

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

División de Ciencias Ambientales

**Evaluación del desarrollo de la actividad sulfatorreductora
en un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños**

Tesis que presenta
Belem Espinosa Chávez

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS

Con opción Terminal en
Ciencias Ambientales

Directora de tesis:
Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García

Asesores:
Dr. Elías Razo Flores y Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2007



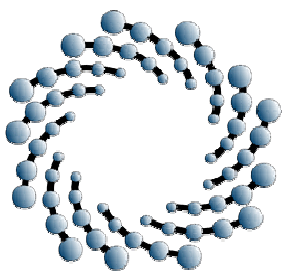
IPICYT

La tesis “Evaluación del desarrollo de la actividad sulfatorreductora en un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por la I.B.I. Belem Espinosa Chávez y aprobada el 5 de Diciembre de 2007 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García
(Directora de Tesis)

Dr. Elías Razo Flores
(Asesor de la tesis)

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

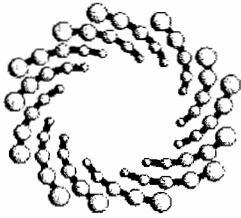


IPICYT

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ma. de Lourdes Celis García y la asesoría de los doctores Elías Razo Flores y Francisco Javier Cervantes Carrillo.

El trabajo experimental fue financiado por el proyecto CONACYT-Fondos Sectoriales (SEP-2004-01-46506), otorgado al Dr. Elías Razo Flores. Durante su realización la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-203327)

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



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta Primero del Libro 017 de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de diciembre del año 2007, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo	Secretario	IPICYT
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Belem Espinosa Chávez

sobre la Tesis intitulada:

Evaluación del Desarrollo de la Actividad Sulfatorreductora en Lodo Granular Metanogénico de Diferentes Tamaños

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:48 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de diciembre de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonifa Marín
Secretario Académico



A la memoria de mi Padre[†]

Agradecimientos

Al IPICYT y CONACYT por la beca otorgada para la realización de la tesis de maestría.

Un agradecimiento a los miembros del jurado por la revisión y sugerencias realizadas para mejorar el documento, especialmente a la Dra. Celis, al Dr. Razo y al Dr. Cervantes por sus críticas y comentarios durante el desarrollo experimental de esta tesis.

Asimismo quiero agradecer a la M. en C. Dulce Partida, al Dr. Felipe Alatríste y a Víctor Mata la amistad brindada.

Mi agradecimiento infinito a Bere y Elías por todo el apoyo intelectual y afectivo, además de las muestras de amistad durante momentos difíciles de mi vida.

A mi familia (Bertha, Jerónimo, Margarita, Armando, Marisela, Daniel y Griselda) por el apoyo y muestras de cariño.

Finalmente un agradecimiento muy especial a mi madre Silvia por su gran fortaleza, por alentarme a conseguir mis objetivos y por todo lo que ha sido.

Contenido

Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vii
Nomenclatura	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Reactor UASB (Upflow anaerobic sludge blanket)	3
1.1.2 Lodo granular	5
1.1.3 Teorías y modelos de granulación anaerobia	7
1.1.3.1 Enfoque físico de la granulación anaerobia	7
1.1.3.2 Enfoque microbiano de la granulación anaerobia	10
1.1.3.3 Enfoque termodinámico de la granulación anaerobia	14
1.1.4 Degradación anaerobia	14
1.1.5 Bacterias Sulfatorreductoras (BSR)	17
1.1.6 Sulfatorreducción	20
1.1.7 Competencia entre las BSR y microorganismos metanógenos (MM)	22
1.1.8 Bacterias sulfatorreductoras en lodo granular	24
1.2 Estructura de la tesis	27
Capítulo 2. Materiales y métodos	28
2.1 Materiales	28

2.1.1	Fuente de biomasa	28
2.1.2	Reactores anaerobios UASB	28
2.2	Medios de cultivo	29
2.2.1	Medio de alimentación de los reactores	29
2.2.2	Medio para determinar la actividad metanogénica específica (AME)	30
2.2.3	Medio para determinar la actividad sulfatorreductora específica (ASRE)	30
2.2.4	Medio de cultivo para determinar el número más probable de BSR	31
2.2.5	Solución buffer de fosfatos pH 7.0	31
2.2.6	Medio para la determinación de los parámetros cinéticos	31
2.2.7	Medio para fijar los gránulos en cajas Petri	32
2.3	Métodos	32
2.3.1	Separación de las diferentes fracciones de lodo granular	32
2.3.2	Determinación del NMP de BSR en las fracciones de lodo	33
2.3.3	Determinación de la actividad metanogénica específica (AME)	33
2.3.4	Determinación de la actividad sulfatorreductora específica (ASRE)	35
2.3.5	Determinación de parámetros cinéticos	37
2.3.6	Operación de los reactores	37
2.3.7	Determinación del diámetro promedio de los gránulos mediante análisis de imagen	39
2.4	Análisis	40
2.4.1	Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)	40

2.4.2	Demanda química de oxígeno (DQO)	40
2.4.3	Determinación de sulfuro en el efluente de los reactores	40
2.4.4	Determinación de sulfuro por el método de Cord-Ruwisch	41
2.4.5	Determinación de sulfato y ácidos grasos volátiles (AGV)	41
2.4.6	Determinación de alcalinidad en los reactores	42
2.4.7	Determinación de pH	42
2.5	Cálculos	42
2.5.1	Parámetros de operación de los reactores	42
2.5.2	Equivalencia teórica de las diferentes fuentes de carbono en términos de DQO	43
2.5.3	Determinación de las actividades metanogénica y sulfatorreductora	43
2.5.4	Velocidad de conversión de DQO	44
2.5.5	Cuantificación de sulfuro disuelto	45
2.5.6	Factor de conversión de sulfuro a sulfato	45
2.5.7	Porcentaje de DQO removido	45
2.5.8	Porcentaje de DQO removido por BSR	45
2.5.9	Porcentaje de DQO removido por MM	46
2.5.10	Cuantificación del número más probable de BSR	46
2.5.11	Ecuaciones para determinar los parámetros cinéticos (K_s) y (q_{max})	46
Capítulo 3. Resultados		47
3.1	Determinación del diámetro de gránulo y contenido de SSV en las fracciones de lodo granular	47
3.2	Parámetros cinéticos (K_s y q_{max}) en las diferentes fracciones del lodo	48

granular	
3.3 Desempeño de los reactores en continuo	51
3.4 Caracterización del lodo granular antes de inocular los reactores y en el transcurso de los periodos de operación	59
3.4.1 Sólidos suspendidos volátiles, cenizas y diámetro promedio	60
3.4.2 Cuantificación del número más probable de las bacterias sulfatorreductoras	62
3.5 Caracterización de las fracciones de lodo mediante pruebas de actividad	64
3.5.1 Actividad sulfatorreductora	64
3.5.2 Actividad metanogénica	68
3.6 Diámetro promedio de los gránulos	72
Capítulo 4. Discusión	75
4.1 Parámetros cinéticos	75
4.2 Número más probable de bacterias sulfatorreductoras	77
4.3 Pruebas de actividad específica	79
4.4 Distribución de diámetro de gránulos en las fracciones y características físicas	82
4.5 Desempeño de los reactores UASB	84
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones	88
Capítulo 6. Referencias bibliográficas	90
ANEXO 1 Análisis de varianza simple	100
ANEXO 2 Seguimiento de los reactores	101

Índice de Tablas

Tabla 1.1	Revisión de las diferentes teorías sobre la granulación anaerobia	8
Tabla 1.2	Reacciones metabólicas sulfatorreductoras involucradas en la degradación de la materia orgánica y sus cambios de energía libre de Gibbs	18
Tabla 1.3	Uso de BSR en aplicaciones biotecnológicas	20
Tabla 1.4	Factores determinantes en la competencia entre los MM y las BSR en reactores de alta tasa	24
Tabla 2.1	Composición de la solución de elementos traza	30
Tabla 2.2	Condiciones de operación de los reactores UASB en los diferentes periodos experimentales	38
Tabla 3.1	Propiedades físicas del lodo granular sin fraccionar (LG) y de las diferentes fracciones de lodo usadas como inóculo	48
Tabla 3.2	Parámetros cinéticos con etanol y lactato en las diferentes fracciones de lodo granular a partir de la producción de sulfuro	50
Tabla 3.3.	Parámetros cinéticos, calculados a partir de la producción de metano con etanol y lactato en las diferentes fracciones de lodo granular bajo condiciones sulfatorreductoras	51
Tabla 3.4	Condiciones de operación de los reactores, producción de sulfuro y eficiencias de remoción promedio en los periodos II, III y IV	55
Tabla 3.5	Condiciones de operación de los reactores, producción de sulfuro y eficiencias de remoción promedio en el periodo V	57

Tabla 3.6	Comparación del contenido de SSV, cenizas (SF) y diámetro promedio antes de inocular y al término de la operación en continuo	60
Tabla 3.7	NMP-BSR determinado en las fracciones de lodo antes de inocular y después de operar los reactores con lactato o acetato como substratos	64
Tabla 3.8	Comparación de la ASRE en las fracciones de lodo antes de inocular los reactores UASB y durante la operación de los reactores en continuo en los periodos señalados	66
Tabla 3.9	Comparación de la AME en las fracciones de lodo antes de inocular los reactores UASB y durante la operación de los reactores en continuo en los periodos señalados	70
Tabla 3.10	Comparación de la distribución del diámetro de los gránulos contenidos en las fracciones de lodo granular bajo diferentes condiciones de operación	73

Índice de Figuras

Figura 1.1	Procesos de conversión intracelular y consorcios microbianos en los sistemas anaerobios	7
Figura 1.2	Representación esquemática del modelo del núcleo inerte: ●) Núcleo inerte, ○) Bacterias individuales	9
Figura 1.3	Representación esquemática del modelo de la capa múltiple	12
Figura 1.4	Modelo de granulación anaerobia propuesto por Ahn (2000)	13
Figura 1.5	Competencia entre las BSR, MM y BA por el substrato durante la degradación anaerobia de la materia orgánica	16
Figura 1.6	El ciclo biológico del azufre	17
Figura 2.1	Representación esquemática del arreglo experimental de los reactores UASB	29
Figura 2.2	Representación esquemática del equilibrio de la fase gaseosa con la presión atmosférica	34
Figura 2.3	Representación de la determinación del sulfuro en las pruebas de ASRE y obtención de la pendiente a partir de la curva obtenida al graficar la producción de sulfuro con respecto al tiempo	36
Figura 3.1	Curva tipo Monod y su correspondiente ajuste lineal mediante el modelo descrito por Hanes	49
Figura 3.2	Fotos obtenidas con un estereoscopio (paneles superiores) e imágenes adquiridas con el escáner, de los gránulos fijados en grenetina	52
Figura 3.3	Porcentajes de DQO utilizado en cada periodo de operación (II, III, IV y V) en los diferentes reactores (R1 a R4) por BSR,	54

	por MM y eficiencia de remoción de DQO	
Figura 3.4	Velocidad de producción de sulfuro promedio en los diferentes días de operación en continuo de los reactores (R1, R2, R3 y R4)	56
Figura 3.5	Eficiencia de remoción de sulfato en los diferentes periodos de operación de los reactores	59
Figura 3.6	Porcentaje de SSV con respecto al diámetro de gránulo en cada una de las fracciones de lodo antes de inocular los reactores y a los 236 días de operación en continuo	61
Figura 3.7	Comparación de las series de diluciones en la cuantificación de las BSR mediante el NMP de la fracción B antes de inocular y al término de operación de los reactores	62
Figura 3.8	Comparación de ASRE antes de inocular los reactores en cada una de las fracciones de lodo granular y LG sin fraccionar con diferente fuente de carbono	67
Figura 3.9	Comparación de la ASRE de las diferentes fracciones con mezcla etanol-lactato y etanol antes de inocular los reactores y después de 196 días de operación en continuo	68
Figura 3.10	Comparación de la AME de las fracciones con acetato y mezcla etanol-lactato antes de inocular y después de 196 días de operación en continuo de los reactores 1-4	71
Figura 3.11	Distribución del diámetro de los gránulos antes de inocular los reactores (fracciones) y al término de la operación en continuo de los reactores UASB	74

Nomenclatura

AGV	Ácidos grasos volátiles
AME	Actividad metanogénica específica
ASRE	Actividad sulfatorreductora específica
BA	Bacterias acidogénicas
BESA	Ácido 2-bromoetanosulfónico
BF	Bacterias fermentativas
BSR	Bacterias sulfatorreductoras
BSRA	Bacterias sulfatorreductoras acetotróficas
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO/SO₄²⁻	Relación DQO / sulfato (g/g)
H₂S	Sulfuro de hidrógeno
K_s	Constante de afinidad por el sustrato (g DQO/L)
LG	Lodo granular
MM	Microorganismos metanógenos
MMA	Microorganismos metanógenos acetótrofos
NMP	Número más probable
q_{max}	Velocidad máxima de utilización del sustrato (g DQO/g SSV-día)
R	Reactor
SF	Sólidos fijos (cenizas)
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket (lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente)
Ø	Diámetro

Espinosa Chávez, Belem (2007). Evaluación del desarrollo de la actividad sulfatorreductora en un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

Resumen

En reactores de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) se han evaluado diversas estrategias para obtener un lodo granular sulfatorreductor a partir de un lodo granular metanogénico, dada la diversidad de microorganismos presentes en el lodo, los cuales se encuentran en forma de agregados o gránulos. Entre las estrategias para obtener un lodo sulfatorreductor se encuentran la inhibición de los microorganismos metanógenos, bioaumentación mediante la adición de cultivos puros de bacterias sulfatorreductoras (BSR) y la modificación de diferentes condiciones de temperatura, pH y substrato para favorecer a la población de BSR presentes en el lodo. Sin embargo, se requiere de prolongados periodos para obtener una biomasa completamente sulfatorreductora. En el presente trabajo se evaluó el efecto del diámetro de gránulo en la obtención de lodo sulfatorreductor en reactores UASB inoculados con lodo granular metanogénico. Las diferentes fracciones de lodo se caracterizaron mediante pruebas de actividad específica y NMP. El diámetro promedio se determinó mediante el análisis de imagen. Se evaluó el desempeño de cuatro reactores inoculados con el lodo original (R1) y con las fracciones de mayor a menor tamaño (R2 a R4) respectivamente al usar una mezcla etanol-lactato o etanol. Se obtuvieron tres fracciones de lodo granular con tamaño promedio de 3.0, 2.5 y 1.7 mm a partir de un lodo granular metanogénico (2.7 mm). La actividad metanogénica de las fracciones con la mezcla etanol-lactato fue mayor a medida que aumentó el tamaño de gránulo de 0.53 a 0.62 g DQO-CH₄/g SSV-d. La actividad sulfatorreductora con etanol fue menor a medida que aumentó el diámetro de gránulo (0.24, 0.36 y 0.58 g DQO-H₂S/g SSV-d). Las fracciones de lodo presentaron mayor K_s con lactato (0.34, 0.14, 0.43 y 0.11 g DQO/L) pero mayor q_{max} con etanol (0.29, 0.17, 0.25 y 0.35 g DQO-H₂S/g SSV-d). Durante los 236 días de operación se varió el TRH (de 1 a 0.66 d), la relación DQO/SO₄²⁻ (de 1.34 a 0.67) y la fuente de carbono (mezcla de etanol-lactato o etanol). La remoción de DQO de los cuatro reactores fue mayor a 88%. Después de 66 días de operación, el R4 inoculado con la fracción más pequeña (1.7 mm) presentó mejor desempeño sulfatorreductor, la concentración de sulfuro fue de 106 mg/L y la DQO removida por BSR fue 9.7%. Al final de la operación (236 d) las eficiencias de remoción de SO₄²⁻ en los reactores 1-4 fueron de 11.85, 10.58, 10.94 y 13.66% y la concentración de sulfuro fue de 122.5, 107.9, 113.4 y 141.1 mg H₂S/L, respectivamente. Al inicio del experimento la cuantificación del NMP con lactato y acetato presentó una relación directa con el diámetro de gránulo, mientras que al término de la operación no se observó la misma tendencia, el orden de magnitud inicial fue de 10⁶ y 10² y al final fue de 10¹³ y 10⁵ de NMP-BSR/g SSV con lactato y acetato, respectivamente. El contenido de SSV disminuyó de 13 a 9% en promedio así como el diámetro de gránulo que al final fue de 2.7, 2.3, 1.7 mm en las fracciones y de 2.44, mm en el lodo original. El desempeño de los reactores no presentó una relación directa con el contenido de BSR en el lodo; sin embargo el diámetro de gránulo tuvo una ligera influencia en la eficiencia de remoción de DQO por las BSR y producción de H₂S.

