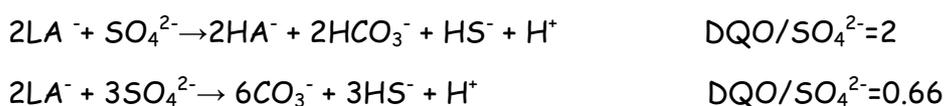
## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 Proceso sulfato reductor

##### 3.1.1 Efecto de la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

Puesto que el proceso sulfato reductor sería el que proporcionaría los sustratos necesarios para llevar a cabo la sulfoxidación, se propuso encontrar condiciones que favorecieran este proceso para biomasa suspendida, se probaron 4 relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: 0.66, 1.0, 2.0, y 2.5, dos de estas relaciones fueron cercanas a la estequiométrica obtenidas de las ecuaciones 1 y 2 de la tabla 1.3:



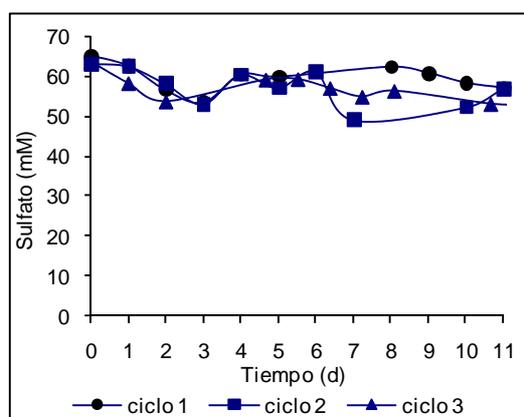
Las relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 1 y 2.5 contienen un exceso de DQO con relación a la ecuación 2 y 1, respectivamente.

Se realizaron 3 ciclos con concentraciones de sulfato cercanas a 50 mM (4800 mg/L) y con la cantidad estequiométrica de lactato, 35.2 mM (3168 mg/L), que debería permitir que el sulfato se redujera a sulfuro, considerando que todo el sulfato fuera transformado a sulfuro y todo el lactato se oxidaría hasta CO<sub>2</sub>.

En cada uno de los ciclos se ajustó inicialmente el pH=8, dado que este parámetro no se controló, éste subió en cada uno de los ciclos a valores cercanos a 8.5 lo cual puede relacionarse con la producción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, reflejado como alcalinidad.

Considerando los primeros 3 días de los ciclos en donde se pueden calcular velocidades volumétricas entre 3 y 5 mM sulfato/d (288 y 480 mg sulfato/(L·d))y

la concentración de sólidos suspendidos volátiles se logró una velocidad específica máxima de 0.0008 mM sulfato/(gSSV·d), (0.076 mg sulfato/gSSV·d)



**Figura 3.1.** Ciclos de aclimatación del lodos sulfato reductores con una relación inicial  $DQO/SO_4^{2-}=0.66$

Se creía que podía lograrse una aclimatación bajo relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , la figura 3.1 muestra los ciclos ensayados y puede observarse que el fenómeno de aclimatación esperado no se alcanzó bajo esta condición. La medición de la DQO dejó ver que al final de los ciclos ésta era muy baja dando relaciones  $DQO/SO_4^{2-}=0.17$ , con estas concentraciones bajas de DQO, el proceso sulfato reductor no puede continuar ya que se encuentra limitado por la fuente de electrones y carbono.

**Tabla 3.1** Eficiencias y velocidades de eliminación de sulfato con relación  $DQO/SO_4^{2-}=1$

Ciclo	SSV (mg/L)	sulfato inicial (mM)	sulfato final (mM)	Vel. Máx de eliminación de sulfato mM/(gSSV·h)	% eliminación
1	1920	9.0	8.5	0.0	4.9
2	1980	7.0	3.1	0.1	56.3
3	2166	10.4	5.5	0.1	47.1

La figura 3.2 muestra el comportamiento para una relación inicial  $DQO/SO_4^{2-}=1$ .

Las eficiencias y velocidades se muestran en la tabla 3.1.

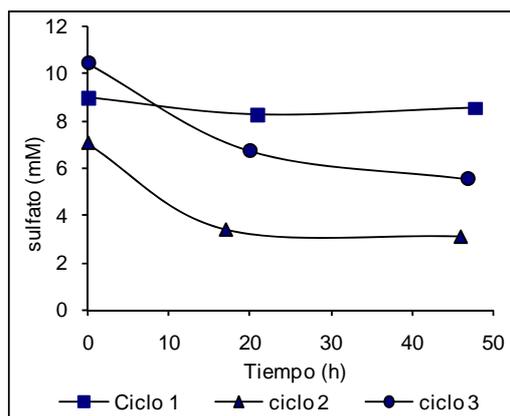


Figura 3.2. Ciclos de aclimatación del lodos sulfato reductores con una relación  $DQO/SO_4^{2-}=1$

Bajo estas condiciones el proceso ocurre con mejores resultados, puesto que las cantidades, así como las velocidades de reducción de sulfato aumentan de manera considerable, además puede observarse un aumento ligero de la biomasa.

Tabla 3.2 Eficiencias y velocidades de eliminación de sulfato con relación  $DQO/SO_4^{2-}=2$

Ciclo	SSV (mg/L)	Sulfato inicial (mM)	Sulfato final (mM)	Velocidad Máxima de eliminación de sulfato mM/(gSSV·h)	% eliminación
4	1996	20.83	7.03	0.18	66.24
5	2020	20.83	7.29	0.43	65.00
6	1870	20.83	1.61	0.51	92.28

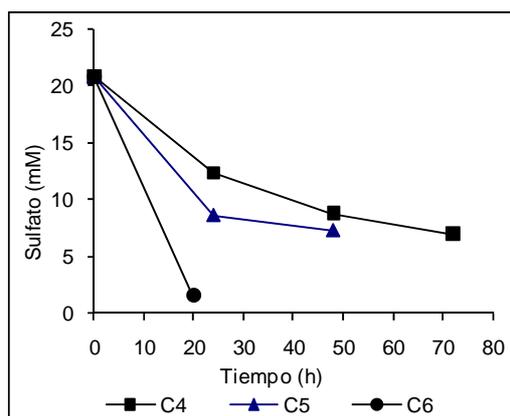
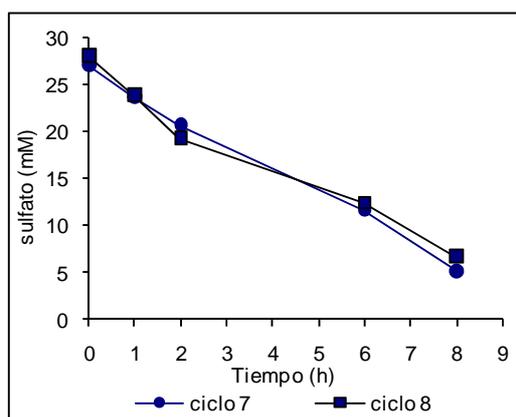


Figura 3.3. Ciclos de aclimatación del lodos sulfato reductores con una relación  $DQO/SO_4^{2-}=2$

Mejores tasas y eficiencias de remoción ocurrieron con una relación  $DQO/SO_4^{2-} = 2$  como se muestra en la [figura 3.3](#) y la [tabla 3.2](#).

Existe un aumento considerable en la velocidad de reducción de sulfato (pasa de  $0.0008 \text{ mM } SO_4^{2-}/(\text{gSSV}\cdot\text{d})$  a  $0.51 \text{ mM } SO_4^{2-}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$ ) con respecto a las relaciones antes probadas, también se logró una reducción máxima de sulfato del 92 % en aproximadamente 20 horas de reacción.

Para una relación  $DQO/SO_4^{2-}=2.5$  se tiene el comportamiento mostrado en la [figura 3.4](#), bajo esta condición la velocidad específica de reducción de sulfato de fue  $1.3 \text{ mM de sulfato}/(\text{gSSV}\cdot\text{h})$  y un 82% de eliminación de sulfato en 8 h.