Espinosa Chávez, Belem (2007). Development evaluation of the sulfate reducing activity in a methanogenic granular sludge of different size. Master of Science Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, México

Abstract

Different strategies to obtain a sulfate reducing sludge from a methanogenic one have been evaluated in upflow anaerobic sludge bed reactors (UASB), due to the diversity of microorganisms in the granular sludge, which develop into aggregates or granules. The inhibition of methanogenic microorganisms, bioaugmentation with pure cultures of sulfate reducing bacteria (SRB) and the modification of different conditions of temperature, pH and substrate are among the strategies to obtain a sulfate reducing sludge. However, long time periods are required before a sulfate reducing biomass could be obtained. In the present work it was evaluated the effect of the granule diameter over the development of a sulfate reducing granular sludge in UASB reactors inoculated with methanogenic granular sludge. The different fractions of sludge were characterized by specific activity and most probable number of SRB tests. The mean diameter was determined by imaging analysis. The performance of four reactors inoculated with the original sludge (R1) and the fractions from big to small (R2 to R4), respectively was evaluated using a mixture of ethanol-lactate or ethanol. Three granular sludge fractions were obtained with a mean diameter of 3.0, 2.5 and 1.7 mm, from the granular methanogenic sludge (2.7 mm mean diameter). The methanogenic activity of the fractions with a mixture of ethanol-lactate increased with the diameter from 0.53 to 0.62 g COD-CH₄/g VSS-d. The sulfate reducing activity with ethanol decreased as the granule diameter increased from 1.7 to 3.0 mm the activity was 0.24, 0.36 and 0.58 g COD-H₂S/g VSS-d, respectively. The granular sludge fractions had higher K_s with lactate (0.34, 0.14, 0.43 and 0.11 g COD/L) but a higher q_{max} with ethanol (0.29, 0.17, 0.25 and 0.35 g DQO-H₂S/g VSS-d). During 236 days of operation the HRT (from 1 to 0.66 d), the COD/SO₄²⁻ ratio (from 1.34 to 0.67) and the carbon source (ethanol-lactate mixture or ethanol) were varied. The COD removal in the four reactors was higher than 88%. After 66 days of operation, R4 inoculated with the smallest fraction (1.7 mm) had a better sulfate reducing performance, the sulfide production was 106 mg/L and the COD removal by SRB was 9.7%. At the end (236 d) the SO₄²⁻ removal efficiencies in reactors 1-4 were 11.85, 10.58, 10.94 y 13.66 % and the sulfide production were 122.5, 107.9, 113.4 and 141.1 mg H₂S/L, respectively. At the beginning of the experiment the MPN quantification with lactate and acetate had a direct relationship with the granule diameter, which was not observed at the end. The initial magnitude order was 10⁶ - 10² and at the end was 10¹³ - 10⁵ of SRB-MPN/ g VSS with lactate and acetate, respectively. The VSS content diminished from 13% at the beginning to 9% at the end of reactors operation. The mean granule diameter also decreased at the end to 2.7, 2.3 and 1.7 mm in the fractions and to 2.44 mm in the original sludge. In general, the performance of the reactors did not show a direct relationship with the SRB content in the sludge; however, the mean granule diameter had a slight influence in the COD removal efficiency by SRB and sulfide production.

1. Introducción

En la actualidad una gran variedad de efluentes industriales contienen cantidades considerables de sulfato (0.050–50 g/L), como los efluentes generados del refinado de azúcar, fermentaciones (ácido cítrico) y drenados ácidos de mina (Colleran *et al.*, 1995). Este tipo de efluentes se han tratado satisfactoriamente bajo condiciones de sulfatorreducción en diferentes configuraciones de reactores de alta tasa como son: reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés), reactor de lecho expandido de lodo granular (EGSB por sus siglas en inglés) y reactores de lecho fluidificado (Kaksonen *et al.*, 2003).

En los reactores de alta tasa el tiempo de retención celular está desacoplado del tiempo de residencia hidráulico (TRH) en el caso específico del reactor UASB esto se logra mediante la formación de lodo granular. Dicho lodo es un denso conglomerado de microorganismos unidos por sustancias poliméricas extracelulares, derivadas de las interacciones complejas entre los grupos tróficos que intervienen en el proceso de digestión anaerobia.

Uno de los principales objetivos al tratar un efluente por vía anaerobia es generar metano (CH_4) que puede aprovecharse como fuente de energía; sin embargo al tratar un efluente que contiene sulfato, la formación de sulfuro es inevitable.

En los últimos años se ha encontrado que la sulfatorreducción puede aplicarse para aumentar la remoción de materia orgánica, degradar compuestos xenobióticos y eliminar metales pesados (van Lier *et al.*, 2001). Sin embargo obtener un lodo granular sulfatorreductor no es tan fácil como obtener uno metanogénico, sobre todo a escala industrial.

Para lograr aumentar la capacidad de sulfatorreducción de un lodo se ha evaluado la adición de químicos como cloroformo (Visser *et al.*, 1993a) para

interrumpir la actividad metanogénica específica (AME), la bioaumentación con cepas puras (Omil *et al.*, 1997a), variación de pH (Omil *et al.*, 1996), temperatura (Visser *et al.*, 1993c, Weijma *et al.*, 2000), tipo de substrato con el que se alimenta el lodo (Omil *et al.*, 1998 y Visser *et al.*, 1993a) y tipo de inóculo alimentado al reactor (Lens *et al.*, 1998b). El resultado de todas estas estrategias fue que el tiempo requerido para transformar un lodo metanogénico en uno sulfatorreductor no fue menor a 100 días. Dado que la conversión de un lodo metanogénico en uno sulfatorreductor depende del tipo de inóculo se consideró que el diámetro del gránulo podría estar relacionado con el tiempo necesario para que la sulfatorreducción sea predominante.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene el diámetro de gránulo en la obtención de lodo granular sulfatorreductor a partir de uno metanogénico, al aplicar las condiciones necesarias para favorecer el proceso de sulfatorreducción.

Los objetivos particulares fueron caracterizar las diferentes fracciones de lodo en términos de sus actividades metanogénica y sulfatorreductora específicas con distintas fuentes de carbono (acetato, lactato, propionato, etanol y mezcla etanol-lactato). Asimismo, determinar el diámetro promedio mediante el análisis de imagen de las diferentes fracciones antes de inocular los reactores y al término del periodo de operación en continuo. Determinar los parámetros cinéticos de afinidad por el substrato (K_s) y velocidad máxima de utilización de substrato (q_{max}) con etanol y lactato como fuente de carbono, cuantificar las bacterias sulfatorreductoras (BSR) presentes antes de inocular los reactores y al término del periodo de operación en continuo de los reactores. Finalmente, evaluar el comportamiento de los reactores UASB inoculados con las diferentes fracciones de

lodo metanogénico, variando la proporción de la fuente de carbono (etanol-lactato, etanol) y el TRH en los diferentes reactores.

La hipótesis que se plantea es que a menor tamaño de gránulo se requerirá menos tiempo para que el lodo sea predominantemente sulfatorreductor. Se espera que esta disertación contribuya a optimizar el arranque de un reactor UASB sulfatorreductor.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Reactor UASB (upflow anaerobic sludge blanket)

La eficiencia y facilidad del reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) para remover la materia orgánica biodegradable presente en los efluentes industriales altamente concentrados, así como en los efluentes municipales (domésticos) con baja concentración de contaminantes se ha demostrado ampliamente (Lettinga *et al.*, 1980; Fang y Chui, 1993; Schmidt y Ahring, 1996; Tay y Yan, 1996). La operación de estos reactores se basa en la actividad microbiana de diferentes grupos actuando en sintrofia, en donde se generan gránulos con densas capas de microorganismos unidas por sustancias extracelulares poliméricas. Estos gránulos se caracterizan por presentar elevada velocidad de sedimentación y actividad metanogénica específica. El agua residual (afluente) asciende a través del lecho de lodos, que se encuentra en el fondo del reactor, en donde entra en contacto con los microorganismos y se llevan a cabo diversas reacciones biológicas de oxidación y reducción (Lettinga *et al.*, 1983).

Los reactores UASB son ampliamente usados dada su capacidad de tolerar elevadas concentraciones de materia orgánica, debido a su diversidad microbiana y concentración de biomasa (Lettinga *et al.*, 1980 y Wu *et al.*, 2001). La

concentración alta de biomasa en este tipo de reactores ayuda a que la transformación de los contaminantes sea rápida, ya que se pueden tratar altas concentraciones y grandes volúmenes de residuos orgánicos en reactores compactos.

Uno de los grandes inconvenientes de los reactores UASB es el prolongado periodo que se requiere (3 a 8 meses) para que los microorganismos formen los gránulos (Hulshoff Pol *et al.*, 1983; Hickey *et al.*, 1991), por lo que el proceso de formación de un lodo granular anaerobio puede ser considerado como el principal objetivo en la aplicación de los reactores UASB para obtener altas eficiencias de remoción en el tratamiento anaerobio tanto de efluentes industriales como de efluentes municipales (Ghangrekar *et al.*, 1996).

El tipo de efluente y las propiedades hidrodinámicas del reactor son factores importantes para la formación y estabilidad del lodo granular metanogénico. La sedimentación de los gránulos depende del tamaño y densidad de los mismos. Además, la presencia de precipitados inorgánicos y la incorporación de gas influyen en la densidad de los gránulos en los reactores UASB así como en su tamaño (Hulshoff Pol *et al.*, 1986). El tamaño promedio de partícula del lodo granular también depende de múltiples factores como son: tipo de nutrientes, velocidad de crecimiento del gránulo, limitación de substrato en el interior de los gránulos, fuerzas de corte (Tramper *et al.*, 1984), producción de polímeros extracelulares; la distribución del tamaño de partícula puede ser considerada como un parámetro característico del lodo granular

Durante más de 25 años se ha estudiado el proceso de granulación y durante este tiempo se han establecido diversas teorías y mecanismos de granulación, en donde el organismo clave en la granulación de un lodo anaerobio es *Methanosaeta concilii* también conocida como *Methanothrix soehngenii* (Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

1.1.2 Lodo granular

Los lodos granulares son densas comunidades microbianas, multiespecie, en las cuales ninguna de las especies individuales en el ecosistema granular es capaz de degradar residuos orgánicos complejos (Liu *et al.*, 2003). En los reactores de lodo granular anaerobio, el gran tamaño y la alta densidad de los gránulos individuales presentan una excelente velocidad de sedimentación comparado con los lodos activados convencionales (Lettinga *et al.*, 1980; Noyola y Moreno, 1994; y Tay *et al.*, 2001).

La formación de los gránulos puede ser iniciada por la adhesión bacteriana en precipitados inorgánicos como son sulfuro de hierro o fosfato de calcio (Mahoney *et al.*, 1987; Harvey *et al.*, 1984) o por la unión entre bacterias. En otros casos, la hidrofobicidad y carga de la superficie de los lodos son importantes (van Loosdrecht *et al.*, 1987 a, b).

El proceso de biogranulación involucra interacciones célula-célula en donde intervienen fenómenos físicos, biológicos y químicos. Los gránulos son formados a partir de la auto-inmovilización de microorganismos, mediante la cual se forman densos consorcios microbianos empaquetados con diferentes especies bacterianas y típicamente contienen millones de organismos por gramo de biomasa. Estos consorcios microbianos pueden formar gránulos entre 0.5 y 5 mm de diámetro, los cuales presentan elevada velocidad de sedimentación y resistencia al lavado en reactores operados con alta carga hidráulica (Wang *et al.*, 2004; Show *et al.*, 2004; Lettinga *et al.*, 1983).

Las bacterias presentes en los lodos granulares tienen diferente papel en la degradación de residuos industriales e involucra interacciones complejas entre las especies presentes (Liu y Tay, 2004) como se muestra en la Figura 1.1. Los gránulos

están constituidos por grupos microbianos filogenética y funcionalmente diferentes los cuales son:

- organismos acidogénicos, principalmente bacterias.
- consorcios sintróficos acetogénicos-metanogénicos que son los responsables de la conversión de los ácidos orgánicos de cadena corta (propionato, butirato, valerato) y alcoholes hasta acetato, este proceso requiere de aceptores externos de electrones. Los principales productos obtenidos son iones hidrógeno y bicarbonato, los cuales son posteriormente reducidos a hidrógeno elemental y formiato. Debido a las limitaciones termodinámicas, los productos reducidos pueden mantenerse a bajas concentraciones y debido a esto las bacterias que oxidan ácidos orgánicos frecuentemente están asociadas estrechamente a una distancia menor de 10 μm con las *Archaeas* metanogénicas utilizadoras de hidrógeno y formiato (Conrad *et al.*, 1985 y Boone *et al.*, 1989).
- Dentro del grupo de los metanógenos acetoclásticos capaces de utilizar acetato, se encuentran *Methanosaeta spp.* (homoacetótrofos) y *Methanosarcina spp* (también pueden utilizar formiato, H_2 , CO_2 y metanol).

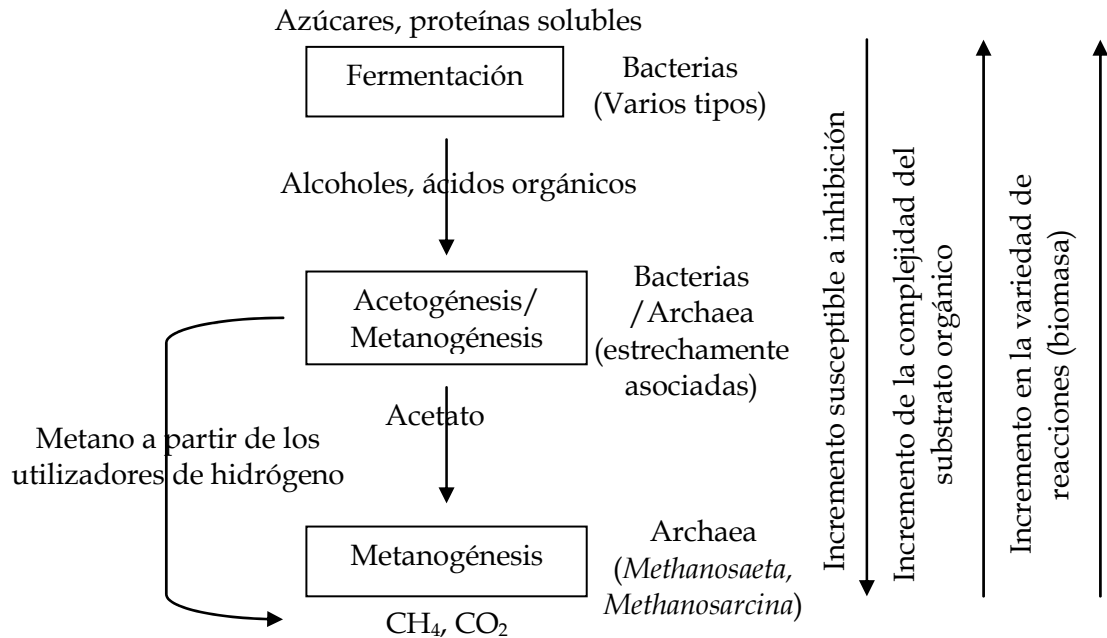


Figura 1.1 Procesos de conversión intracelular y consorcios microbianos en los sistemas anaerobios (Batstone *et al.* 2004).

1.1.3 Teorías y modelos de granulación anaerobia

Se han propuesto varios mecanismos y modelos para entender el proceso de granulación. En la Tabla 1.1 se mencionan las diferentes teorías y modelos clasificados desde un enfoque físico, microbiano y termodinámico (Hulshoff Pol *et al.*, 2004) y desde el enfoque físico-químico, estructural, comunicación célula-célula (Liu *et al.*, 2003).

1.1.3.1 Enfoque físico de la granulación anaerobia

De acuerdo a la clasificación realizada por Hulshoff Pol *et al.* (2004), la clasificación física se basa principalmente en las condiciones físicas predominantes en el reactor como son: la velocidad ascendente de las fases líquida y gaseosa, contenido de sólidos suspendidos en el efluente o en el inóculo.

Tabla 1.1 Revisión de las diferentes teorías sobre la granulación anaerobia. (Modificada de Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

Enfoque		Referencias	Teoría
Físico		Lettinga <i>et al.</i> , 1980	Modelo del núcleo inerte
		Hulshoff Pol <i>et al.</i> , 1983 Pereboom, 1994	Presión de selección Crecimiento de sólidos suspendidos colonizados
Microbiano	Fisiológico	Dolfing, 1987	-
		Sam-Soon <i>et al.</i> , 1987	Hipótesis de la población en capas
	Crecimiento	Wiegant, 1987	Teoría del spaghetti
		Chen y Lun, 1993	-
	Ecológicas	Dubourgier <i>et al.</i> , 1987	Puentes entre microfloculos
		Morgan <i>et al.</i> , 1991	Agrupaciones de <i>Methanothrix</i>
		De Zeeuw, (1987)	Tres tipos de gránulos degradadores de AGV
		McLeod <i>et al.</i> , 1990 y Guiot <i>et al.</i> , 1992	Modelo de la capa múltiple
		Vanderhaegen <i>et al.</i> , 1992	-
		Ahn, 2000	-
	Wu <i>et al.</i> , 1996	Granulación anaerobia con especies definidas	
Termodinámico		Zhu <i>et al.</i> , 1997	Formación del núcleo cristalizado
		Thaveesri <i>et al.</i> , 1995	Modelo de la tensión superficial
		Schmidt y Ahring, 1994	Modelo de enlace de PEC ^a
		Schmidt y Ahring, 1996	-
		Tay <i>et al.</i> , 2000	Translocación-deshidratación de protones
		Yu <i>et al.</i> , 2000;	Modelo de enlace iónico
		Mahoney, 1987	

^a Polímeros extracelulares

a) El modelo del núcleo inerte, inicialmente propuesto por Lettinga *et al.*, (1980), describe que en presencia de micropartículas inertes en un reactor UASB las bacterias anaerobias pueden unirse a las superficies particuladas para iniciar la formación de biopelículas, normalmente llamados gránulos embrionarios (Figura 1.2). La maduración de los gránulos puede ser desarrollada por el crecimiento de las bacterias unidas bajo determinadas

condiciones de operación. Este modelo del núcleo inerte sugiere como primer paso de la granulación anaerobia, la presencia de núcleos ó bioportadores de micro-tamaño para la unión de bacterias.

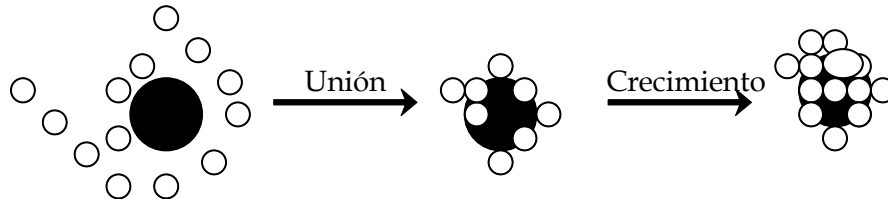


Figura 1.2 Representación esquemática del modelo del núcleo inerte: ●) Núcleo inerte, ○) Bacterias individuales (Liu *et al.*, 2003).

b) La teoría de la presión de selección, es aceptada por ser una selección continua de partículas de lodo en el reactor. La presión de selección puede ser estimada como la suma de la carga hidráulica y carga de la fase gaseosa (dependiente de la carga de lodo). Bajo condiciones de alta presión de selección, los lodos ligeros y dispersos pueden ser lavados mientras que otros componentes pueden ser retenidos en el reactor. Así, el crecimiento de lodos finos dispersos es minimizado y el crecimiento microbiano es restringido a un determinado número de crecimiento nuclear, que puede consistir de materiales portadores orgánicos e inorgánicos o pequeños agregados bacterianos presentes en el inóculo (Hulshoff Pol *et al.*, 1987). Este crecimiento nuclear aumenta hasta cierto tamaño, después parte de estos gránulos son separados y producen una nueva generación de crecimiento nuclear, así continúa de forma sucesiva el proceso de granulación.

La primera generación consiste relativamente de agregados voluminosos, que gradualmente se hacen más densos debido al crecimiento microbiano fuera y dentro de los agregados. Además, el crecimiento

microbiano es estimulado en los agregados más voluminosos, debido a que el substrato puede penetrar en los agregados por la menor limitación de difusión y a la baja actividad bacteriana dentro de estos agregados comparados con los agregados densos. Como consecuencia de su envejecimiento o maduración, los gránulos filamentosos que existen en la etapa inicial del proceso de granulación se hacen densos. Bajo condiciones de baja presión de selección, el crecimiento será como biomasa dispersa, formando un lodo de tipo voluminoso (Hulshoff Pol *et al.*, 1987).

1.1.3.2 Enfoque microbiano de la granulación anaerobia

Las teorías agrupadas en esta sección, explican el proceso de la granulación de los lodos basada principalmente en las características granulares, estructura y su correspondiente microbiología, acopladas a las condiciones predominantes en el reactor (hidrodinámica, concentración de substratos e intermediarios en el reactor), estas características son la base de las siguientes teorías.

- a) Teoría del spaghetti descrita por Wiegant (1987) en dos pasos: 1) formación de precursores y 2) crecimiento real de los gránulos a partir de estos precursores.

El primer paso es considerado la parte decisiva de la formación del gránulo. Inicialmente, las bacterias *Methanothrix* forman pequeños agregados debido a la turbulencia generada por la producción de gas y por la unión de materia finamente dispersa. La concentración de sólidos en suspensión no debe ser alta, de lo contrario el aumento de tamaño de los agregados será lento. La selección de los agregados es determinada por un aumento en la velocidad ascensional. Una vez que los precursores están

formados y se continúan rutinariamente los pasos iniciales, la granulación es inevitable.

El crecimiento de manera individual de las bacterias y el entrecruzamiento de las bacterias no unidas, inducen el crecimiento de las partículas precursoras para formar gránulos, hasta adquirir una forma esférica debida a las fuerzas de corte hidráulico generadas por la velocidad ascensional de la fase gaseosa. Los gránulos en esta etapa presentan una apariencia filamentosa, semejante a una bola formada por spaghetti de pequeños filamentos de *Methanothrix*, en la cual cierta parte se encuentra unida y otra parte se encuentra de manera libre. Con el tiempo, se forman gránulos de tipo bastón a partir de los gránulos filamentosos y el tiempo de retención de biomasa aumenta, debido al incremento en la densidad del crecimiento bacteriano.

- b) Puentes entre micro-flóculos. A partir de análisis en microscopio y determinación de actividad (Dubourgier *et al.*, 1987), se ha propuesto que el mecanismo de granulación inicia por el encubrimiento de las *Methanothrix* filamentosas por colonias de cocos o bastones (bacterias acidogénicas), formando microfloculos entre 10 y 50 μm . Después las *Methanothrix* filamentosas, debido a esta particular morfología y propiedades superficiales pueden establecer puentes entre diversos micro-flóculos formando grandes gránulos ($> 200 \mu\text{m}$). Además, el desarrollo sintrófico de bacterias acidogénicas favorece el crecimiento de los gránulos. Estos autores sustentan la idea de que las *Methanothrix* tienen un papel importante en la resistencia de los gránulos por la estabilidad que proporcionan a la estructura, pero también enfatizan la importancia de los polímeros extracelulares.

c) Teoría de la capa múltiple basada en las observaciones con microscopio (MacLeod *et al.*, 1990; Guiot *et al.*, 1992). En esta teoría, se propone que la composición microbiológica de los gránulos es diferente en cada capa. La capa inerte consiste principalmente de metanógenos que pueden actuar como núcleos necesarios para iniciar el desarrollo del gránulo. Bacterias productoras y consumidoras de hidrógeno son las especies dominantes en la capa intermedia y una mezcla de especies incluyendo bastones, cocos y bacterias filamentosas tienen mayor establecimiento en la capa externa (Figura 1.3). Para lograr convertir la materia orgánica hasta metano, la organización espacial de metanógenos y otras especies es esencial.

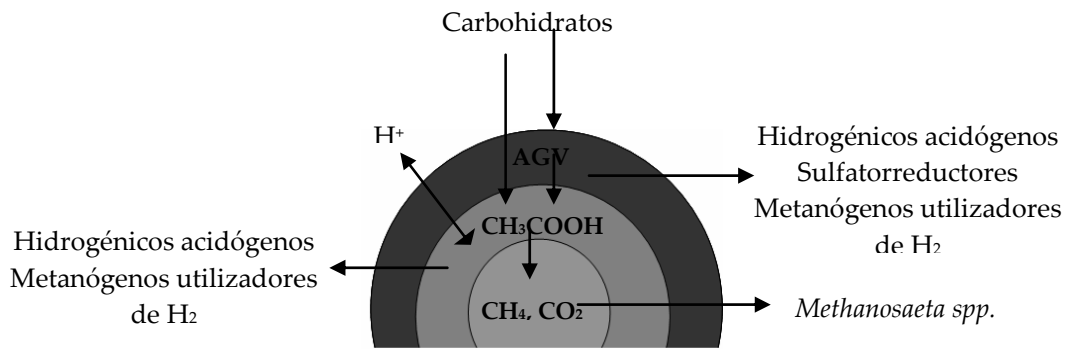


Figura 1.3 Representación esquemática del modelo de la capa múltiple (Modificada de Guiot *et al.*, 1992). Donde AGV: ácidos grasos volátiles.

d) Un modelo similar al de la capa múltiple fue propuesto por Ahn (2000). Este modelo (Figura 1.4) describe cómo en la etapa inicial de granulación, los metanógenos acetoclásticos (filamentosos) y otros organismos crecen de manera dispersa en el medio. Pero efectos de puenteo y enrollamiento debidos a la hidrodinámica de los reactores UASB, con el tiempo, dan origen a la formación de pequeños conglomerados estructurados principalmente por metanógenos filamentosos.

Posteriormente, los acetógenos se unen a estos conglomerados y en asociación sintrófica con los metanógenos acetoclásticos forman conglomerados con núcleos densos. Por lo tanto, los acidógenos y los hidrogenótrofos en asociación sintrófica con los acetógenos se unen a los pequeños gránulos y debido a la excreción de polímeros extracelulares de los hidrogenótrofos, el gránulo es favorecido para su crecimiento.



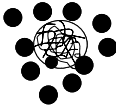
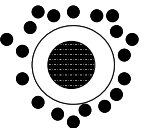
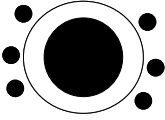
Apariencia	Etapa	Diámetro
	(A) Crecimiento de metanógenos filamentosos (acetoclásticos) y otros microorganismos en condiciones de baja presión parcial de hidrógeno (-6 atm)	Filamento
	(B) Unión y efecto de enrollamiento en el crecimiento de los metanógenos filamentosos.	< 100 μm
	(C) Crecimiento de pequeños conglomerados en un núcleo indefinido, crecimiento sintrófico de acetogénicos a través del núcleo.	< 1 mm
	(D) Crecimiento de pequeños gránulos con un núcleo denso; acoplamiento sintrófico de hidrogenótrofos y acidógenos alrededor de la superficie de un pequeño gránulo.	1-2 mm
	(E) Crecimiento del gránulo con estructuras multi-capas, debido a la acumulación de polímeros extracelulares por hidrogenótrofos.	2-5 mm

Figura 1.4 Modelo de granulación anaerobia propuesto por Ahn (2000).

1.1.3.3 Enfoque termodinámico de la granulación anaerobia

La unión microbiana o la auto-inmovilización es el punto inicial del proceso de la granulación anaerobia y puede ser definido en términos de la energía involucrada en las interacciones bacteria-bacteria o bacteria-superficie sólida. En un sentido termodinámico, cuando una bacteria se aproxima a otra las interacciones entre éstas implican fuerzas electrostáticas repulsivas (fuerzas de van de Waals), también intervienen aspectos de movilidad electroforética e hidrofobicidad, así como la influencia de la actividad de translocación de protones a través de la membrana causando energetización.

a) Schmidt y Ahring (1996) propusieron la formación de gránulos y biopelículas en cuatro pasos:

1. Transporte de células hacia la superficie de un material inerte colonizado por otras células (capa inferior).
2. Adsorción inicial reversible por fuerzas fisicoquímicas hacia la capa inferior.
3. Adhesión irreversible de las células hacia la capa inferior por agregados microbianos y/o polímeros.
4. Multiplicación de las células y desarrollo de los gránulos.

1.1.4 Degradación anaerobia

La degradación anaerobia de residuos orgánicos involucra la interacción de varios grupos metabólicos: bacterias fermentativas (BF) y acetogénicas (BA), microorganismos metanógenos (MM), y si el sulfato está presente, intervienen las bacterias sulfatorreductoras (BSR).

El proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica compleja hasta CH_4 y CO_2 se lleva a cabo en diferentes etapas (Figura 1.5), las cuales son: 1)

Hidrólisis: fragmentación de la materia orgánica insoluble. Etapa en la cual carbohidratos, proteínas y lípidos son hidrolizados hasta moléculas menos complejas como son azúcares, aminoácidos, alcoholes y ácidos grasos de cadena larga. 2) Acidogénesis: Se produce la fermentación de compuestos solubles (azúcares, aminoácidos y alcoholes) hasta ácidos grasos volátiles (AGV), hidrógeno, CO₂ y pequeñas cantidades de etanol y ácido láctico. 3) Acetogénesis: Dependiendo de la longitud de la cadena de los AGV formados durante la acidogénesis, éstos son oxidados hasta hidrógeno, acetato y CO₂. 4) Metanogénesis: Formación de metano por la descarboxilación de acetato realizada por los metanógenos acetótrofos y la hidrogenación del CO₂ por metanógenos hidrogenótrofos.

Cuando en aguas residuales están presentes sulfato, sulfito o tiosulfato, las BSR son capaces de utilizar diversos intermediarios de los procesos de mineralización anaerobia (Figura 1.5). Bajo condiciones sulfatorreductoras pueden ocurrir las siguientes reacciones:

- Oxidación de AGV con más de dos átomos de carbono por las BSR.
- Oxidación de acetato por BSR acetotróficas (BSRA) e hidrógeno molecular por BSR hidrogenotróficas.

Estas reacciones de sulfatorreducción forman parte del ciclo del azufre (Figura 1.6), el cual consiste básicamente de una etapa oxidativa y otra reductora, en donde el azufre completa ciclos pasando del estado de oxidación +6 para el sulfato (SO₄²⁻) a -2 para el sulfuro (S²⁻) y éste a su vez es oxidado de nuevo a SO₄²⁻ (Celis, 2004).