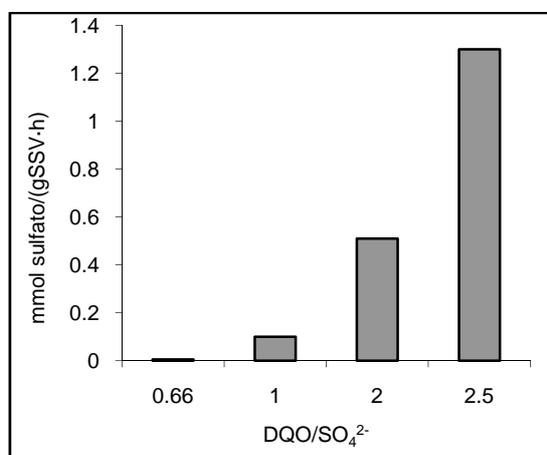


**Figura 3.4** Ciclos de aclimatación del lodos sulfato reductores con una relación  $DQO/SO_4^{2-}=2.5$

Dado que no se cambió el inóculo al evaluar las relaciones  $DQO/SO_4^{2-}$  desde 1 hasta 2.5, lo observado, podría atribuirse a un fenómeno de aclimatación determinado por el tiempo de exposición, sin embargo, para otros ensayos (resultados no mostrados) cuando se operó el reactor por dos semanas bajo una misma relación, por ejemplo 1 ó 2, se llegaba a una eficiencia y velocidad máxima cercanas a mostradas para el ciclo 3 y 6 de las tablas 3.1 y 3.2. es decir, para el proceso sulfato reductor es más importante la relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , que el tiempo de exposición a una determinada relación  $DQO/SO_4^{2-}$ , comparando las figuras 3.2-3.3, se observa como con relaciones  $DQO/SO_4^{2-}$  cercanas a 2 la actividad de las bacterias sulfato reductoras es considerablemente más alta, que con la relación

DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>=1 tablas 3.1 y 3.2, así, mientras que con la relaciones de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>=0.66 la aclimatación es nula (figura 3.1) o lenta (días) en el caso de la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>=1, cuando se utilizan relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>=2 ó 2.5 la aclimatación es rápida y la sulfato reducción alcanza eficiencias del 92% de reducción de sulfato en 20 horas, (ciclo 6, figura 3.3) y del 82% en 8 horas (figura 3.4)

Al graficar las relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> usadas contra las máximas velocidades específicas de reducción de sulfato (figura 3.5) se observa que aumentando las relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> se logran mayores velocidades de reducción de sulfato.



**Figura 3.5** Velocidades específicas de reducción de sulfato a diferentes relaciones DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

Las mayores velocidades se encontraron con una DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>= 2 y 2.5 con éstas se logra una reducción entre el 80 y 90 % del sulfato a diferencia de cuando ésta se acerca a 0.66 y 1, con las cuales se obtienen menores velocidades y rendimientos, esto es un indicativo de que las bacterias prefieren llevar a cabo reacción 1 de la tabla 1.3, la cual es llevada a cabo por bacterias como *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*:



## 3.2 Sulfato reducción-sulfoxidación

El proceso consta de dos etapas: en la primera el sulfato es reducido a sulfuro, reacción llevada a cabo por bacterias sulfato reductoras que utilizan el lactato como fuente de electrones, oxidándose éste a acetato y  $CO_2$ , los electrones liberados de esta reacción son aprovechados para reducir el sulfato hasta sulfuro (figura 1.3) y en la segunda el sulfuro debería ser oxidado parcialmente hasta azufre elemental (figura 1.4).

### 3.2.1 Desarrollo de la comunidad mixta de microorganismos y colonización del empaque

Si bien con una relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2.5 se obtuvieron las más altas velocidades y eficiencias de reducción de sulfato, se tomó la decisión de utilizar la relación  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2, pues con ella también se podía obtener una rápida aclimatación de lodos sulfato reductores que logran eficiencias de reducción de sulfato cercanas al 80%, sin un aporte considerable de la fuente de electrones, en este caso lactato.

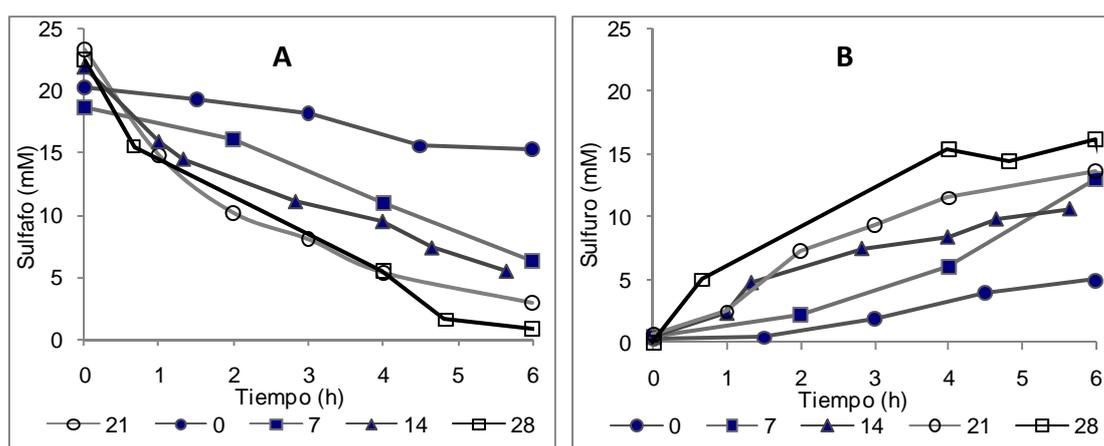


Figura 3.6 Evolución del reactor para la reducción de sulfato (A) y producción de sulfuro (B) para el reactor de lecho móvil. Cinéticas realizadas a 0, 7, 14, 21 y 28 días de operación del reactor.

Después de 28 días de operación del reactor se observó que ya se alcanzaban altas velocidades y porcentajes de reducción de sulfato, así como de producción de sulfuro. El seguimiento de la evolución del reactor puede observarse en la [figura 3.6](#) y en la [tabla 3.3](#).

Un fenómeno observado que es importante resaltar es la inexistente inhibición de la actividad de las bacterias sulfato reductoras a altas concentraciones de sulfuro, pues puede observarse que incluso a concentraciones tan altas como 15 mM de sulfuro (480 mg/L) no existe una disminución aparente de la actividad, Kaksonen *et al.* (2004) encontraron que para un cultivo de bacterias sulfato reductoras alimentadas con etanol y acetato la concentración de inhibición de sulfuro disuelto fue de 84 y 124 mg/L, respectivamente.

**Tabla 3.3** Velocidades específicas de eliminación de sulfato y porcentaje de reducción de sulfato para una aclimatación del reactor de lecho móvil a una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>=2

Día	mg SSV/L	mM SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> gSSV·h	%reducción sulfato
0	2500	0.386	25
7	2316	0.914	66
14	2291	1.14	75
21	2084	1.516	87
28	2147	1.546	97

Para medir la actividad sulfoxidante del sistema, se realizaron respirometrías a la biomasa suspendida y al empaque colonizado.

El consumo de oxígeno puede deberse a dos factores: la actividad de los microorganismos sulfoxidante (respiración endógena y el necesario para la oxidación de los sustratos) y a la oxidación química del sulfuro, por ello debía medirse el consumo biológico y químico, los cuales se determinaron con 0.5 y 4 mM de sulfuro, 30°C y pH 8.

Primero se determinó la velocidad de consumo de oxígeno debido a la oxidación química a 0.5 y 4 mM, las cuales resultaron ser de 0.07 y 1 mgO<sub>2</sub>/(L·min),

respectivamente. El consumo endógeno de oxígeno se determinó en presencia de bacterias (suspendidas o inmovilizadas en el empaque) en ausencia de sustrato, en este caso sulfuro. Así, cuando se realizaron las respirometrías en presencia de sulfuro y bacterias ya sea suspendidas o inmovilizadas en el empaque, se obtiene una velocidad de consumo de oxígeno total, compuesto de la oxidación química, el consumo endógeno y el que utilizan las bacterias para la oxidación del sulfuro. Por lo que, sustrayendo al consumo total, los consumos químico y endógeno se obtiene la velocidad de utilización de oxígeno de las bacterias para la oxidación de los sustratos, actividad sulfoxidante.

En las tablas 3.4 y 3.5 se resumen los resultados de las pruebas de respiración endógena y la actividad sulfoxidante, de la proteína de la biomasa suspendida y de la inmovilizada en el empaque, resultados que serán discutidos más adelante.

**Tabla 3.4** Respiración endógena de la biomasa suspendida (BS) y de la biomasa inmovilizada (BF) en el empaque, evaluada a diferentes tiempos de operación del reactor.

Tiempo (d)	Respiración endógena ( $\mu\text{molO}_2 / (\text{min}\cdot\text{mg proteína})$ )	
	Proteína de BS	Proteína de BF
28	0.525	NC
60	17.16	2.1
75	ND	0.34

ND. No Determinada, NC. No cuantificable

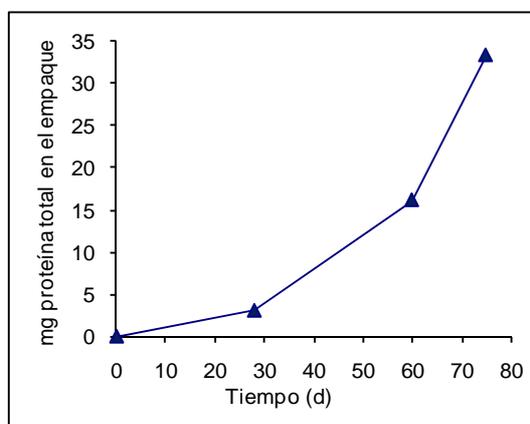
**Tabla 3.5** Actividad sulfoxidante de la biomasa suspendida (BS) y del empaque (BF) evaluada a diferentes tiempos de operación del reactor a dos concentraciones de sulfuro.

Tiempo (d)	Actividad sulfoxidante ( $\mu\text{molO}_2 / (\text{min}\cdot\text{mg proteína})$ )			
	0.5 mM		4 mM	
	BS	BF	BS	BF
28	1.29	NC	NC	NC
60	4.68	0.22	12.98	0.79
75	ND	3.25	ND	0.18

ND. No determinada., NC. No cuantificable

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Visser (1997), quien reporta para *Thiobacillus* sp W5 un valor de 1.85-1.95  $\mu\text{molO}_2 /(\text{min}\cdot\text{mg proteína})$ .

En la [figura 3.7](#) se muestra la evolución de formación de la biopelícula en el empaque medido como proteína total colonizada en el empaque. Es posible notar que existe un incremento exponencial en la cantidad de proteína adheridas al empaque, se observa una etapa durante los primeros 30 días en donde la colonización es lenta, fase de latencia, posteriormente el crecimiento parece ser exponencial con una tasa de colonización aproximada de 0.59 mg proteína/d.



**Figura 3.7.** Proteína total, en el empaque, como medida de su colonización.

Es importante mencionar que durante los primeros 60 días, el reactor operó con biomasa suspendida y con empaque en proceso de colonización, por lo que el reactor estuvo expuesto a concentraciones altas de sulfato y sulfuro, de 0 a 20 mM y de 0 a 15 mM, respectivamente ([figuras 3.6 a 3.10](#)). Después de esos 60 días el reactor operó sólo con empaque y con concentraciones de 2 mM de sulfato ([figuras 3.16 a 3.18](#)).

En la [tabla 3.5](#) puede observarse que en los primeros 28 días de operación las respirometrías indicaban que la biomasa inmovilizada en el empaque no presentaba actividad sulfoxidante puesto que no se encontró diferencia significativa entre las oxidaciones químicas a 0.5 y 4 mM.

Por otro lado, a los mismos 28 días (tabla 3.5), ya se había detectado actividad sulfoxidante en la biomasa suspendida, por lo que se decidió esperar más tiempo para que siguieran creciendo las bacterias sulfoxidante y pudieran colonizar el empaque.

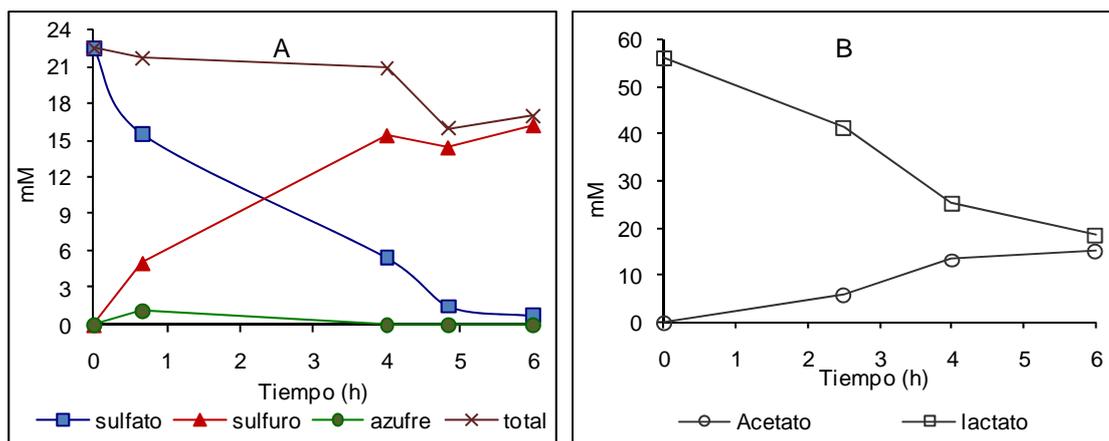
Si la biomasa suspendida ya presentaba actividad sulfoxidante, podría esperarse que también estuviera produciendo azufre. Por lo que el reactor se siguió operando bajo las mismas condiciones de alimentación y aeración, relación  $DQO/SO_4^{2-}=2$ , con 20 mM de sulfato, 25 mL/(min·L) de aeración continua, con periodos de reacción de 11 horas.

Para verificar si en el reactor había producción de azufre elemental, se planteó la realización de experimentos en los cuales el reactor fue sometido a diferentes flujos de aire según lo indica la tabla 3.6. Esta misma tabla resume la máxima producción de azufre observada y lo que esta cantidad representa en porcentaje con respecto al que se podría esperar si todo el sulfato alimentado se convirtiera en azufre elemental. Además se cuantificó azufre, lactato, acetato y carbono inorgánico, se registró el ORP y el oxígeno disuelto, el pH inicial fue ajustado a 8.0 y no se controló. En las figuras 3.8-3.11 se presentan los resultados de las cinéticas, realizadas durante el siguiente mes de operación del reactor.

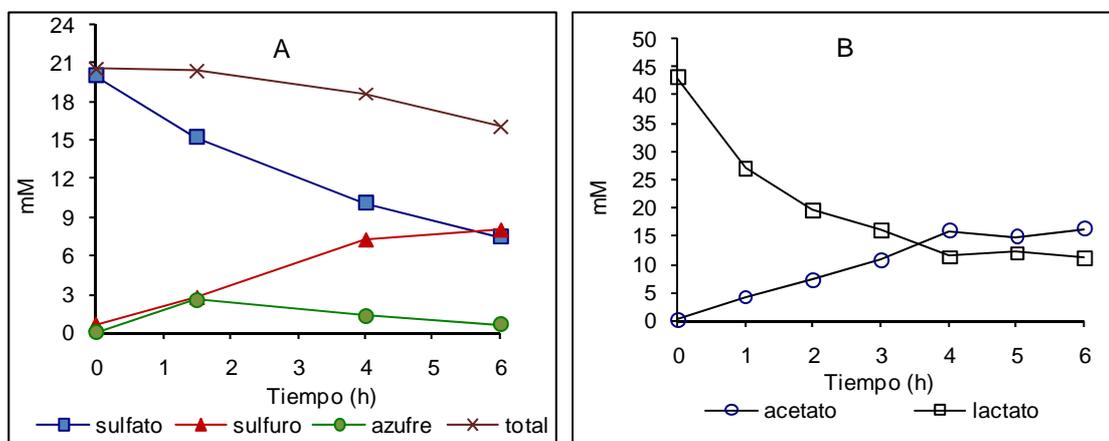
**Tabla 3.6.** Producción de azufre elemental a diferentes flujos de aire, para la relación  $DQO/SO_4^{2-}=2$

Flujo de aire mL/(min·L <sub>reactor</sub> )	Máxima producción de azufre mM	% máx. de producción de azufre*
3.5	---	NC
10	1.15	5.1
25	2.5	12.3
50	2.3	10.8
150	4.5	19.7