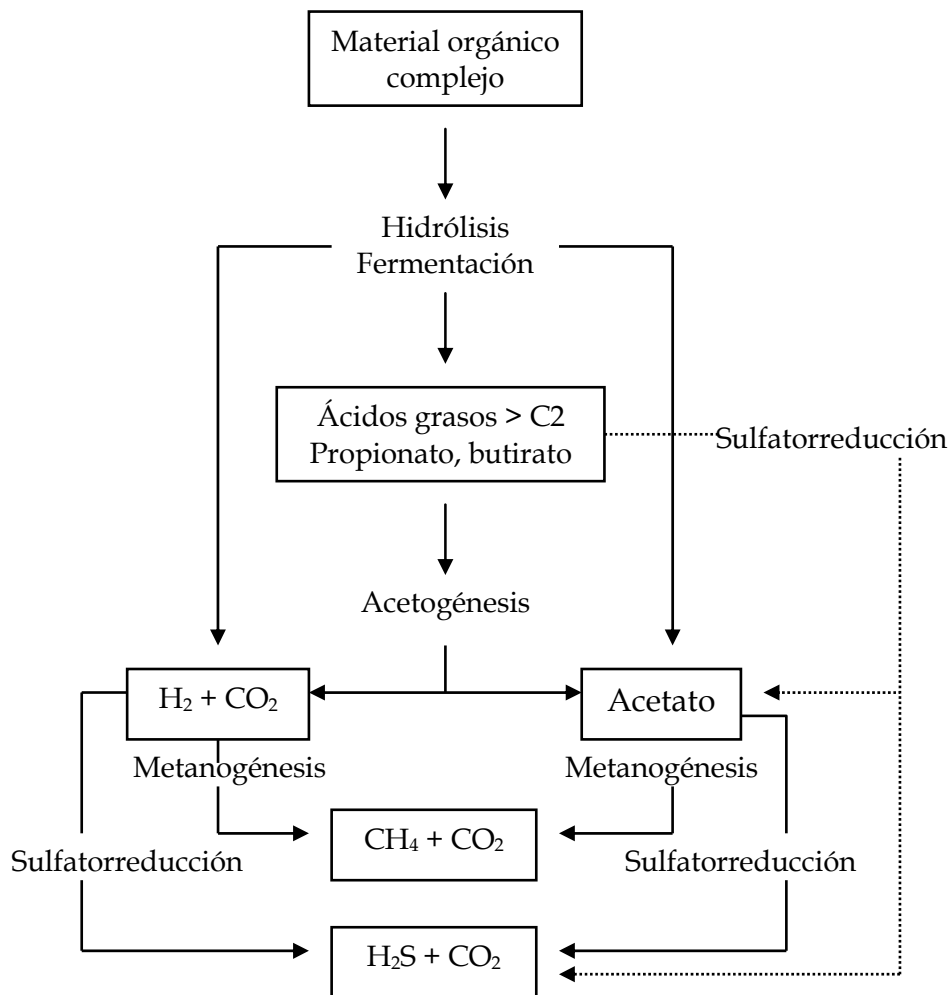


Figura 1.5 Competencia entre las BSR, MM y BA por el sustrato durante la degradación anaerobia de la materia orgánica (Lens *et al.*, 2000).

La etapa oxidativa del sulfuro bajo condiciones de suficiente oxígeno o nitrato puede llevarse a cabo de manera espontánea. La oxidación biológica puede ocurrir bajo condiciones aerobias, anaerobias o anóxicas. En presencia de oxígeno o nitrato las bacterias incoloras del azufre oxidan el sulfuro hasta azufre o sulfato. Los electrones del sulfuro son usados para convertir oxígeno y nitrato en N_2 y H_2O . Los electrones también pueden usarse para la reducción de CO_2 . La oxidación anaerobia del sulfuro es realizada por bacterias fototróficas, que utilizan los electrones del sulfuro para la reducción y asimilación del CO_2 .

Este trabajo se enfoca en la reducción no asimilativa del sulfato, conocida como sulfatorreducción. Este proceso de respiración bacteriana ocurre en condiciones estrictamente anaerobias y el sulfato es el aceptor final de electrones para la degradación de compuestos orgánicos e hidrógeno (Oude Elferink *et al.*, 1994; Visser, 1995).

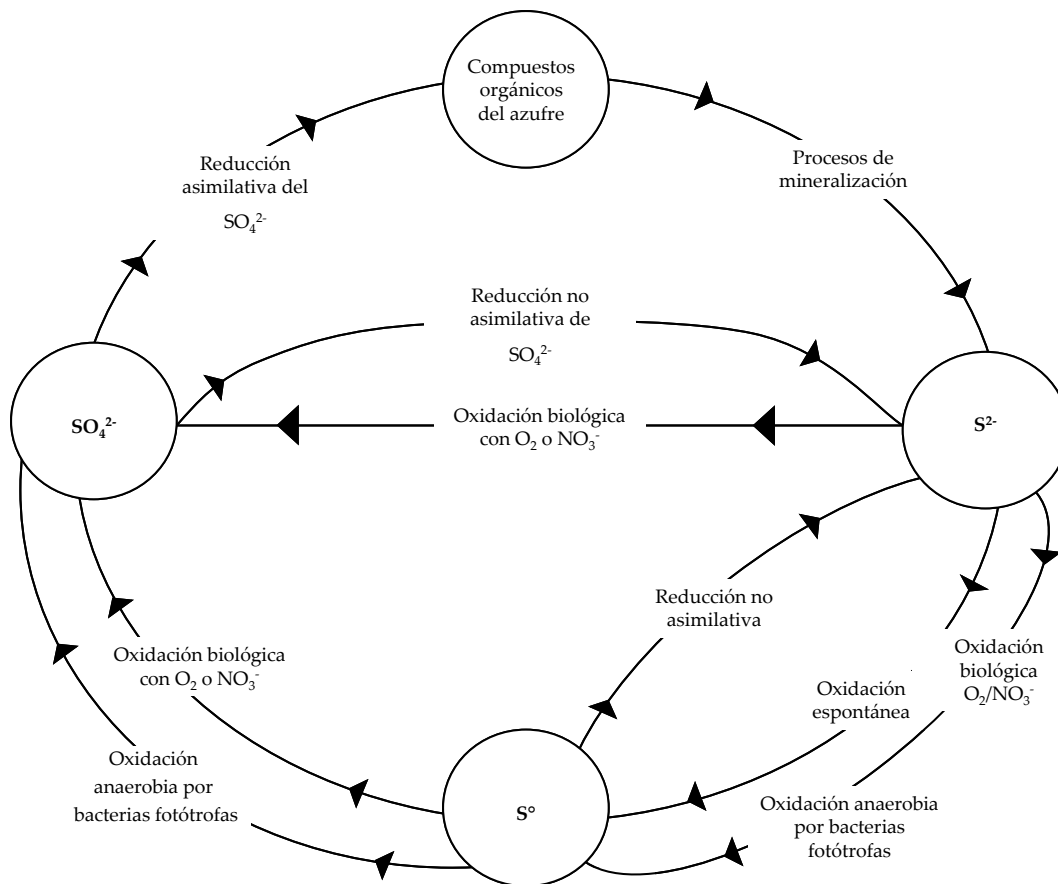


Figura 1.6 El ciclo biológico del azufre, modificado de Robertson y Kuenen (1992).

1.1.5 Bacterias Sulfatorreductoras (BSR)

Las BSR son microorganismos anaerobios metabólicamente muy versátiles pertenecientes a diferentes géneros y familias, utilizan sulfato como agente oxidante o como aceptor de electrones. Son bacterias que crecen heterotróficamente

usando pequeñas moléculas orgánicas y autotróficamente usando H₂ como donador de electrones y CO₂ como fuente de carbono. Los substratos (donadores de electrones, fuente de energía y carbono) utilizados por las BSR son: lactato, etanol, propionato, butirato, hidrógeno, ácidos grasos, metanol, etanol, succinato, malato y compuestos aromáticos. En la Tabla 1.2 se muestran algunas de las reacciones metabólicas de las BSR con diferente substrato (Oude Elferink *et al.*, 1994).

Tabla 1.2 Reacciones metabólicas sulfatorreductoras involucradas en la degradación de la materia orgánica y sus cambios de energía libre de Gibbs. Tomada de Oude-Elferink *et al.*, (1994).

Reacción	ΔG° (kJ/mol)
$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-38.1
$\text{Acetato}^- + \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
$\text{Propionato}^- + \frac{3}{4} \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \frac{3}{4} \text{HS}^- + \frac{1}{4} \text{H}^+$	-37.7
$\text{Butirato}^- + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow 2 \text{Acetato}^- + \frac{1}{2} \text{HS}^- + \frac{1}{2} \text{H}^+$	-27.8
$\text{Lactato}^- + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \frac{1}{2} \text{HS}^- + \frac{1}{2} \text{H}^+$	-80.0
$\text{Etanol} + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{Acetato}^- + \frac{1}{2} \text{HS}^- + \frac{1}{2} \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-66.4
$\text{Formiato}^- + \frac{1}{4} \text{SO}_4^{2-} + \frac{1}{4} \text{H}^+ \longrightarrow \frac{1}{4} \text{HS}^- + \text{HCO}_3^-$	-36.7

Las BSR presentan condiciones de crecimiento óptimo en un intervalo de temperatura entre 28 y 32°C y a un pH cercano a 7 (Hao *et al.*, 1996). Estas bacterias se clasifican en dos grupos metabólicos: a) comprende a las BSR que oxidan el substrato incompletamente hasta acetato y sulfuro como productos finales. Dentro de este grupo se encuentran las bacterias del género *Desulfovibrio*,

Desulfotomaculum, *Desulfomonas*, *Thermodesulfobacterium* y *Desulfobulbus*; b) BSR que tienen la capacidad de oxidar completamente los sustratos orgánicos hasta dióxido de carbono y sulfuro, en este grupo se encuentran *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* y *Desulfonema* (Visser, 1995; Nagpal *et al.*, 2000).

Las BSR que oxidan incompletamente los sustratos orgánicos pueden crecer significativamente más rápido que las BSR que oxidan completamente los sustratos orgánicos. En condiciones óptimas, las especies de *Desulfovibrio* que utilizan lactato, piruvato e hidrógeno pueden alcanzar tiempos de duplicación de 3 a 4 horas. Sin embargo, en cultivos de lote enriquecidos con donadores de electrones que puedan ser usados por las BSR que oxidan completa e incompletamente los sustratos se obtiene un cultivo rico en BSR que oxidan incompletamente la fuente de carbono (Widdel, 1998).

Las BSR son menos sensibles a compuestos tóxicos como los metales pesados ya que son precipitados por el sulfuro que producen, con lo cual reducen su efecto tóxico. Además, las BSR pueden metabolizar compuestos aromáticos orgánicos inhibitorios (tolueno, etilbenceno), alcanos, compuestos clorados (cloroformo) y ácidos orgánicos de cadena larga (Widdel, 1988).

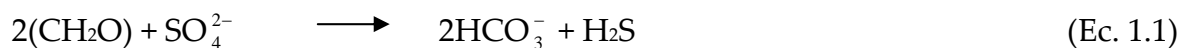
Recientemente, las BSR han sido utilizadas para tratar efluentes industriales que contienen altas concentraciones de compuestos azufrados y metales pesados; tales como los efluentes generados en la industria procesadora de alimentos, fermentación, papel, mariscos, procesos fotográficos y los drenados ácidos de mina (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Uso de BSR en aplicaciones biotecnológicas (Modificada de Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

Aplicación	Referencia
Remoción biológica de sulfato	
Aguas residuales industriales	Särner, 1990
Drenados ácidos de mina	Maree <i>et al.</i> , 1991
Ácido sulfúrico gastado	Stucki <i>et al.</i> , 1993
Remoción de metales pesados	
Tratamiento extensivo (Humedales)	Hao <i>et al.</i> , 1996
Reactores de alta tasa	Tichy <i>et al.</i> , 1998
Drenados ácidos de mina	Barnes <i>et al.</i> , 1991
Aguas subterráneas (Acuíferos)	Scheeren <i>et al.</i> , 1991
Tratamiento microaerobio	
Tratamiento de aguas residuales domésticas	Takahashi y Kyosai, 1991
Reducción de la producción de lodos residuales	Lens <i>et al.</i> , 1995b

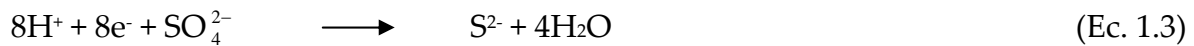
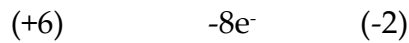
1.1.6 Sulfatorreducción

Las BSR son conocidas por estar presentes en consorcios de microorganismos involucrados en los procesos de digestión anaerobia y aerobia, utilizados en el tratamiento de aguas residuales (Fauque, 1995; Lens *et al.*, 1995a). El proceso de sulfatorreducción puede representarse con la siguiente ecuación, donde CH₂O representa la materia orgánica (Widdel, 1988):



La actividad de las BSR depende principalmente de la disponibilidad de sulfato, el cual es utilizado como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria y la materia orgánica es utilizada por las BSR como substrato. La proporción de materia orgánica y sulfato presentes en el agua residual, determinan sus eficiencias de remoción por las BSR.

De acuerdo a las siguientes reacciones, para oxidar 64 g de materia orgánica expresada como DQO se requieren 96 g de SO_4^{2-} por lo que la relación estequiométrica (g DQO/g SO_4^{2-}) para la sulfatorreducción es de 0.67 (Speece, 1996), en donde la DQO convertida en sulfuro puede calcularse basándose en las concentraciones de sulfato reducido o sulfuro producido.



Según las Ec. 1.2 y 1.3, en la reducción de sulfato se transportan 8 electrones, por lo que pueden hacerse las siguientes equivalencias:

$$1 \text{ mol de } \text{SO}_4^{2-} \equiv 4 \text{ moles de oxígeno}$$

$$96 \text{ g de } \text{SO}_4^{2-} \equiv 64 \text{ g de oxígeno} = 64 \text{ g DQO}$$

$$1 \text{ g de } \text{SO}_4^{2-} \equiv \frac{2}{3} \text{ g DQO} = 0.67 \text{ g DQO}$$

El proceso de sulfatorreducción no solo es aplicado para remover compuestos azufrados presentes en los efluentes de diversas industrias como son la del papel, encurtido de pieles y destilerías; sino también, para precipitar metales presentes en los efluentes de las procesadoras de metales con el sulfuro producido. La sulfatorreducción se ha realizado satisfactoriamente en diferentes sistemas como son los reactores UASB y lecho fluidificado.

1.1.7 Competencia entre las BSR y microorganismos metanógenos (MM)

En presencia de sulfato, las bacterias acidogénicas, bacterias acetogénicas y microorganismos metanógenos compiten con las BSR por la disposición del sustrato. Esta competencia es importante, ya que determinará hasta dónde el sulfuro y metano (productos finales de la mineralización) serán producidos. Los principales compuestos intermedios en la mineralización anaerobia de sustratos orgánicos son hidrógeno, acetato, propionato y butirato. Para todos estos compuestos, las BSR son más adecuadas desde un punto de vista cinético y termodinámico, por lo que la reducción de sulfato debería ser el proceso predominante (Oude-Elferink *et al.*, 1994).

Otros factores importantes para establecer la competencia entre las BSR y los MM, son las condiciones de operación (pH y temperatura), tiempo de retención celular, propiedades de adhesión, régimen hidráulico, concentración y tipo de sustrato, la relación DQO/ SO_4^{2-} , tipo de inóculo, estructura del lodo (floculento o granular), limitación de nutrientes e inhibición por sulfuro (Visser *et al.*, 1992; Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

La relación DQO/ SO_4^{2-} es un parámetro importante para el control en el tratamiento anaerobio de este tipo efluentes. Cuando la relación DQO/ SO_4^{2-} es mayor al valor estequiométrico (mayor a 0.67), hay suficiente materia orgánica que favorece la coexistencia tanto de los MM y las BSR. Sin embargo, cuando la relación DQO/ SO_4^{2-} es igual a 0.67, teóricamente hay suficiente SO_4^{2-} en el medio para que las BSR remuevan completamente la materia orgánica. (Rinzema y Lettinga, 1988; Alphenaar *et al.*, 1993). Si el objetivo es la eliminación del SO_4^{2-} y la corriente a tratar tiene un contenido de materia orgánica muy bajo (DQO/ SO_4^{2-} menor a 0.67), puede ser necesaria la adición de materia orgánica adecuada para

poder operar con altas eficiencias de remoción (Omil *et al.*, 1997b). La importancia de esta competencia aumenta con el decremento de la relación DQO/SO_4^{2-} en el agua residual.