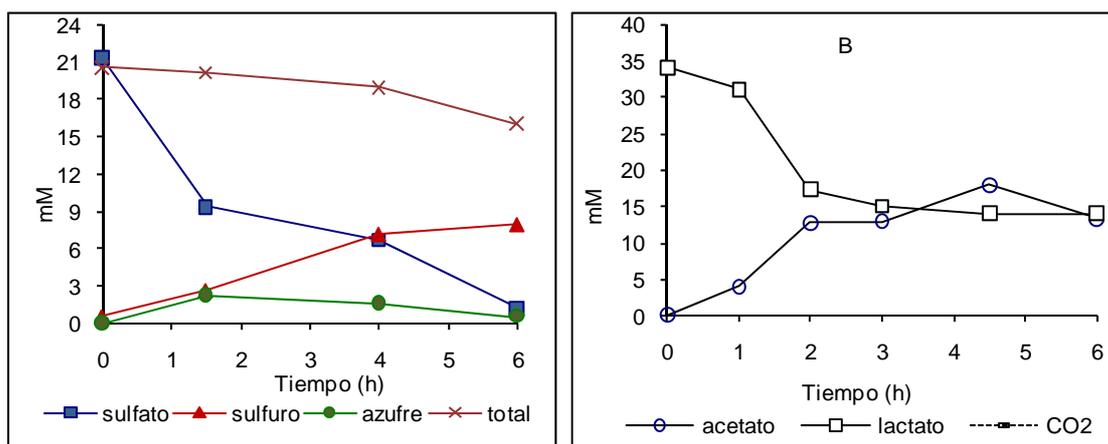
\*Porcentaje calculado con respecto al sulfato total alimentado, considerando que todo se convirtiera en azufre elemental. NC. No cuantificable



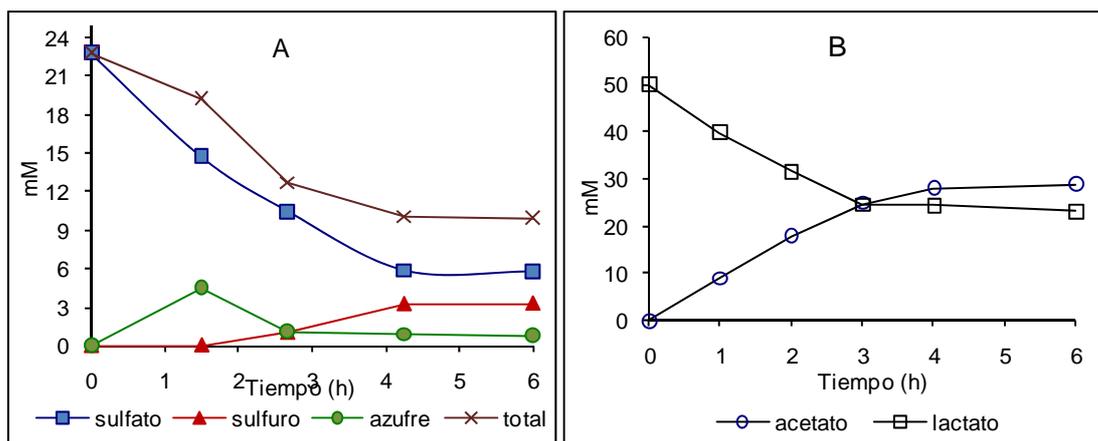
**Figura 3.8.** Comportamiento del proceso con un flujo de aire de 10 mL/(min·L). A) especies azufradas, B) especies carbonadas.



**Figura 3.9.** Comportamiento del proceso con un flujo de aire de 25 mL/(min·L). A) especies azufradas, B) especies carbonadas.

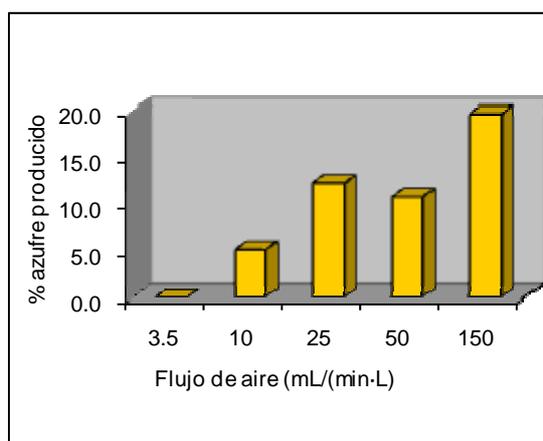


**Figura 3.10.** Comportamiento del proceso con un flujo de aire de 50 mL/(min·L). A) especies azufradas, B) especies carbonadas.



**Figura 3.11.** Comportamiento del proceso con un flujo de aire de 150 mL/(min·L). A) especies azufradas, B) especies carbonadas.

Lo más significativo de estos experimentos fue encontrar que el sistema produjo azufre elemental, y que en general aumentando el flujo de aire, podía incrementarse la producción del mismo, [figura 3.12](#).



**Figura 3.12.** Porcentaje de producción de azufre elemental con respecto al sulfato total alimentado, a los diferentes flujos evaluados.

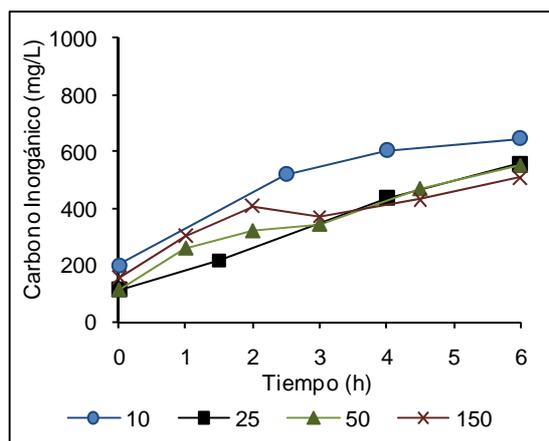
Se observó que al incrementar el flujo de aire hasta 150 mL/(min·L<sub>reactor</sub>) hubo una pérdida de azufre total, pues el sulfuro pudo ser arrastrado por el burbujeo de aire, y/o bien transformado en otras especies con estados de oxidación intermedios que no fueron cuantificadas, como sulfito, tiosulfito, tetrationsos o polisulfuros.

El máximo rendimiento de azufre elemental producido fue del 20%. Una explicación por la que la producción no alcanza mayores valores puede ser la inhibición de las bacterias sulfoxidantes. Stefess, *et al.*, (1996), reportan que las bacterias sulfoxidantes pueden sufrir inhibición a concentraciones entre 0.15 y 1 mM (Van Gernerden, 1984) reporta que el intervalo de inhibición se encuentra entre 2-4 mM. En esta investigación se observó que el máximo de producción de azufre elemental se alcanzó cuando las concentraciones de sulfuro son relativamente bajas, y posteriormente la concentración disminuye cuando el sulfuro aumenta después de la segunda hora.

Otro aspecto importante es el hecho de que las bacterias sulfoxidantes son principalmente bacterias quimiolitotóxicas obligadas, y que por ello pueden sufrir inhibición durante la producción de azufre elemental en medios donde existe materia orgánica (Matin, 1978), en las [figuras 3.7-3.10](#), puede observarse la presencia de acetato, así como de lactato, durante las cinéticas, las cuales podrían estar generando esa inhibición.

Dado que las bacterias sulfoxidantes son quimioautóxicas obligadas, es decir su fuente de carbono es  $\text{HCO}_3^-$  disuelto en el medio y su fuente de energía es el sulfuro, cabía la posibilidad de que estuvieran limitadas por alguno de estos dos nutrientes, era poco probable que el sulfuro fuera el limitante, pero quedaba la duda de si el limitante fuera la fuente de carbono. Para ayudar a aclarar este aspecto también se midió el carbono inorgánico a lo largo de las cinéticas, el resultado de estas mediciones se muestra en la figura 3.13

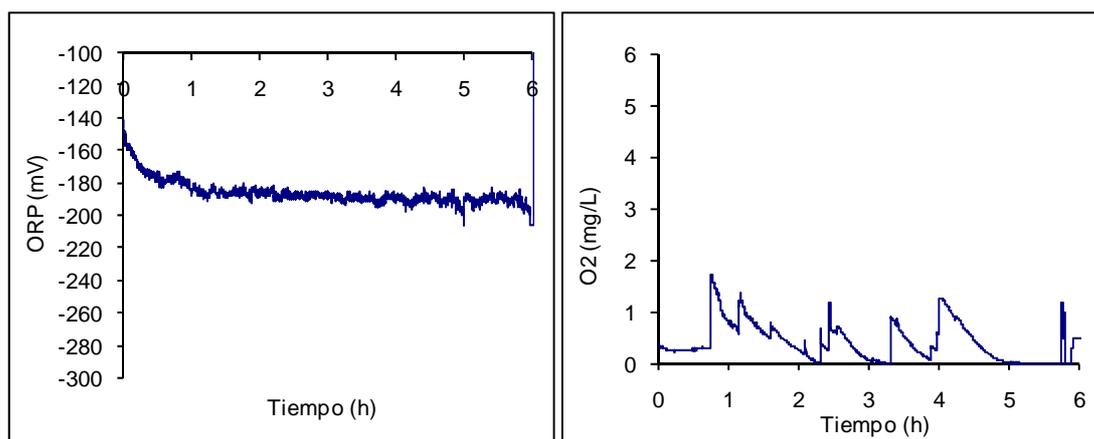
Para la determinación de carbono inorgánico el equipo acidifica y burbujea la muestra, de tal manera que el carbono presente como carbonatos y bicarbonatos es transformado en  $\text{CO}_2$  y de esta forma es cuantificado.