Dependiendo de las condiciones, las BA y los MM compiten con las BSR por substratos complejos (Colleran *et al.*, 1995). En reactores anaerobios, las BSR hidrogenotróficas compiten con los MM utilizadores de hidrógeno cuando hay suficiente sulfato presente (Rinzema y Lettinga, 1988; Visser *et al.*, 1993b; Omil *et al.*, 1996). Esto confirma que en las reacciones de los procesos de degradación anaerobia, las bacterias sulfatorreductoras hidrogenotróficas tienen mayor rendimiento energético a partir del consumo del hidrógeno molecular y tienen mayor afinidad por el substrato que los microorganismos metanogénos hidrogenótrofos (Oude-Elferink *et al.*, 1994).

También las BSR utilizadoras de acetato (BSRA) tienen ventaja termodinámica y cinética sobre los MM utilizadores de acetato (MMA) en su competencia por el acetato (Widdel, 1988). El predominio de las BSRA sobre los MMA en exceso de sulfato, se ha confirmado en reactores de tanque agitado (Gupta *et al.*, 1994). Sin embargo, esta competencia es menos predecible en reactores de alta tasa basados en la retención de biomasa (UASB) o inmovilización de lodo en reactores de lecho fluidificado. Diversos estudios reportan que el acetato es completamente convertido a metano, aún con exceso de sulfato (Hoeks *et al.*, 1984; Mulder 1984), mientras que otros reportan un predominio de BSRA (Choi y Rim, 1991; Omil *et al.*, 1996). Además de las propiedades cinéticas de crecimiento, otros factores influyen en la competencia de las BSR y MM (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Factores determinantes en la competencia entre los MM y las BSR en reactores de alta tasa (Lens *et al.*, 2000).

Factor	Referencia
Composición del inóculo	
Tipo de lodo (inóculo)	McCartney y Oleszkiewicz, 1991
Composición bacteriana	Harada <i>et al.</i> , 1994; Omil <i>et al.</i> , 1998
Tipo de unión de bacterias	Isa <i>et al.</i> , 1986a,b
Tiempo de experimentación	Harada <i>et al.</i> , 1994; Omil <i>et al.</i> , 1998
Inoculación con nuevas especies bacterianas	Omil <i>et al.</i> , 1997a
Composición del afluente	
Tipo de DQO	Polprasert y Hass, 1995
Concentración de acetato	Yoda <i>et al.</i> , 1987
Concentración de sulfato	Overmeire <i>et al.</i> , 1994
Concentración de sulfuro	Omil <i>et al.</i> , 1996
Concentración de Ca ²⁺ y Mg ²⁺	De Smul y Verstraete, 1999
Condiciones de operación	
pH, licor mezclado	Visser <i>et al.</i> , 1996; De Smul y Verstraete, 1999
Temperatura	Visser <i>et al.</i> , 1992; Weijma <i>et al.</i> , 2000

1.1.8 Bacterias sulfatorreductoras en lodo granular

La formación de gránulos ha sido ampliamente estudiada en reactores UASB (Liu y Tay, 2004). En la identificación física de un lodo granular algunos de los aspectos a considerar junto con la AME son: tamaño y distribución de diámetro de los gránulos, resistencia física, velocidad de sedimentación, permeabilidad,

hidrofobicidad y sustancias poliméricas extracelulares (Gonzalez-Gil *et al.*, 2001; Show *et al.*, 2004). Se han reportado AME para lodos granulares en un intervalo de 0.3 y 1.2 g DQO-CH₄/g SSV-día (Fang y Chui, 1993); no obstante, se han reportado valores de AME superiores a 2 g DQO/g SSV-día (Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

Los valores de tamaño y velocidad de sedimentación de lodos granulares varían de 0.5 – 5 mm (Lettinga *et al.*, 1983; Aiyuk y Verstraete, 2004), y 18-100 m/h (Park *et al.*, 1997; Lens *et al.*, 1998a), respectivamente bajo condiciones metanogénicas. En los reactores UASB el desarrollo de biopartículas con un tamaño superior a los 0.5 mm son considerados como gránulos (Wang *et al.*, 2004; Show *et al.*, 2004; Bellouti *et al.*, 1997; Yan y Tay, 1997). Otros estudios enfocados hacia la porosidad y permeabilidad de los gránulos, indican que la porosidad disminuye con el aumento del tamaño del gránulo (Mu *et al.*, 2006).

La variación de la AME con diferente tamaño de gránulo es un importante parámetro para visualizar las ventajas del lodo granular sobre el lodo floculento (Bhunja y Ghangrekar, 2007). Sin embargo, no se ha reportado en la literatura la variación de la actividad metanogénica, desarrollada durante el tratamiento de agua residual, con ciertas características físicas y el tamaño del gránulo.

Como se ha mencionado en muchas investigaciones, la inmovilización y granulación de bacterias anaerobias se ha enfocado a sistemas metanogénicos. En contraste, poco es conocido acerca de la inmovilización en sistemas sulfatorreductores (Visser *et al.*, 1993a). Por lo tanto, no es claro si las BSR son capaces de formar biopelícula o lodo granular en reactores anaerobios.

Visser *et al.* (1993a), evaluaron la capacidad tanto de las BSR como de los MM para formar gránulos en diferentes sistemas (metanogénico, metanogénico-sulfatorreductor y sulfatorreductor). Un lodo granular sulfatorreductor puede ser obtenido alimentando un reactor inoculado con lodo metanogénico con agua residual a una relación DQO/SO₄²⁻ de 0.5. El cambio de población entre las BM y

BSR sucede lentamente (aproximadamente 100 días) y después de la etapa inicial, los MM aún consumen entre el 5 y 20% de la materia orgánica (Omil *et al.*, 1996). Sin embargo, tratando el lodo con cloroformo (5 mg/L) durante los primeros 5 días de la etapa inicial, fue posible eliminar completamente a las BM del inóculo, favoreciendo con esto la formación de un lodo granular sulfatorreductor listo para iniciar un proceso (Visser *et al.*, 1993b).

El contenido de BSR en el inóculo es importante para poder establecer un sistema sulfatorreductor, como lo describen Omil *et al.* (1997b), quienes observaron actividad sulfatorreductora al cabo de 50 días al utilizar acetato como donador de electrones y operar el reactor a una relación DQO/ SO_4^{2-} de 2. Después de 100 días de operación observaron que el 10% de acetato fue degradado por las BSR y aún operando con un exceso de sulfato, necesitaron 400 días para aumentar la fracción de acetato utilizado por las BSR (de 50 hasta 90%). Caso contrario se presentó cuando utilizaron una mezcla de AGV con exceso de sulfato, donde el tiempo necesario para la transición fue de 250 días, significativamente menor que el caso del acetato. Estos resultados en su conjunto indican que el cambio en las poblaciones microbianas de la biomasa se realiza muy lentamente. Lo anterior puede deberse tanto a la pequeña diferencia entre las velocidades de crecimiento de ambos grupos de microorganismos, como al prolongado tiempo de residencia celular que caracteriza a los reactores UASB y que Hulshoff Pol (1989) ha estimado entre 0.5 y 1 año.

Recientemente se han aplicado técnicas de biología molecular, como son electroforesis en gel por desnaturalización en gradiente (DGGE) e hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) para estudiar los cambios en la ecología microbiana con respecto del tiempo en los lodos granulares de diferentes biorreactores. La DGGE se ha utilizado para analizar la biodiversidad del lodo granular (Chan *et al.*, 2001; Roest, *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2006) y para determinar la

diversidad de poblaciones sulfatorreductoras en biopelículas anaerobias (Santegoeds *et al.*, 1998). La estructura del gránulo (Gonzalez-Gil *et al.*, 2001), la distribución de BSR y MM (Gonzalez-Gil *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2006) y biodiversidad (Calli *et al.*, 2006), han sido analizadas por FISH.

1.2 Estructura de la tesis

Esta tesis esta constituida por cinco capítulos más. En el capítulo 2 se describen los materiales y métodos utilizados durante el desarrollo de la parte experimental. Posteriormente en el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos en los diferentes análisis y la evaluación de los reactores en continuo, enseguida se presenta el capítulo 4 de discusión de los resultados. En el capítulo 5 se presentan las conclusiones correspondientes y se mencionan algunas recomendaciones. Finalmente en el capítulo 6 se citan todas las referencias bibliográficas consultadas durante el desarrollo de la presente tesis.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Fuente de biomasa

La fuente de biomasa consistió de cuatro diferentes fracciones de lodo metanogénico, obtenidas al tamizar el lodo granular (LG) semilla proveniente de un reactor UASB a escala industrial que trata efluentes de una procesadora de malta, cuya eficiencia de remoción de materia orgánica es mayor a 85%. Para obtener las diferentes fracciones de lodo metanogénico, se tamizaron 3 L de LG semilla con diferente número de malla (12, 18 y 35), y se obtuvieron cuatro diferentes fracciones cuyos volúmenes y tamaños aproximados fueron: 1120 mL entre 3 y 1.7 mm, 1240 mL entre 1.7 mm y 1 mm, 560 mL entre 1 mm y 0.5 mm y 80 mL menor a 0.5 mm, esta última fracción fue descartada para el análisis. Las primeras tres fracciones junto con el LG semilla, se utilizaron para inocular cuatro reactores de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente UASB.

2.1.2 Reactores anaerobios UASB

Para los experimentos en continuo se usaron cuatro reactores de vidrio con diámetro interno de 6 cm, 23 cm de largo con fondo cónico y 0.4 L de volumen de operación. La alimentación de los reactores se realizó por la parte inferior mediante el empleo de una bomba peristáltica con cuatro cabezales, con los cuales se distribuyó la alimentación (afluente) a través del lecho de lodo. En la parte superior de los reactores se colocó un embudo invertido para permitir la separación de las fases sólido-líquido-gas; por la parte superior se colectaban tanto el efluente como el biogás. El arreglo experimental de los reactores se muestra en la

Figura 2.1. Los reactores se inocularon con 62 mL de cada una de las fracciones y del LG para tener una concentración de 20 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV)/L. El tiempo de residencia hidráulica (TRH) fue de 24 y 16 horas.

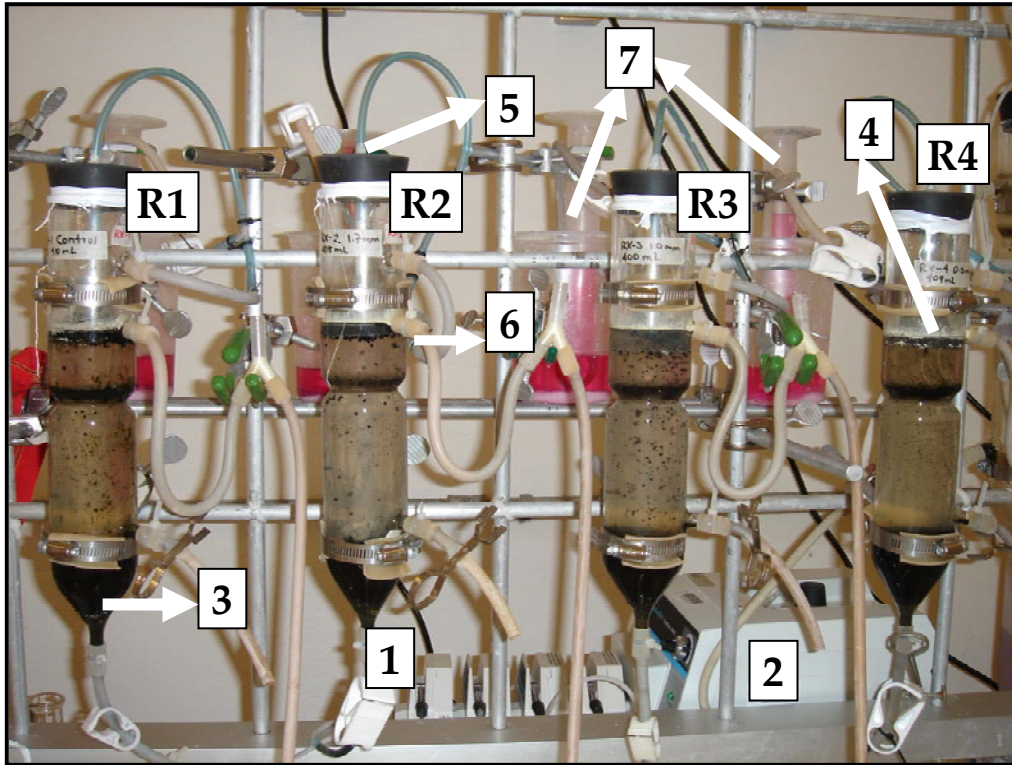


Figura 2.1 Representación esquemática del arreglo experimental de los reactores UASB. 1) Afluente, 2) Bomba de alimentación, 3) Lecho de lodo, 4) Separador sólido-líquido-gas, 5) Biogás, 6) Efluente, 7) Colector de biogás y R representa el número de reactor.

2.2 Medios de cultivo

2.2.1 Medio de alimentación de los reactores

Los reactores se alimentaron con un medio basal cuya composición fue la siguiente (g/L): NH_4Cl (0.3), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.015), KH_2PO_4 (0.2), KCl (0.25), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.15), extracto de levadura (0.02), solución de elementos traza (1 mL/L) conforme a la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Composición de la solución de elementos traza.

Compuesto	Concentración (g/L)
FeCl ₂ ·4H ₂ O	1.50
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.10
EDTA	0.50
H ₃ BO ₃	0.062
ZnCl ₂	0.07
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ ·4H ₂ O	0.036
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.04
NiCl ₃ ·6H ₂ O	0.024
CoCl ₂ ·2H ₂ O	0.07
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.02
HCl 36%	1 mL

2.2.2 Medio para determinar la actividad metanogénica específica (AME)

El medio para determinar la actividad metanogénica específica tenía la siguiente composición (g/L): NaH₂PO₄·H₂O (0.703), K₂HPO₄ (0.6), NH₄Cl (0.28), MgCl₂·6H₂O (0.0916), CaCl₂·2H₂O (0.006), NaHCO₃ (2), extracto de levadura (0.02) y 1 mL de solución de elementos traza. El pH se ajustó a 7 con bicarbonato de sodio. La actividad se ensayó con 1 g DQO/L de acetato ó una mezcla de etanol-lactato (1:1).

2.2.3 Medio para determinar la actividad sulfatorreductora específica (ASRE)

Para la actividad sulfatorreductora, el medio consistió de los siguientes compuestos (g/L): NaH₂PO₄·H₂O (0.703), K₂HPO₄ (0.6), MgCl₂·6H₂O (0.083), NaHCO₃ (1), extracto de levadura (0.002), CaCl₂·2H₂O (0.010) (Karri *et al.*, 2006),

NH₄Cl (0.28), Na₂SO₄ (2.207) y 500 µL de resazurina como indicador redox a partir de una solución de 500 mg/L. La actividad se determinó con 1 g DQO/L de una mezcla etanol-lactato (1:1), lactato, etanol, acetato ó propionato.

2.2.4 Medio de cultivo para determinar el número más probable de BSR

Para la cuantificación de las BSR presentes en el lodo metanogénico, se utilizó el medio Postgate B modificado sin la adición de tioglicolato y extracto de levadura para eliminar los falsos positivos ocasionados por las bacterias que producen sulfuro y no pertenecen a las BSR (Widdel, 1988). El medio consistió de los siguientes compuestos (g/L): KH₂PO₄ (0.5), NH₄Cl (1.0), CaCl₂·2H₂O (0.010), MgSO₄·7H₂O (2.0), NaHCO₃ (1), ácido ascórbico (0.1), FeSO₄·7H₂O (0.5) y la cantidad necesaria de lactato de sodio 60% ó solución stock de acetato 67.2 g DQO/L para tener una concentración en el medio de 3.5 g/L como DQO, agar (1.5). El pH se ajustó a 7 con NaOH antes de adicionar el agar.

2.2.5 Solución Buffer de fosfatos pH 7.0

La solución buffer de fosfatos se preparó a partir de soluciones stock de fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄) 0.2 M (A) y fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) 0.2 M (B). Se mezclaron 39% de la solución A y 61% de la solución B y se les adicionó un volumen igual de agua destilada para obtener un buffer 0.1 M de pH 7 (Bollag y Eldesteing, 1991).