**Figura 3.13.** Seguimiento del carbono inorgánico durante las cinéticas realizadas a los diferentes flujos de aire ensayados.

Celis (2004), para un proceso sulfoxidante, utiliza un medio de cultivo en el que suministra una concentración de 1 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , la cual resulta equivalente a considerar (si estuviera disuelto) una concentración de 523 g/L de  $\text{CO}_2$ . Las lecturas de carbono inorgánico, que dan una idea del carbono disponible para las bacterias sulfoxidante se muestran en la [figura 3.13](#), las concentraciones de carbono inorgánico para los diferentes flujos evaluados se encuentran cercanas a las utilizadas por Celis (2004), en donde logró conversiones de sulfuro a azufre elemental cercanas al 70%, por lo que no le resulta limitante la fuente de carbono. De esta forma se podría esperar que para este proceso la etapa sulfoxidante no estuviera limitada por la fuente de carbono.

Por otra parte, con el apoyo del sistema de monitoreo, se registró el comportamiento del ORP y el oxígeno durante las cinéticas, los cuales dejaron ver un cierto patrón en la [figuras 3.14](#), se presentan los gráficos obtenidos al monitorear las cinéticas con flujos de 150 mL/(min·L).



**Figura 3.14** Comportamiento del ORP y oxígeno disuelto para la cinética realizada con un flujo de 150 mL/(min·L).

Los gráficos obtenidos con los otros flujos esencialmente tienen el mismo comportamiento, diferenciado por el valor del ORP (con referencia al electrodo de H<sub>2</sub>) en el que se mantienen en equilibrio en el transcurso de las cinéticas.

**Tabla 3.7.** ORP (electrodo de referencia) de equilibrio a los diferentes flujos evaluados

Flujo ml/(min·L)	ORP de equilibrio (mV)
150	-180
50	-200
25	-240
10	-300

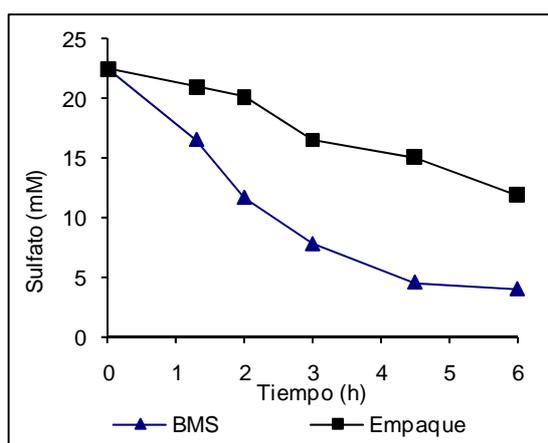
Más que la aparente relación entre el flujo de aire alimentado y el ORP, lo que es importante destacar de estas observaciones es que el ORP tiende hacia valores cada vez más negativos conforme ocurren las cinéticas y la acumulación del sulfuro. Janssen *et al.* (1998) reportaron una relación lineal entre el ORP y el logaritmo de la concentración de HS<sup>-</sup> en el intervalo de concentración de 0- 10 HS<sup>-</sup> mg/L. Además encontraron que para valores de ORP entre -137 y -147 mV se favorece la producción de azufre elemental. Cabe notar que en los experimentos realizados en esta tesis, nunca se alcanzaron estos valores, puesto que las concentraciones de sulfuro fueron significativamente más grandes. Por otro lado, en este trabajo coincide una reducción significativa de sulfato para las primeras horas, con una acelerada disminución del ORP y con las mayores concentraciones de azufre elemental, las cuales descienden cuando el ORP alcanza un aparente equilibrio.

Según Kleinjan *et al.* (2005) los anillos de azufre ( $S_8$ ) producidos biológicamente pueden reaccionar con sulfuro, de acuerdo a las siguientes ecuaciones ya que los iones de polisulfuro son fuertes nucleófilos y por lo tanto son capaces de abrir los anillos de  $S_8$ :



Al parecer el azufre producido bajo las condiciones experimentales de este trabajo se encuentra en un ambiente desfavorable y poco estable, como también lo predice el diagrama de zonas de predominio de especies [figura 1.4](#). Estos datos son importantes a tomar en cuenta en futuros trabajos de optimización.

La capacidad del lecho móvil (biomasa suspendida + biomasa en la biopelícula) para producir azufre elemental quedó demostrada a los 60 días de operación. Sin embargo, había que corroborar que esta misma actividad se presentara tanto en la biomasa suspendida como en la biomasa fija en el empaque. Por ello se procedió a determinar la actividad sulfoxidante ([tabla 3.5](#)) y sulfato reductora tanto para la biomasa suspendida como para la fija en el empaque ([figura 3.15](#)).



**Figura 3.15** Reducción de sulfato por la biomasa suspendida y por la biomasa inmovilizada en el empaque

Para sulfato reducción se encontró que las velocidades específicas fueron de 0.13 y 0.18 mmol  $SO_4^{2-}/(mg \text{ proteína}\cdot h)$ , para la biomasa suspendida y para el empaque, respectivamente. En las tablas 3.4 y 3.5 se muestra que también la biomasa adherida presentaba actividad sulfoxidante, a estos 60 días de operación se observó que la actividad sulfoxidante de la biomasa suspendida y de la biomasa en el empaque habían crecido, para las dos concentraciones de sulfuro probadas (0.5 y 4 mM), incluso para una concentración de sulfuro que podría ser inhibitoria, 4 mM de sulfuro.

### 3.2.2 Reactor sólo con biomasa fija

Los resultados anteriores permitieron determinar que el reactor con biomasa inmovilizada operaba adecuadamente, puesto que ya estaba colonizado, (figura 3.7) y presentaba las dos actividades: sulfato reductora y sulfoxidante (tabla 3.5 y figura 3.15). Por ello se retiró del reactor la biomasa suspendida, operándolo solamente con la biomasa fija del lecho móvil.

Se decidió utilizar una cantidad de sulfato tal que produjera como máximo 2 mM de sulfuro y como la reacción es uno a uno molar se decidió utilizar 2 mM de sulfato para la alimentación con una relación  $DQO/SO_4^{2-}=2$ .

Para esta etapa, el reactor operó en ciclos anaerobios y ciclos aerobios. Diariamente se realizaban 4 ciclos con duración de 6 horas cada uno, 3.5 horas para la fase anaerobia, 2.3 horas para la fase aerobia con un flujo de aire de 100 mL/(min·L<sub>reactor</sub>), y 7 minutos para la fase de vaciado y 3 para la fase de llenado

La primera cinética realizada al día siguiente de haber retirado la biomasa suspendida es mostrada en la figura 3.16