2.2.6 Medio para la determinación de los parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos bajo condiciones sulfatorreductoras, se utilizó la misma composición del medio descrita para la

ASRE en la sección 2.2.3. La fuente de carbono para la determinación de los parámetros fue etanol ó lactato a diferentes concentraciones (0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 g DQO/L). La cantidad de Na_2SO_4 se ajustó de acuerdo a la cantidad de DQO adicionada para mantener la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ estequiométrica de 0.67

2.2.7 Medio para fijar los gránulos en cajas Petri

Para la fijación del lodo se utilizó grenetina de marca comercial (Knox), la cual se preparó según indicaciones en el marbete y se distribuyó en cajas Petri aproximadamente 15 mL de grenetina líquida, posteriormente se fijaron las muestras de gránulos en la grenetina antes de que gelificara completamente (semi-sólida).

2.3 Métodos

2.3.1 Separación de las diferentes fracciones de lodo granular

Para obtener las diferentes fracciones de lodo granular se utilizó la técnica de tamizado, la cual consistió básicamente en hacer pasar el lodo granular a través de diversos tamices con diferente número de malla (12, 18 y 35). Para llevar a cabo el proceso de tamizado se utilizó la solución buffer de fosfatos ajustada a pH 7 para lograr el paso de los gránulos a través de los tamices.

Las diferentes fracciones de lodo obtenidas se denominaron como sigue: LG, lodo granular no fraccionado y de mayor a menor tamaño de diámetro las fracciones se identificaron como fracción A, B ó C.

2.3.2 Determinación del NMP de BSR en las fracciones de lodo

Se utilizó una solución buffer de fosfatos a pH de 7 para realizar diluciones sucesivas del LG y sus fracciones desde 10^{-1} hasta 10^{-20} . El medio Postgate B fue dispensado por triplicado en tubos de ensaye (4.5 mL), que se esterilizaron al igual que los tubos de dilución a 121°C y 20 psi de presión. Cada dilución sucesiva se inoculó (0.5 mL) en tres tubos con medio Postgate B. La presencia de las BSR se determinó cualitativamente a partir del ennegrecimiento del medio ocasionado por la formación de sulfuro de hierro (FeS) debida a la reducción no asimilativa del sulfato (Postgate, 1984). Los tubos se incubaron a 35°C por un periodo de 30 días durante el cual se revisaban periódicamente. La cuantificación del NMP se realizó mediante la ecuación estadística reportada en el Standard Methods (APHA, 1995).

2.3.3 Determinación de la actividad metanogénica específica (AME)

La caracterización del LG se realizó mediante el análisis de la actividad metabólica específica máxima del lodo, la cual se define como la velocidad de producción de metano expresada como DQO con respecto al contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el lodo granular ($\text{g DQO-CH}_4/\text{g SSV-día}$). La AME tanto en el lodo antes de inocular como en el lodo contenido en los reactores, se realizó por triplicado en botellas serológicas de 60 mL, conteniendo 25 mL de medio descrito en la sección 2.2.2 y 2 g SSV/L de lodo granular. Se adicionaron 2 g DQO/L a partir de una solución stock de ácido acético (67.2 g DQO/L) neutralizada a pH 7.1. La AME también se determinó con el inhibidor de las BSR, molibdato de sodio a una concentración de 30 mM para descartar la competencia de los MM y las BSR por el substrato (Oremland y Capone, 1988). Las botellas serológicas fueron selladas con tapones de hule y arillos de aluminio. Posteriormente, las botellas se purgaron para

eliminar el exceso de gas mediante el uso de un recipiente que contenía agua (Figura 2.2 A). Como control se utilizaron botellas serológicas con la misma concentración de SSV, medio mineral pero sin la adición de sustrato. Este control fue utilizado para corregir la producción de metano endógena. Las botellas se incubaron durante 72 h a 35°C y 100 rpm. Después de 72 h se repuso 1 g DQO/L de ácido acético en cada botella para determinar la actividad. Cabe mencionar que para la determinación de la AME del lodo de cada uno de los reactores en continuo no se realizó la incubación por 72 horas y se adicionó directamente sólo 1 g DQO/L. Las botellas se incubaron nuevamente a 35°C (30°C para las actividades de los reactores). La producción de metano se midió cada 2 h durante 72 horas mediante la técnica de desplazamiento de una solución de NaOH al 3% (Figura 2.2 B). Los ácidos grasos volátiles se determinaron por electroforesis capilar. Posteriormente se calculó la velocidad de producción de metano (mL CH₄/h) a partir de la máxima pendiente obtenida al graficar los mililitros de metano producido con respecto al tiempo y el contenido de SSV en cada botella.

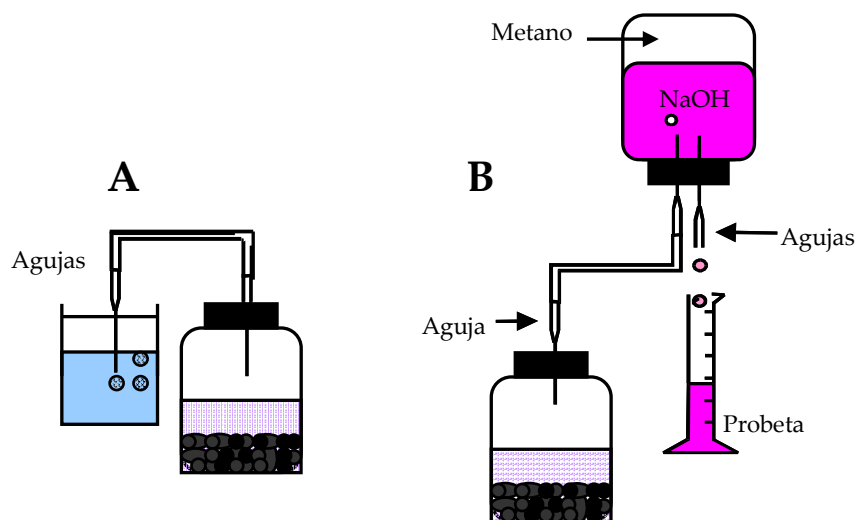


Figura 2.2 Representación esquemática del equilibrio de la fase gaseosa con la presión atmosférica (A), cuantificación de metano para la determinación de la actividad metanogénica específica (B).

2.3.4 Determinación de la actividad sulfatorreductora específica (ASRE)

La actividad sulfatorreductora específica de lodo, se define como la velocidad de producción de H₂S expresada como DQO (g DQO-H₂S/g SSV-día), para determinar la capacidad máxima de reducción de sulfato.

La ASRE de las fracciones de lodo antes de inocular y durante la operación en continuo de los reactores, se realizó por triplicado en botellas serológicas de 125 mL y 60 mL, las cuales contenían 122 mL y 60 mL de medio mineral (sección 2.2.3) sin adición de elementos traza para evitar que los metales presentes de esta solución reaccionaran con el sulfuro, el inóculo se adicionó a una concentración de 1 g SSV/L y 2 g SSV/L respectivamente. La finalidad de no dejar espacio de cabeza fue para evitar una fase gaseosa y que todo el sulfuro producido se mantuviera en la fase líquida. La concentración de DQO para el pre-acondicionamiento de las fracciones de lodo fue de 3.5 g DQO/L. La actividad en las fracciones de lodo antes de inocular se determinó con una mezcla etanol-lactato (1:1), lactato, acetato, propionato y etanol, mientras que para los ensayos de actividad de los lodos de los reactores en continuo sólo se utilizó una mezcla etanol-lactato o etanol como fuente de carbono. Se adicionó sulfato de sodio para tener una relación DQO/ SO₄²⁻ de 0.67. Las botellas de las fracciones se incubaron a 35°C durante 72 h, mientras que las botellas para los ensayos de los reactores en continuo se incubaron a 30°C y 100 rpm sin periodo de acondicionamiento. Al término de 72 h de aclimatación de las botellas para las fracciones de lodo, se cambió el líquido de las botellas y se repuso con 1 g DQO/L para mantener la relación DQO/ SO₄²⁻ de 0.67. También se preparó un control sin sustrato. El sulfuro disuelto se determinó mediante el método colorimétrico (Cord-Ruwisch, 1985) cada 3 h por un periodo de 78 h. La actividad específica se determinó mediante la pendiente obtenida al graficar la concentración

de sulfuro disuelto con respecto del tiempo (Figura 2.3) y el contenido de SSV en cada una de las botellas.

La prueba de actividad con acetato en las fracciones de lodo y LG, se realizó con y sin inhibidor de las bacterias metanogénicas. El inhibidor utilizado fue el ácido-2-bromoetanosulfónico (BESA) a una concentración de 30mM. El sulfato (inicial y residual) y los AGV se midieron por electroforesis capilar

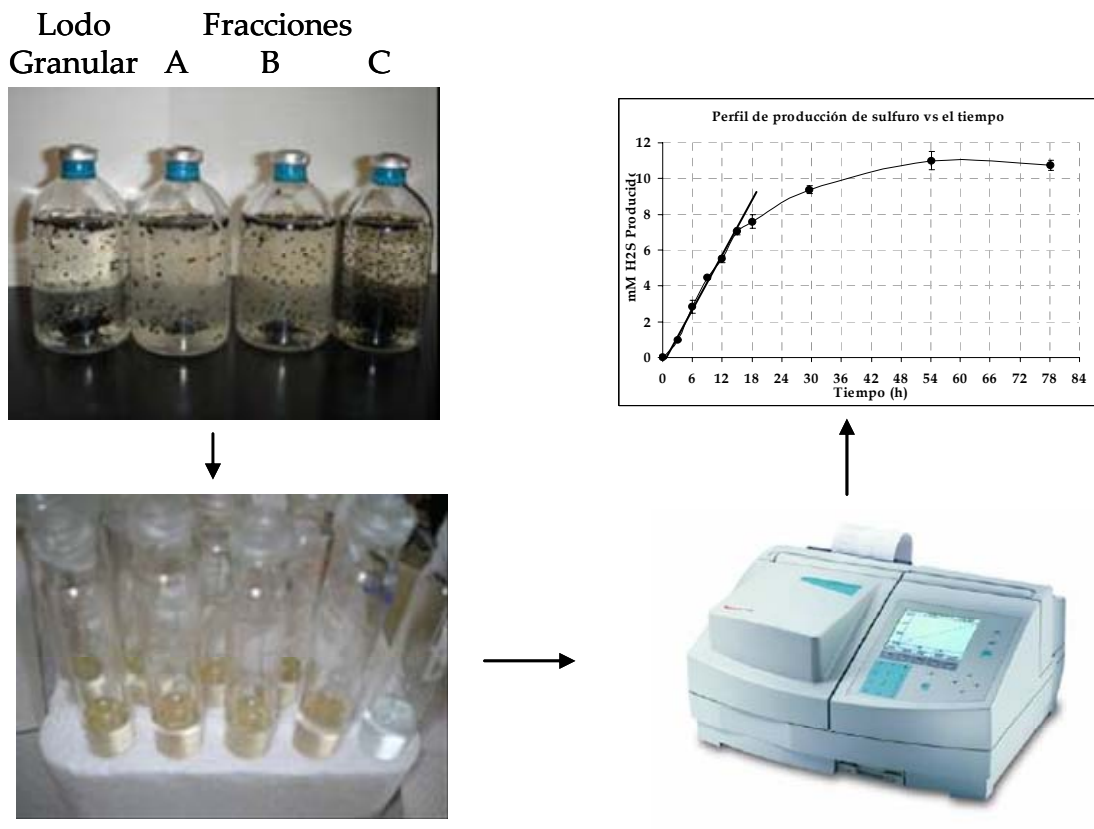


Figura 2.3 Representación de la determinación del sulfuro en las pruebas de ASRE y obtención de la pendiente a partir de la curva obtenida al graficar la producción de sulfuro con respecto al tiempo.

2.3.5 Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos en cada una de las fracciones de lodo granular y el LG semilla se llevó a cabo por triplicado en botellas serológicas de 125 mL, el medio utilizado fue descrito en la sección 2.2.6. Las botellas se inocularon con 2 g SSV/L y se acondicionaron con 2 g DQO/L de cada uno de los substratos a evaluar (etanol o lactato), la cantidad de sulfato fue la necesaria para mantener la relación estequiométrica de DQO/ SO_4^{2-} de 0.67. Las botellas se sellaron con tapones de hule y arillos de aluminio. El tiempo de acondicionamiento fue de 72 h a 30°C y 100 rpm. Al término de 72 h, el líquido se cambió y se adicionó la cantidad necesaria de sustrato para tener una concentración de 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 g DQO/L, la relación DQO/ SO_4^{2-} se mantuvo en 0.67. La producción de sulfuro y metano así como la DQO consumida se determinaron cada 3 h durante 12 h. La cuantificación de sulfuro y metano se realizó como ya se describió en las secciones 2.3.3 y 2.3.4. El sulfato residual y AGV se determinaron por electroforesis capilar. Para determinar los valores de K_s y q_{max} se utilizó la ecuación de Monod, la cual se ajustó linealmente con la ecuación de Hanes.

2.3.6 Operación de los reactores

Se inocularon 4 reactores UASB con las diferentes fracciones de lodo y el LG a una concentración de 20 g SSV/L. Se usó una bomba peristáltica con cuatro cabezales para alimentar los reactores. El biogás se cuantificó mediante el desplazamiento de una solución saturada de NaCl (300 g/L) acidificada (pH=2) y contenida en una columna invertida, se utilizó rojo de metilo como indicador de la disolución de CO_2 .

De acuerdo a la variación de carga orgánica y concentración de sulfato en la alimentación de los reactores, se pueden distinguir cinco periodos de operación en continuo de los reactores. El periodo I fue considerado como periodo de aclimatación de la biomasa a la fuente de carbono diferente a la cual se operaba originalmente. Para los periodos II y III la carga orgánica fue de 2 g DQO/L-d de una mezcla etanol- lactato (1:1 en base a DQO). En los periodos IV y V la carga fue de 3 g DQO/L-día, la fuente de carbono se modificó en estos periodos. Para el periodo IV se mantuvo la mezcla etanol-lactato, mientras que para el periodo V el etanol fue el único substrato utilizado como fuente de carbono. En los cinco periodos se utilizó sulfato de sodio como fuente de sulfato. En la Tabla 2.2, se muestran las condiciones de operación promedio en cada uno de los periodos de operación en continuo de los reactores.

En el afluente de los reactores se cuantificó la concentración de DQO, sulfato y pH, mientras que en el efluente se determinó la concentración de sulfato residual y AGV, sulfuro de hidrógeno por yodometría, pH y alcalinidad.

Tabla 2.2 Condiciones de operación de los reactores UASB en los diferentes periodos experimentales.

Periodo (días)	I (0-9)	II (10-32)	III (33-65)	IV (66-114)	V (115-236)
Velocidad de carga orgánica (g DQO /L-día)	0.50	2.0	2.0	3.0	3.0
Velocidad de carga de sulfato (g SO ₄ ²⁻ /L-día)	0.75	3.0	3.0	4.5	4.5
Etanol:Lactato	1:1	1:1	1:1	1:1	1:0
pH	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6
TRH (días)	1.0	1.0	1.0	0.66	0.66
Relación DQO/ SO ₄ ²⁻ (g/g)	0.67	1.34	0.67	0.67	0.67

2.3.7 Determinación del diámetro promedio de los gránulos mediante análisis de imagen

La determinación del diámetro de gránulo se basó en la técnica descrita por Jeison y Chamy (1998). Para la determinación del diámetro de los gránulos presentes en cada una de las fracciones de lodo obtenidas antes de inocular los reactores y al término de la operación en continuo de los mismos (periodo V). Para facilitar la manipulación de las muestras para su posterior análisis, los lodos fueron fijados en grenetina semi-sólida (sección 2.2.7) contenida en cajas Petri, esta actividad se realizó por triplicado, se tomaron aproximadamente 3 a 4 mL de lodo de cada una de las muestras y se fijaron en las cajas Petri (tres cajas por cada fracción e inóculo de los reactores) entre 200 y 250 gránulos de cada muestra.