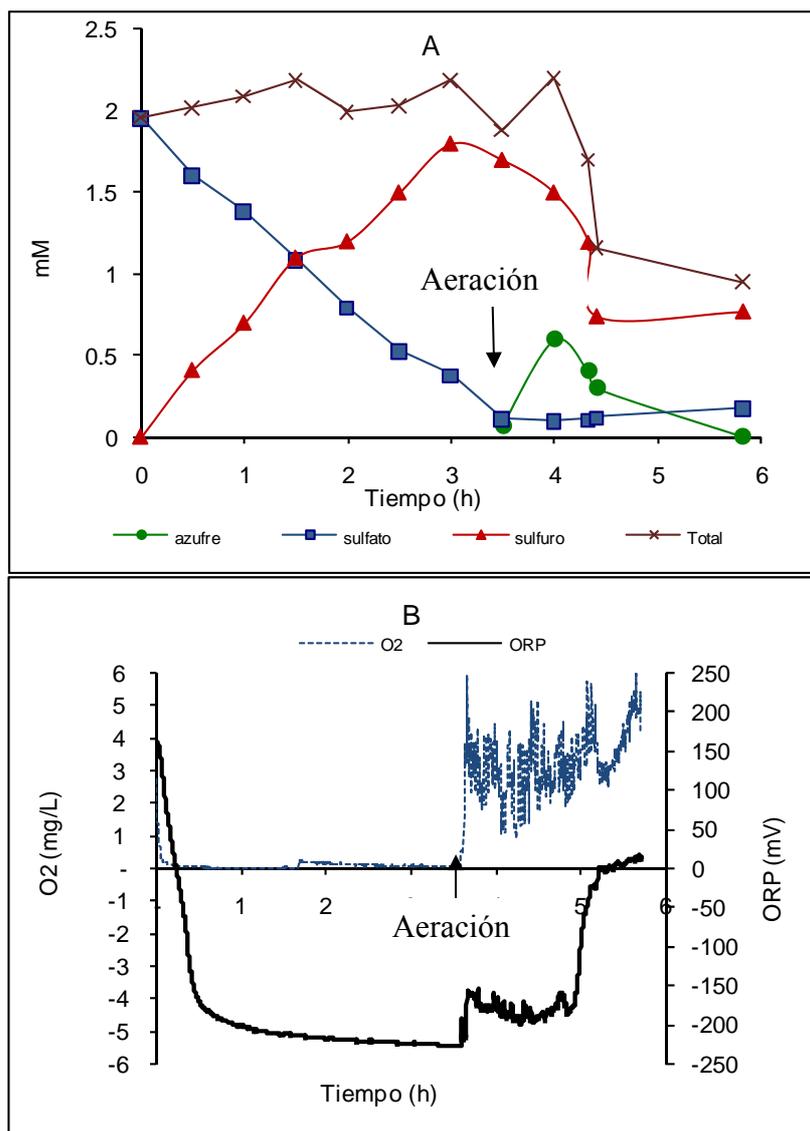


Figura 3.16 A) Seguimiento de especies azufradas cuando el reactor fue operado sólo con empaque con ciclos anaerobio/aerobio. B) Registro del oxígeno disuelto y el ORP.

Para la etapa anaerobia (primeras 3.5 h) se observó que el empaque tenía actividad sulfato reductora con una velocidad específica de  $0.051 \text{ mmol SO}_4^{2-}/(\text{g proteína}\cdot\text{min})$ , y logró reducir prácticamente el 100 % del sulfato en la fase anaerobia, convirtiéndose estequiométricamente en sulfuro. Para la etapa aerobia, la biomasa inmovilizada también fue capaz de producir azufre elemental, con una máxima producción de 0.6 mM, lo que representa una conversión máxima del 27 % con respecto al sulfato alimentado. Sin embargo, el balance total de azufre en la fase de aeración no fue completo, lo cual podría ser debido en parte al arrastre causado por la aeración. El sulfuro total cuantificado dentro de la

trampa correspondió a 0.7 mmoles, pero el total alimentado fue 3.2 y en el reactor al final de la reacción hubo 1.6, por lo que 0.9 mmoles no fueron detectados. Un hecho que resulta interesante resaltar es que en la fase de aeración el líquido dentro del reactor paulatinamente tomó una coloración verde amarilla característica de las soluciones que contiene polisulfuros, los cuales pueden aparecer en cuestión de minutos cuando una solución de sulfuro es aerada. El diagrama de la [figura 1.5](#) predice la formación de polisulfuros cuando el pH es cercano a 8 y el ORP superior a -200 mV. En esta cinética el pH estuvo entre 8.0-8.5 y registro del ORP mostrado en la [figura 3.16](#) muestra que el ORP osciló en el rango de -150 a -200 mV durante la etapa aerobia, lo cual constituye un argumento a favor de la posible formación de polisulfuros.

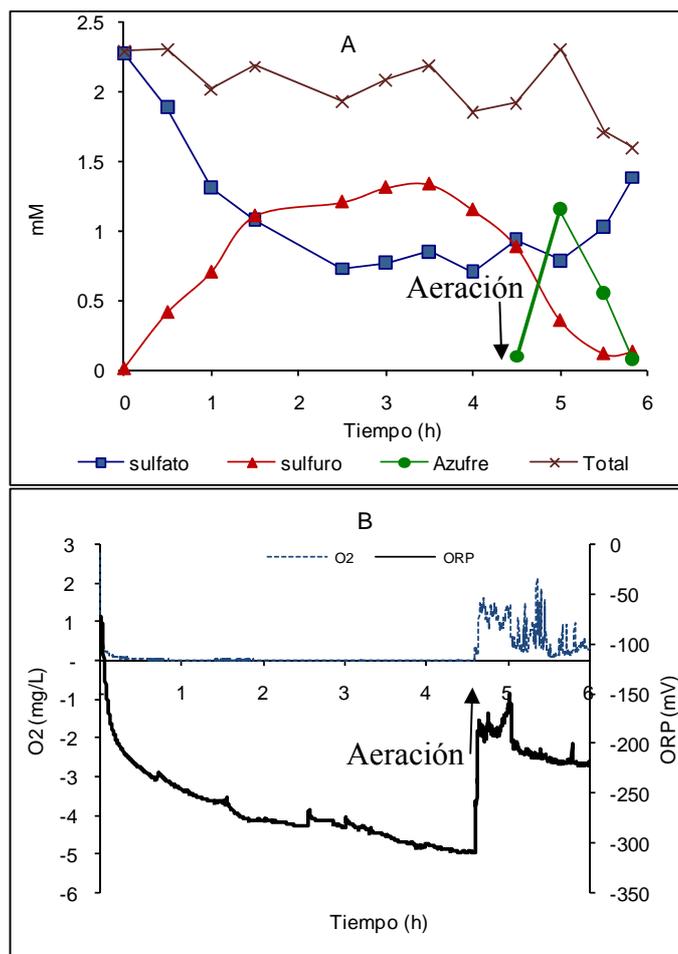
En las [figuras 3.17 y 3.18](#) se muestran, los resultados de las cinéticas realizadas para los días 8 y 15 después que el reactor operó solo con la biomasa fija. Para el día 8 se observó que la capacidad sulfato reductora había sido afectada, pues ahora el reactor se había sometido a ciclos aerobios en donde la concentración de oxígeno pudo alterar esta actividad, sin embargo, se seguía teniendo una reducción de sulfato cercana al 70%, con una velocidad específica de  $0.04 \text{ mmol SO}_4^{2-}/(\text{g proteína}\cdot\text{min})$ , en la etapa aerobia el azufre elemental máximo cuantificado fue de 1.1 mM que representa una conversión cercana al 52% con respecto al sulfato alimentado.

Un aspecto importante de mencionar fue que en la etapa aerobia la concentración de sulfuro decreció de manera rápida, manteniéndose así durante la misma, pero el sulfato que había llegado a un mínimo (0.5 mM) al final de la etapa anaerobia, durante la etapa aerobia se regeneró, como producto de la oxidación del sulfuro, reacción catalizada por las bacterias sulfoxidante, este hecho es importante, puesto que está reportado que la oxidación química de sulfuro hasta sulfato ocurre muy lentamente, incluso durante 2 días en los que ha sido aereada de manera constante una solución de sulfuro, no se detecta la producción de sulfato (González

y Revah, 2007), por lo que el incremento en la etapa aerobia del sulfato solo pudo ser debido a la actividad de las bacterias sulfoxidante. Esta misma regeneración de sulfato no se observó en la cinética realizada el primer día de operación del reactor sólo con biomasa inmovilizada, [figura 3.16](#), aún cuando en ésta se registraron mayores concentraciones de oxígeno durante la etapa aerobia, lo cual es una muestra de la evolución de la capacidad oxidante de las bacterias.

El comportamiento del reactor para el día 15 de operación no mostró ser significativamente diferente al registrado anteriormente para la etapa sulfato reductora, en la etapa aerobia, se observa que la oxidación de sulfuro es más rápida, puesto que después de 30 minutos de haber iniciado la aeración el sulfuro ya había disminuido prácticamente a 0, mientras que en la cinética anterior, este valor se alcanzó luego de una hora, esto podría explicarse nuevamente en términos de la evolución de la capacidad oxidante de las bacterias, observándose nuevamente la oxidación completa de sulfuro hasta sulfato, aunque la producción de azufre aparentemente disminuyó, pues la máxima producción ahora fue de 0.5 mM.

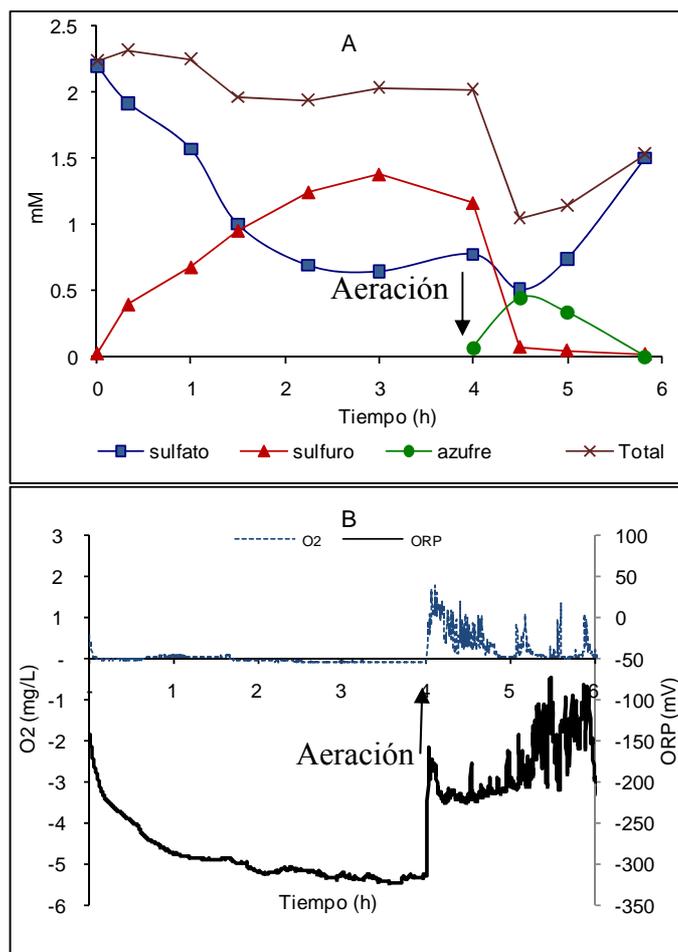
La tabla 3.5 muestra como fue aumentando la actividad sulfoxidante medida 0.5 mM de sulfuro, en cada una de las etapas de operación del reactor, pasa de 0.22 hasta  $3.25 \mu\text{molO}_2/(\text{min}\cdot\text{mg proteína.})$  del día 60 al día 75, lo cual corrobora lo observado en las cinéticas registradas ([figuras 3.16-3.18](#)) en cuanto a la etapa aerobia de sulfoxidación.



**Figura 3.17** A) Seguimiento al día 8 de especies azufradas cuando el reactor fue operado sólo con empaque con ciclos anaerobio/aerobio. B) Registro del oxígeno disuelto y el ORP.

Sin embargo la regeneración de sulfato para nuestro proceso es una reacción que no se desea, aspecto en el que para futuros trabajos habría de implementarse un control de la aereación, para limitar la concentración de oxígeno.

En las tres cinéticas y durante la operación misma del reactor, el registro del ORP (valor de referencia) marcó valores cercanos (-200 a -150 mV, para la etapa aerobia) a los mencionados por Janssen *et al.* (1998), con relación al intervalo en el que encontraron que se favorecía la producción de azufre elemental (-137 y -147 mV), mismos valores que predicen estabilidad del azufre elemental en el diagrama de predominio de especies (figura 1.5).



**Figura 3.18** A) Seguimiento al día 15 de especies azufradas cuando el reactor fue operado sólo con empaque con ciclos anaerobio/aerobio. B) Registro del oxígeno disuelto y el ORP.

En relación a la cantidad de azufre elemental cuantificado en todos los experimentos de esta tesis y al balance total de azufre, se debe mencionar que en ninguno de los experimentos fue cuantificado el azufre elemental que los microorganismos pudieran retener en el interior de sus células, este es otro hecho que pudo haber influido en el balance total de azufre.

## CAPÍTULO 4

### CONCLUSIONES

La relación DQO/  $SO_4^{2-}$  tiene un papel importante para el establecimiento de un proceso sulfato reductor, la relación estequiométrica no es la mejor para que en un proceso en lote se lleve a cabo. Lo anterior se debe a la existencia de bacterias sulfato reductoras que oxidan parcialmente el lactato, produciendo acetato y este no necesariamente es oxidado hasta  $CO_2$ , condición que tendría que ocurrir para aprovechar todos los electrones que se producen en su oxidación y de esta manera ser aprovechados para la reducción completa de sulfato. Por lo que es necesario un exceso de la fuente de carbono y de electrones, en este trabajo se observó que esto puede lograrse utilizando relaciones DQO/  $SO_4^{2-}$  cercanas a 2, puesto que con ésta puede alcanzarse eficiencias del 92% en la reducción de sulfato con velocidades de 0.51 mM/(g SSV h).

Se encontró que el proceso sulfato reductor no muestra inhibición por sulfuro aún cuando la concentraciones de éste sea 15 mM,

A partir de lodos provenientes de una planta de tratamiento de agua residual fue posible desarrollar y acoplar un proceso sulfato reductor- sulfoxidante, en el que se logró producir azufre elemental a partir de sulfatos.

Se observó que el estado redox del sistema es esencialmente dominado por la concentración de sulfuro, sin embargo, aunque se tuvieron eficiencias cercanas al 100% en la conversión de sulfato a sulfuro, se encontró que éstas mismas pueden no ser favorables para la producción de azufre elemental.

Fue posible acoplar los procesos sulfato reductor y sulfoxidante para la producción de azufre elemental en un mismo reactor. Además fue posible que las bacterias

responsables de estos procesos colonizaran el empaque plástico y produjeran azufre elemental. Esto hace factible la producción de azufre por métodos biológicos en un reactor de lecho móvil discontinuo.

### Recomendaciones

Como lo predicen los diagramas de zonas de predominio de especies, el azufre parece estable sólo a ORP cercanos a -200 mV y pH inferiores a 8, aunque esto es una desventaja podría convertirse en una herramienta para la aplicación de una técnica de control, basada en el monitoreo de ORP. Ésta indicaría cuando la producción de sulfuro deberá ser detenida, para maximizar la producción de azufre y evitar que se siga oxidando. Esta condición puede basarse en la aplicación de un reactor alimentado, en el que únicamente debería suministrarse una cantidad de sulfato limitada, con la que no se alcanzarán producciones excesivas de sulfuro, y dando oportunidad para que éste se oxide hasta azufre elemental.

Sería útil el probar sustratos alternos a lactato, como acetato o propionato ya que éstos son más probables de encontrar en un agua residual real.

Se recomienda medir otras especies azufradas, como sulfito, tiosulfato, tetracionatos y polisulfuros, para permitir un mayor entendimiento del proceso.

Se debe tener especial cuidado en el suministro de oxígeno ya que un exceso del mismo, puede causar pérdida en la actividad de las bacterias sulfato reductoras que esencialmente son anaerobias.

## REFERENCIAS

- Andreottola, G., Foladori, P., y Ragazzi, M. (2000) Upgrading of a small wastewater treatment plant in a cold climate region using a moving bed biofilm reactor (MBBR) system. *Water Sci. Technol.* **41**(1): 177-185
- APHA-AWA-WPCF, (1995). *Standar methods for the examination of water and wastewater*, 19a. edición, American Public Health Association, Washington, D.C., U.S.A.
- Atlas R. M and Bartha R. Microbial Ecology 1993 fundamental and application Third edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. Pp 234-235.
- Barlett, J.K y Scoog, D.A (1954). Colorimetric determination of elemental sulphur in hydrocarbons. *Anal. Chem.* **26**: 1008-10011.
- Bernardes, R. S., Klapwijk, A. (1996) Biological nutrient removal in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Sci. Technol.*, **33** (3), 29.
- Buisman, C., Dijkman, H., Prins, W., Verbraak, P., y den Hartog, H. (1994) Biological (flue) gas desulphurization. *Lucht* . **4**:135-137.
- Buisman, C. J. N. Ijspeert, P., Hof, A., Janssen, A.J.H., R. y Lettinga, G. (1991). Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur oxygen. *Biotech. Bioeng.* **38**: 813-820.
- Brüser, T., Lens, P and Truper, H. (2000). The biological sulfur cycle. In: *Enviromental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens P., y Hulshoff Pol L., (Ed.). International Water Asociation. Londres, pp. 47-85.
- Burguess, J. E. y Stuetz, R.M. (2002) Activated sludge for the treatment of sulphur-rich wastewater. *Minerals eng.* **15**: 839-846.
- Buitrón G., Betancur M., Moreno J., and Moreno J. (2003). Oxidation-Reduction potencial as a control variable for the anaerobic stage p-nitrophenol degradation. *Biotechnology Progress.* **19**: 1822-1828.
- Cadena, F., y Peter R.W. (1988). Evaluation of chimcal oxidizer for hydrogen sulfide control. *JWPCF.* **60**:1259-63.
- Celis García María de Lourdes Berenice (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis de doctorado en Biotecnología, UAM-Iztapalapa, diciembre.