Para realizar la curva estándar, se utilizaron esferas de diámetro conocido, se fijaron en las cajas Petri y fueron manipuladas de igual forma que las muestras. Posteriormente se obtuvo la imagen de las cajas con un escáner marca HP. Para el escaneo de las cajas petri con muestra, el escáner se calibró a escala de grises para obtener imágenes homogéneas. Las imágenes se analizaron mediante el software *ImageTol UTHSCSA*, desarrollado por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas. El programa esta disponible en internet por anonymous FTP (<ftp://maxrad6.uthscsa.edu>). Las imágenes se adquirieron con Windows XP 2003. Los datos obtenidos de aproximadamente 600 gránulos por muestra fueron analizados estadísticamente en el software OriginLab, para obtener los perfiles de distribución del tamaño de gránulos en las diferentes fracciones de lodo e inóculo de los reactores.

2.4 Análisis

2.4.1 Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

La determinación de los sólidos suspendidos volátiles, sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos fijos se realizó de acuerdo al Standard Methods (APHA, 1995).

2.4.2 Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO se determinó mediante el micro método de reflujo cerrado. La muestra de efluente se burbujeó con aire durante 5 minutos para eliminar la interferencia del sulfuro de hidrógeno. Se tomaron 2 mL de la muestra previamente centrifugada en una microcentrifuga modelo Tomy Kogyo HF-120 y se adicionaron 2.8 mL de ácido sulfúrico y 1.2 mL de solución digestora de dicromato. El método se basa principalmente en oxidar la muestra con una solución de dicromato de potasio en condiciones ácidas, utilizando ácido sulfúrico y sulfato de plata como catalizador a 150°C durante dos horas en tubos de vidrio (Hach). La absorbancia se cuantificó a 600 nm en un espectrofotómetro Termo Spectronic modelo Aqua Mate. Para llevar a cabo la cuantificación de la DQO, se realizó una curva estándar de glucosa anhidra a intervalos de concentración entre 50 y 1000 mg DQO/L.

2.4.3 Determinación de sulfuro en el efluente de los reactores

La concentración de sulfuro disuelto en el efluente de los reactores, se determinó por el método yodométrico, el cual se basa principalmente en la cuantificación del yodo remanente mediante la titulación con una solución estándar de tiosulfato de sodio 0.025 N como se describe en el Standard Methods (APHA, 1995). En un

matraz erlenmeyer de 250 mL se adicionaron 10 mL de agua destilada, 10 mL de una solución de yodo 0.025 N, 1 mL de HCl 3N, se adicionaron 5 mL de muestra, enseguida se agregaron 5 gotas de solución indicadora de almidón (20g/L), posteriormente se tituló con una solución de tiosulfato de sodio 0.025N

2.4.4 Determinación de sulfuro por el método de Cord-Ruwisch

En los ensayos de actividad, el sulfuro disuelto se determinó mediante la reacción con sulfato de cobre, con la cual se generó la precipitación coloidal de sulfuro de cobre (Cord-Ruwisch, 1985). En un tubo marca Hach se adicionaron 4 mL de una solución que contenía sulfato de cobre 5 mM y HCl 50 mM, posteriormente se adicionó 0.1 mL de muestra, se agitó vigorosamente con un vortex e inmediatamente se midió la absorbancia fotométricamente en un espectrofotómetro Thermo Spectronic modelo Aqua Mate a una longitud de onda de 480 nm. Se realizó una curva estándar de sulfuro de sodio con un intervalo de concentraciones desde 0 hasta 20 mM, con la cual las absorbancias obtenidas se convirtieron en milimoles por litro de H₂S.

2.4.5 Determinación de sulfato y ácidos grasos volátiles (AGV)

El sulfato se determinó una vez que la muestra fue centrifugada, diluida y filtrada mediante electroforesis capilar (Agilent 1600A) usando un capilar de sílice fundida de 80.5 cm de longitud (72 cm de longitud efectiva) por 50 mm de diámetro interno. El electrolito contenía 5mM de ácido dicarboxílico 2,6-piridina y 0.5 mM de bromocetiltrimetilamonio como modificador del flujo electro-osmótico, a pH 5.6 ajustado con NaOH 1 M. La muestra se inyectó a una presión de 50 mbar por 6 segundos. El voltaje aplicado fue de -25kV y la temperatura utilizada para el

capilar fue de 20°C. La detección se realizó indirectamente mediante un detector de arreglo de diodos; la señal fue determinada a una longitud de onda de 350 nm con una referencia de 200 nm. Todos los reactivos fueron de alta pureza incluyendo los estándares; para la preparación del electrolito se utilizó agua desionizada a 18 megaohm-cm. El control del sistema, captura y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el uso del software ChemStation B.01.03 (204).

2.4.6 Determinación de alcalinidad en los reactores

Se determinó la alcalinidad total y alcalinidad por AGV en 20 mL de efluente de cada uno de los reactores, con una solución de HCl 0.1N hasta un pH de 5.8 para la cuantificación de la alcalinidad por bicarbonato (CaCO_3) y hasta un pH de 4.3 para la alcalinidad por AGV (APHA, 1995).

2.4.7 Determinación de pH

El pH del efluente de los reactores, se determinó en 20 mL a temperatura ambiente empleando el potenciómetro Termo Electron Corporation Orion 4 Star.

2.5 Cálculos

2.5.1 Parámetros de operación de los reactores

$$TRH = \left(\frac{V_r}{Q_l} \right) = \text{Tiempo de residencia hidráulica (días)}$$

$$VCO_{DQO} = \left(\frac{DQO_{af} * Q_l}{V_r} \right) = \text{Velocidad de carga orgánica} \left(\frac{gDQO}{L * d} \right)$$

$$VC_{SO_4^{2-}} = \left(\frac{SO_4^{2-} \text{ af} * Q_l}{V_r} \right) = \text{Velocidad de carga de sulfato} \left(\frac{gSO_4^{2-}}{L * d} \right)$$

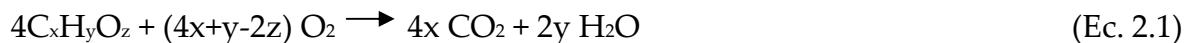
Donde:

V_r = Volumen del reactor (L)

Q_l = Flujo del líquido (L/d)

2.5.2 Equivalencia teórica de las diferentes fuentes de carbono en términos de DQO

Se utilizó la ecuación descrita por Tarvin y Buswell (1934), para determinar las equivalencias teóricas de DQO de los compuestos utilizados en los experimentos de actividad y alimentación de los reactores.



Las equivalencias teóricas de los substratos utilizados fueron las siguientes:

$$\text{Ácido láctico (C}_3\text{H}_6\text{O}_3\text{): } \frac{1.066gDQO}{gC_3H_6O_3}$$

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

$$\text{Ácido propiónico (C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{): } \frac{1.512gDQO}{gC_3H_6O_2}$$

$$\text{Etanol (C}_2\text{H}_6\text{O): } \frac{2.086gDQO}{gC_2H_6O}$$

2.5.3 Determinación de las actividades metanogénica y sulfatorreductora

Para la determinación de las actividades específicas se graficaron los valores obtenidos de metano y sulfuro de hidrógeno con respecto al tiempo, de la curva

obtenida se tomó la máxima pendiente, la cual se dividió entre la concentración de SSV contenidos en cada botella.

$$AME = \frac{mCH_4}{V_B * SSV * f_{cM}} = \frac{gDQO - CH_4}{gSSV * d}$$

$$ASR = \frac{mH_2S}{V_B * SSV * f_{cS}} = \frac{gDQO - H_2S}{gSSV * d}$$

Donde:

$m CH_4$ = pendiente de la producción acumulativa de metano con respecto al tiempo $\left(\frac{L}{d}\right)$

f_{cM} = Factor de conversión de CH_4 a g DQO = $\frac{0.35LCH_4}{gDQO}$ a STP

$m H_2S$ = pendiente de la producción de sulfuro contra el tiempo $\left(\frac{gH_2S}{L * d}\right)$

f_{cS} = Factor de conversión de H_2S a g DQO = $\left(\frac{0.5gH_2S}{gDQO}\right)$

V_B = Volumen de líquido en la botella (L)

SSV = Cantidad de SSV en la botella (g SSV)

2.5.4 Velocidad de conversión de DQO

$DQO_{af} = \left(\frac{DQO_{af}}{TRH}\right) =$ Carga de DQO en el afluente $\left(\frac{g}{L * d}\right)$

$VC_{DQO} = \left(\frac{DQO_{af} - DQO_{Ef}}{TRH}\right) = VC_{DQO} \left(\frac{g}{L * d}\right)$

2.5.5 Cuantificación de sulfuro disuelto

$$\frac{mLS^{2-}}{L} = \left(\frac{[N_{yodo} * Y] - [N_{Tio} * T]}{mLmtra} \right) * F_c$$

Donde:

N_{yodo} = Normalidad del yodo

N_{Tio} = Normalidad del tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$)

Y = mL de yodo gastados

T = mL de $Na_2S_2O_3$ gastados

F_c = Factor de conversión (16000)

2.5.6 Factor de conversión de sulfuro a sulfato

$$\left(\frac{gH_2S}{L} \right) * \left(\frac{96gSO_4^{2-}}{34gH_2S} \right) = 2.82 \frac{gSO_4^{2-}}{L}$$

2.5.7 Porcentaje de DQO removido

$$\%DQO_{remv} = \left(\frac{DQO_{af} - DQO_{ef}}{DQO_{af}} \right) * 100$$

$$(gDQO_{af}) * \left(\frac{\%DQO_{remv}}{100} \right) = gDQO_{remv}$$

2.5.8 Porcentaje de DQO removido por BSR

$$gDQO_{BSR} = 0.67(SO_4^{2-})$$

$$\%DQO_{BSR} = \frac{gDQO_{BSR}}{gDQO_{af}} * 100$$

2.5.9 Porcentaje de DQO removido por MM

$$gDQO_{MM} = gDQO_{conv} - gDQO_{BSR}$$
$$\%DQO_{MM} = \frac{gDQO_{MM}}{gDQO_{inf}} * 100$$

2.5.10 Cuantificación del número más probable de BSR

La cuantificación de las BSR en términos de NMP se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$NMP(Tabla) \times \frac{10}{Vol.NMP} = \frac{NMP}{100mL} \quad (Ec. 2.2)$$

Donde:

NMP (Tabla): Valor obtenido a partir de los tubos positivos y la tabla 9221-IV del Standard Method (1995)

Vol. NMP: Volumen más grande evaluado en los tubos positivos

2.5.11 Ecuaciones para determinar los parámetros cinéticos K_s y q_{max}

Para determinar los parámetros cinéticos (K_s y q_{max}) se graficaron los valores de actividad contra la concentración de sustrato y obtener una curva tipo Monod, posteriormente, la curva obtenida se ajustó al modelo lineal de Hanes.

$$q = \frac{q_{max}S}{K_s + S} \quad (Ec. 2.3 Monod)$$

$$\frac{[S]}{q} = \frac{1}{q_{max}}[S] + \frac{K_s}{q_{max}} \quad (Ec. 2.4 Ecuación lineal de Hanes)$$

3. Resultados

En esta sección se presentan los resultados de la caracterización de las diferentes fracciones de lodo granular y de la determinación de los parámetros cinéticos. Enseguida se presenta el desempeño de los reactores en los diferentes periodos de operación en continuo. Posteriormente se muestran los resultados comparativos de las pruebas de actividad metanogénica, actividad sulfatorreductora antes de inocular y en diferentes periodos de operación en continuo de los reactores, así como la cuantificación del número más probable de BSR antes de inocular los reactores y al final de la operación en continuo. Finalmente, se muestra la comparación de los diámetros promedio antes de inocular y al término de la operación en continuo de los reactores.

3.1 Determinación del tamaño de gránulo y contenido de SSV en las fracciones de lodo granular

A partir de 3 L de lodo granular (LG), se obtuvieron cuatro fracciones de lodo mediante la técnica de tamizado (Figura 3.1). Los volúmenes de las fracciones obtenidas fueron: 1120 mL de gránulos con tamaño aproximado de 1.7 y 3 mm (fracción A); 1240 mL para gránulos con tamaño entre 1.7 y 1.0 mm (fracción B); 560 mL de gránulos con tamaño entre 1.0 mm y 0.5 mm (fracción C) y 80 mL de gránulos con un tamaño menor a 0.5 mm, la cual no se tomó en cuenta para los experimentos. Estas fracciones y una porción del LG sin fraccionar fueron utilizadas para inocular cuatro reactores UASB, los cuales se operaron bajo condiciones sulfatorreductoras. En la Tabla 3.1 se muestra el contenido de SSV y el diámetro promedio de las diferentes fracciones obtenidas mediante el análisis de imagen antes de inocular los reactores.

Tabla 3.1 Propiedades físicas del lodo granular sin fraccionar (LG) y de las diferentes fracciones de lodo usadas como inóculo.

Fracción	Tamiz (# malla)	Tamaño aproximado (mm)	Diámetro promedio ^a (mm)	%SSV
LG	–	Control	2.70 (\pm 0.96)	13.18 (\pm 0.29)
A	12	3.0 y 1.7	3.04 (\pm 0.93)	13.52 (\pm 0.22)
B	18	1.7 y 1.0	2.46 (\pm 0.73)	13.40 (\pm 0.66)
C	35	1.0 y 0.5	1.69 (\pm 0.68)	13.18 (\pm 0.71)

^{a)} Determinado por análisis de imagen

El contenido de SSV fue prácticamente igual en cada una de las fracciones de lodo así como en el lodo granular sin fraccionar. El porcentaje de SSV fue utilizado como referencia para determinar la cantidad de lodo a inocular en cada uno de los reactores UASB.

3.2 Parámetros cinéticos (K_s y q_{max}) en las diferentes fracciones del lodo granular

Los parámetros cinéticos K_s (constante de afinidad por el sustrato) y q_{max} (velocidad máxima de utilización del sustrato) en las diferentes fracciones de lodo se calcularon a partir de la producción de sulfuro de hidrógeno y metano bajo condiciones sulfatorreductoras con etanol ó lactato como sustrato a las siguientes concentraciones (0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 g DQO/L). Los valores de K_s y q_{max} se obtuvieron a partir de la ecuación de Monod la cual se ajustó linealmente con el modelo descrito por Hanes representado en la Figura 3.1, este modelo presentó una correlación de ajuste de $R^2= 0.97$.

Los valores de K_s y q_{max} calculados a partir de la producción de sulfuro de hidrógeno y metano se reportan en las Tabla 3.2 y 3.3.

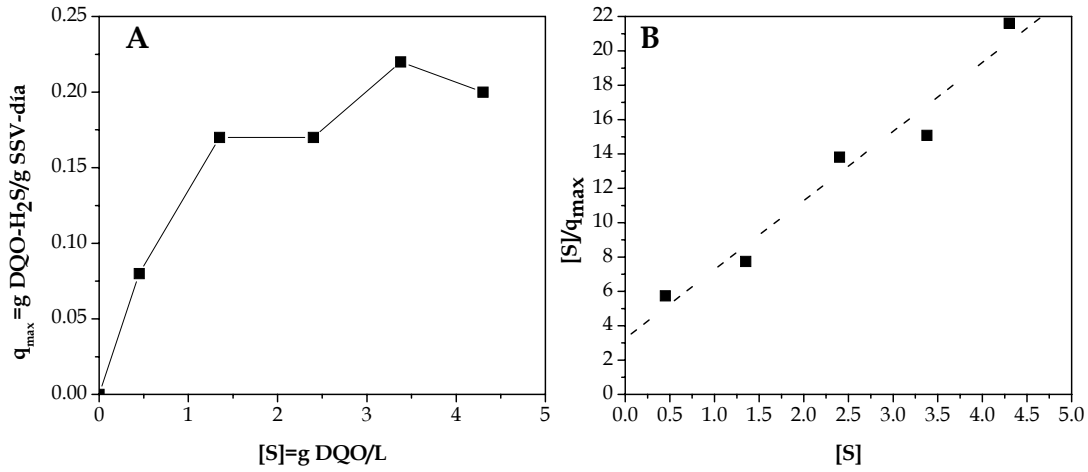


Figura 3.1 Curva tipo Monod (A) y su correspondiente ajuste lineal mediante el modelo descrito por Hanes (B). Los datos presentados corresponden a la fracción C con etanol como sustrato.