Chozick, R. Irvine, R. L. (1991) Preliminary Studies on the Granular Activated Carbon-Sequencing Batch Biofilm Reactor. *Environ. Prog.*, **10**: 282.

El Bayoumy, M.A., Bewtra, J.K., Ali, H.I., Biswas, N. (1999). Sulphide production by sulphate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. *Water, air and soil pollution*. **112**: 67-84.

Gadre, R.V (1989). Removal of hydrogen sulfide from biogas by chemoatotropic fixed-film bioreactor. *Biotech. Bioeng.* **34**: 410-414.

González, A. y Revah, S. (2007), The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 292-298

González Blanco Gehovana (2006). Conversión de sulfato a azufre elemental en un reactor de lecho fluidificado inverso bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto. Tesis de Maestría en Biotecnología, UAM-Iztapalapa.

González Martínez, S. (1996) Biopelículas aerobias en tratamiento de aguas residuales. Memorias del Tercer Simposio Internacional sobre Control de Polución de Aguas por Procesos Biológicos, organizado por la Asociación Venezolana de Ingenieros Sanitarios y Ambientales y la Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela, del 6 al 9 de febrero.

Hammond, C.A. (1986). The Dow Stretford Chemical Recovery Process. *Environ. Progr.* **5**:1-4.

Heisel, M.P., Marold, F.J. (1987). New gas scrubber removes H<sub>2</sub>S. *Hydrocarbon Process.* Abril. 35-37.

Ingvorsen, K., Nielsen, M., Joulian, C. (2003) Kinetics of bacterial sulfate reduction in a activated sludge plant. *FEMS Microbiology Ecology*. **46**: 129-137.

Janssen, A.J.H., Meijer, S., Bontsema, J y Lettinga, G. (1998). Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **60**: 147-155.

Jensen, A.B. y Webb, C. (1995). Treatment of H<sub>2</sub>S-containing gases: a review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Technol.* **17**: 2-10.

Kaksonen, A., Franzmann, P y Puhakka J (2004). Effects of Hydraulic Retention Time and Sulfide Toxicity on Ethanol and Acetate Oxidation in Sulfate-Reducing Metal- Precipitating Fluidized-Bed Reactor. *Biotech Bioeng.* **86**, 3: 332-343

Kelly, D. (1999). Thermodynamic aspects or energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch Microbiol.* **171**: 219-229.

Kleinjan, W., de Keizer, A., and Janssen, A., (2005) Kinetics of the Reaction between Dissolved Sodium Sulfide and Biologically Produced Sulfur. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**: 309-317.

Lowry, O.H. Roserbrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Mace, S., y Mata-Alvarez, J. (2002). Utilization of SBR Technology for Wastewater Treatment: An Overview. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **41**: 5539-5553

Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, (2004). Brock biología de los microorganismos, 10<sup>a</sup> ed. Madrid. Pp 571-573: 395-397,

Maree, J.P. y Strydon, W.F (1985). Biological sulfate removal in an upflow packed bed reactor. *Wat. Res.* **19**(9): 1101-106.

Matin, A (1978). Organic nutrition of chemolitotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**: 433-469.

Metcald y Eddy (2003). Wasterwater Engineering Treatment and Reuse. Mc. Graw Hill. Four edition. Pp 64, 720-722.

Ødegaard H (2000) Advanced compact wastewater treatment based on coagulation and moving bed biofilm processes *Wat. Sci. Tech.* **42**(12): 33-48.

Ødegaard, H., Rusten B. and Westrum T. (1994) A new moving bed biofilm reactor- Applications and result. *Wat. Sci. Tech.* Vol. **29**: 157-165

Ødegaard, H., Rusten, B., Westrun, T. (1993) A new moving bed biofilm reactor - Applications and results. Proceedings IAWQ 2<sup>nd</sup> International Conference on Biofilm Reactors, Paris, Sept. 29-Oct. 1, p. 221

Polanco, F. y García, E. P. (2006). Aplicacion of biological treatment systems for sulfate-rich wastewaters In: Advance Biological Treatment Processes for Industrial Wastewater. Cervantes, F.J., Pavlostathis S.G. y Haandel, A.C. van., IWA Publishing, pp 213-223.

Reis, M. A. M., Almeida, J.S., Lemos, P.C. y Carrondo (1992) Effect of Hidrogen sulfide on Growth of Sulfate Reduccion Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering.* **40**: 593-600.

- Roberson, L.A. y Keunen, J.G. (1992). The colorless sulfur bacteria. En: *The prokariotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, (Barlows, A., Trüper, H.G., Dworking, M., Harder, W., Schliefer, H.K., eds.) Segunda edición. Springer Verlag, New York. Vol. 1, 385-413.
- Rodgers, M., Zhan, X.M. (2003). Moving-medium biofilm reactors *Environmental Science and Bio/Technology*. **2**: 213-224
- Rusten, B., Neu, K. (1999) Moving-bed Biofilm Reactor move into the small-flow treatment arena. *Water Environment and Technology*, **67** (1): 27-33.
- Schütz, M., Klughammer, C., Griesbeck, Ch., Quentmeier, A., Friedrich C. G., Hauska, G. (1998). Sulfide-quinona reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17. *Arch Microbiol.* **170**: 353-360.
- Speece, R.E (1983) Anaerobic biotechnology for industrial wastewater. *Env. Sci. Technol.* **17**: 416A-427A.
- Stefeas, G., Torremans, A., Schrijver, R., Robertson, L. y Kuenen, J. (1996) Quantitive measurement of sulphur formation by steady-state an transient state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 169-175.
- Stuedel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. In: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L y Hulshoff Pol, L. (Ed.). International Water Asociation. Londres, pp. 1-31.
- Suzuki, I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* **45**: 97-105.
- US-Peroxi (2000). Sulfide oxidation using hidrogen peroxi. (<http://www.h2o2.com/applications/industrialwastewater/sulfideoxidation.html>.)
- Visser, JM., De Jong, GHA., Robertson, LA., Keunen, JG. (1997). A novel membrane-bound flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* **167**: 295-301.
- Van de Ende, P.F., Meier, J. and van Germenden, H. (1997) Syntrophic growth of sulphate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxigen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 65-80.
- Van Germerden, H. (1984). The sulfide affinity of phototrophic bacteria in relation to the location or elemental sulfur. *Arch Microbiol.* **139**: 289-294.

Zwenger, W., Beler Baykal, B., Wilderer, P. A. (2000) Application of granular zeolite as support material for biofilms and as temporary sink for ammonium. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Sequencing Batch Reactor Technology*, IWA Publishing: London. 1: 92-101.

[http://www.ny.anox.se/eng/b2\\_2\\_barare.htm](http://www.ny.anox.se/eng/b2_2_barare.htm).

<http://www.aqwise.com/new/page.asp?cat=155&type=2&lang=1>

## PUBLICACIONES

A continuación se mencionan las publicaciones generadas de este trabajo:

**Gastón Martínez**, Jaime González, Gloria Moreno y Germán Buitrón. TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS CON SULFATO MEDIANTE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS Y SULFOXIDANTE Presentado en el XVI Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. Ciudad de México, 2008.

**Gastón Martínez**, Jaime González, Gloria Moreno y Germán Buitrón. 2007. ACLIMATACIÓN EN LOTE DE LODOS SULFATO REDUCTORES". Presentado en XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Morelia 2007.

Jaime González, **Gastón Martínez**, Gloria. Moreno, Mónica Meraz y Germán. Buitrón, 2008, "ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN UN REACTOR SECUENCIAL DISCONTINUO CON LA MANIPULACIÓN DE LA RELACIÓN  $DQO/SO_4^{-2}$  Y ALTA CONCENTRACIÓN DE SULFURO". Presentado en el XVI Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. Ciudad de México, 2008.