Cuando se utilizó etanol como sustrato, los parámetros cuantificados a partir del sulfuro producido (Tabla 3.2) indicaron que el lodo granular sin fraccionar presentó la mayor afinidad por el sustrato, $K_s = 0.66$ g DQO/L; mientras que de las fracciones, la fracción B presentó la menor K_s (0.81 g DQO/L), es decir fue más afín por el sustrato. En contraste, la fracción C presentó la menor afinidad por el sustrato (1.45 g DQO/L) pero mayor velocidad de utilización del mismo ($q_{max} = 0.35$ g DQO-H₂S/g SSV-día). No se observó una relación clara entre las constantes de afinidad y el diámetro de las fracciones al usar etanol como sustrato; sin embargo, la velocidad máxima de utilización de sustrato si presentó una correlación con el diámetro al usar etanol, ya que la q_{max} fue mayor a medida que el diámetro del gránulo fue menor (Tabla 3.2).

Al determinar la K_s y q_{max} con lactato, la fracción C presentó la mayor afinidad por el sustrato ($K_s = 0.11$ g DQO/L), mientras que la velocidad de

utilización por el substrato fue muy similar para todas las fracciones incluyendo el lodo granular sin fraccionar y no se observó una relación con el diámetro de gránulo.

Tabla 3.2 Parámetros cinéticos con etanol y lactato en las diferentes fracciones de lodo calculados a partir de la producción de sulfuro.

Fracción	Etanol		Lactato	
	K_s $\left(\frac{gDQO}{L}\right)$	q_{max} $\left(\frac{gDQO - H_2S}{gSSV - día}\right)$	K_s $\left(\frac{gDQO}{L}\right)$	q_{max} $\left(\frac{gDQO - H_2S}{gSSV - día}\right)$
LG (2.7 mm)	0.66	0.29	0.34	0.20
A (3.04 mm)	0.90	0.17	0.14	0.14
B (2.46 mm)	0.81	0.25	0.43	0.18
C (1.69 mm)	1.45	0.35	0.11	0.12

Por otro lado, también se calcularon los parámetros cinéticos con la producción de metano bajo condiciones sulfatorreductoras (Tabla 3.3). El LG sin fraccionar nuevamente presentó el menor valor de K_s (0.10 g DQO/L) con etanol, la fracción B presentó los menores valores de K_s (0.43 y 0.05 g DQO/L) con etanol y lactato respectivamente, comparada con las fracciones A y C. Para el caso de la q_{max} con lactato, no se observó una correlación con el diámetro de la fracción de lodo (Tabla 3.3). La velocidad máxima de utilización del substrato fue igual (0.32 g DQO-CH₄/g SSV-día) en las fracciones B, C y LG sin fraccionar cuando se utilizó etanol como substrato. En tanto la q_{max} determinada con lactato fue igual (0.13 DQO-CH₄/g SSV-día) para el LG sin fraccionar y la fracción B, mientras que para las fracciones A y C la velocidad máxima de utilización de substrato fue casi nula.

Tabla 3.3 Parámetros cinéticos, calculados a partir de la producción de metano, con etanol y lactato en las diferentes fracciones de lodo granular bajo condiciones sulfatorreductoras.

Fracción	Etanol		Lactato	
	K_s $\left(\frac{gDQO}{L}\right)$	q_{max} $\left(\frac{gDQO-CH_4}{gSSV-día}\right)$	K_s $\left(\frac{gDQO}{L}\right)$	q_{max} $\left(\frac{gDQO-CH_4}{gSSV-día}\right)$
LG (2.7 mm)	0.10	0.32	0.33	0.13
A (3.04 mm)	0.58	0.49	0.07	0.06
B (2.46 mm)	0.43	0.32	0.05	0.13
C (1.69 mm)	0.76	0.32	0.27	0.02

Finalmente, al comparar los diferentes sustratos se observó que los microorganismos presentes en todas las fracciones de lodo tenían mayor afinidad por lactato pero mayor velocidad de utilización de etanol.

3.3 Desempeño de los reactores en continuo

La nomenclatura asignada a los reactores UASB fue la siguiente: R1, reactor inoculado con LG sin fraccionar; R2, reactor inoculado con la fracción A; R3, reactor inoculado con la fracción B y R4, reactor inoculado con la fracción C (Figura 3.2). Los cuatro reactores UASB se inocularon con 20 g SSV/L de cada una de las fracciones de lodo granular metanogénico

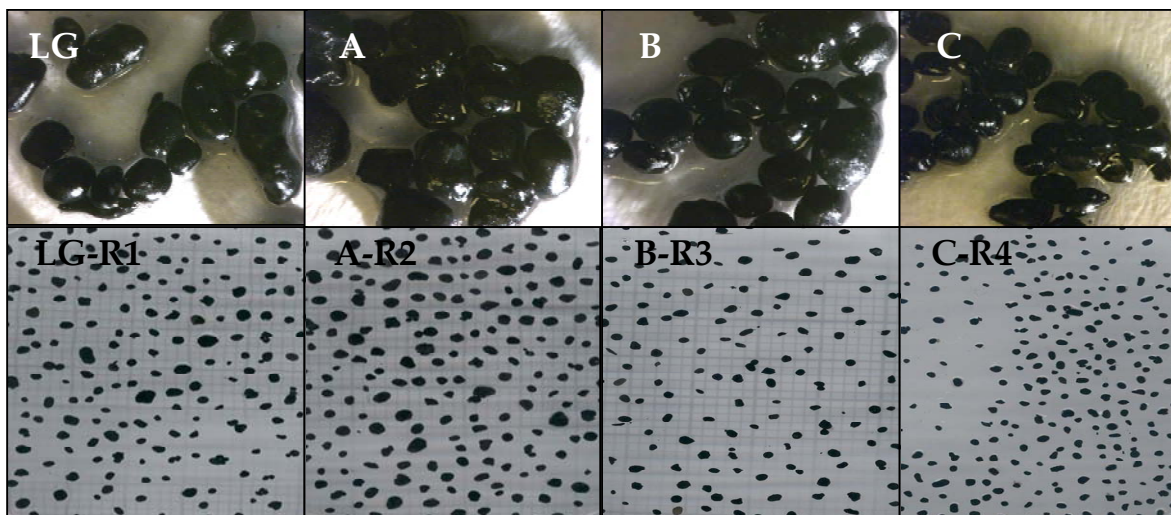


Figura 3.2 Fotos obtenidas con un estereoscopio (paneles superiores) e imágenes adquiridas con el escáner, de los gránulos fijados en grenetina: LG, A, B y C corresponden a las fracciones contenidas en los diferentes reactores representados por R1, R2, R3 y R4.

Los resultados de los cuatro reactores operados en continuo, se dividieron en cinco periodos para su mejor análisis. El periodo I (9 días) consistió básicamente en un periodo de adaptación de la biomasa al substrato (mezcla etanol-lactato) con una carga orgánica de 0.5 g DQO/L-día, la relación DQO/SO_4^{2-} fue la estequiométrica de 0.67 y el TRH de un día. En el periodo II la relación DQO/SO_4^{2-} y la carga orgánica fueron de 1.34 y 2 g DQO/L-día manteniendo el TRH de un día. En los periodos III y IV se mantuvo constante la relación DQO/SO_4^{2-} (0.67) y la carga orgánica fue de 2 y 3.03 g DQO/L-día respectivamente. La alimentación para los primeros cuatro periodos consistió de una mezcla etanol: lactato (1:1 en base DQO). El último periodo de operación (V) de los reactores se llevó a cabo con etanol como única fuente de carbono (2 g DQO/L), la relación DQO/SO_4^{2-} se mantuvo en 0.67 y la carga orgánica fue 3.03 g DQO/L-día.

Las eficiencias de remoción de DQO por las BSR y por los MM, y la concentración promedio de sulfuro producido en cada uno de los periodos se

resumen en las Tablas 3.4 (periodos II, III y IV) y 3.5 (periodo V). Para el periodo I no se muestran valores promedio dado que se tomó como periodo de aclimatación de la biomasa.

En los cuatro reactores la eficiencia de remoción de DQO fue superior a 91%. En el periodo II en el cual se mantuvo la relación DQO/SO_4^{2-} de 1.34 la eficiencia de remoción de DQO por los MM predominó considerablemente en los cuatro reactores sobre las BSR como se muestra en la Figura 3.3, esta eficiencia de remoción de DQO por los MM fue mayor a medida que aumentó el diámetro de gránulo (R2). Sin embargo, en el periodo III no se observó una relación entre el diámetro de gránulo y la DQO removida por las BSR, la eficiencia de remoción de DQO se mantuvo alrededor de 90% en promedio para los cuatro reactores. En el periodo IV al aumentar la carga de DQO (3.03 g/L-día) y la carga de SO_4^{2-} (4.52 g/L-día) la eficiencia de remoción DQO disminuyó ligeramente en los cuatro reactores hasta 89% en promedio. Otro aspecto importante fue el aumento de alrededor de 65% de utilización de DQO por las BSR en los reactores 2 y 4 respecto de la DQO utilizada por las mismas en el periodo III. En cuanto a la DQO utilizada por los MM fue evidente que el R4 (fracción más pequeña de lodo) presentó la mayor disminución de DQO (5.6%) utilizada por los MM. Debido a las eficiencias de remoción de DQO mayores a 88% obtenidas durante los primeros cuatro periodos de operación de los reactores alimentados con la mezcla etanol-lactato, se decidió alimentar los reactores con etanol como única fuente de carbono para el último periodo de operación (V), manteniendo la carga orgánica de 3.03 g DQO/L-día y la relación DQO/SO_4^{2-} de 0.67. En la Tabla 3.5 se resumen las condiciones de operación y las eficiencias de remoción.

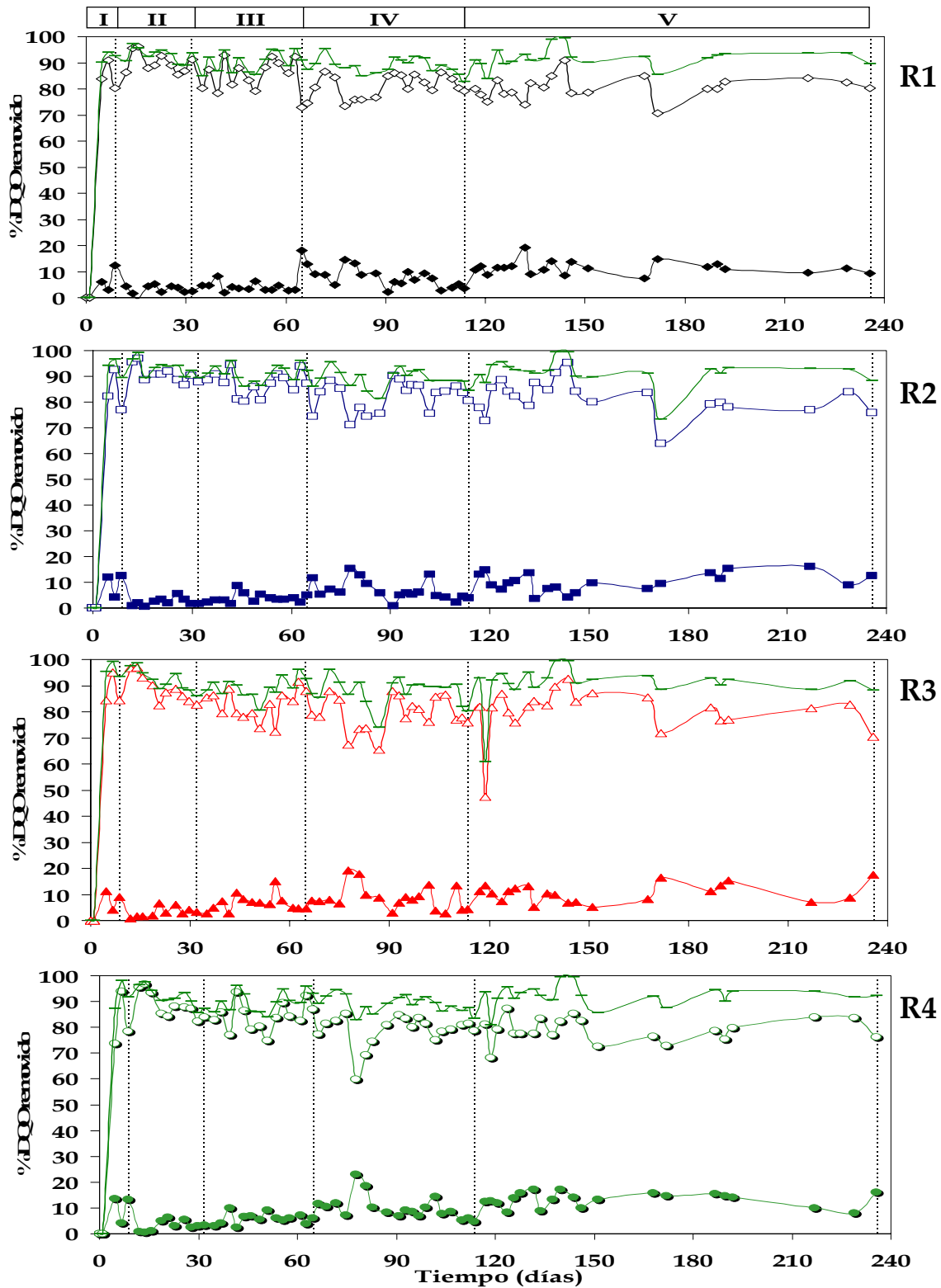


Figura 3.3 Porcentajes de DQO utilizado en cada periodo de operación (I, II, III, IV y V) en los reactores R1 a R4 por BSR (◆■▲●), por MM (◇□△○) y eficiencia de remoción de DQO (-).

Tabla 3.4 Condiciones de operación de los reactores, producción de sulfuro y eficiencias de remoción promedio en los periodos II, III y IV.

Periodo (días)	II (10-32)				III (33-65)				IV (66-114)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Condiciones de operación												
*Substrato (g DQO/L)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
**VCO (g DQO/L-día)	2	2	2	2	2	2	2	2	3.03	3.03	3.03	3.03
DQO/SO ₄ ²⁻	1.34	1.34	1.34	1.34	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
TRH (días)	1	1	1	1	1	1	1	1	0.66	0.66	0.66	0.66
Sulfuro (mg/L)	32.3	26.5	35.9	35.9	50.4	37.0	65.5	57.1	78.6	70.4	89.3	106.4
pH final	7.5	7.6	7.7	7.7	7.5	7.7	7.7	7.7	7.8	7.9	7.9	7.9
Eficiencias de remoción												
% DQO	93.1	93.2	92.0	91.6	90.3	91.2	89.3	90.1	89.5	89.6	88.2	89.1
% BSR	3.1	2.4	3.2	3.2	5.1	3.8	6.7	5.9	7.10	6.4	8.2	9.7
% MM	90.0	90.8	88.8	88.4	85.2	87.4	82.6	84.2	82.42	83.2	80	79.4

* Substrato consistía de una mezcla etanol-lactato

** VCO = Velocidad de carga orgánica

Las eficiencias de remoción de DQO total en este periodo fueron mayores a 90% en los cuatro reactores (Tabla 3.5) y la utilización de DQO por las BSR fue mayor a 10% en los cuatro reactores. Los resultados indican que el R4 hacia el final de la operación en continuo presentó la mayor utilización de DQO (13.2%) por las BSR, efecto que puede ser visualizado con mayor claridad en la Figura 3.4. También se observó una tendencia de mayor producción de sulfuro a medida que disminuyó el diámetro de gránulo (R4).

La velocidad de producción de sulfuro (Figura 3.4) fue muy similar en los cuatro reactores hasta el periodo II cuyos valores fueron entre 0.03 y 0.04 g H₂S/L-día. En el día 65 de operación, cuando se modificó la relación DQO/SO₄²⁻ al valor estequiométrico de 0.67, la mayor velocidad de producción de sulfuro la presentaron el R3 (0.07 g H₂S/L-día) y el R4 (0.06 g H₂S/L-día).

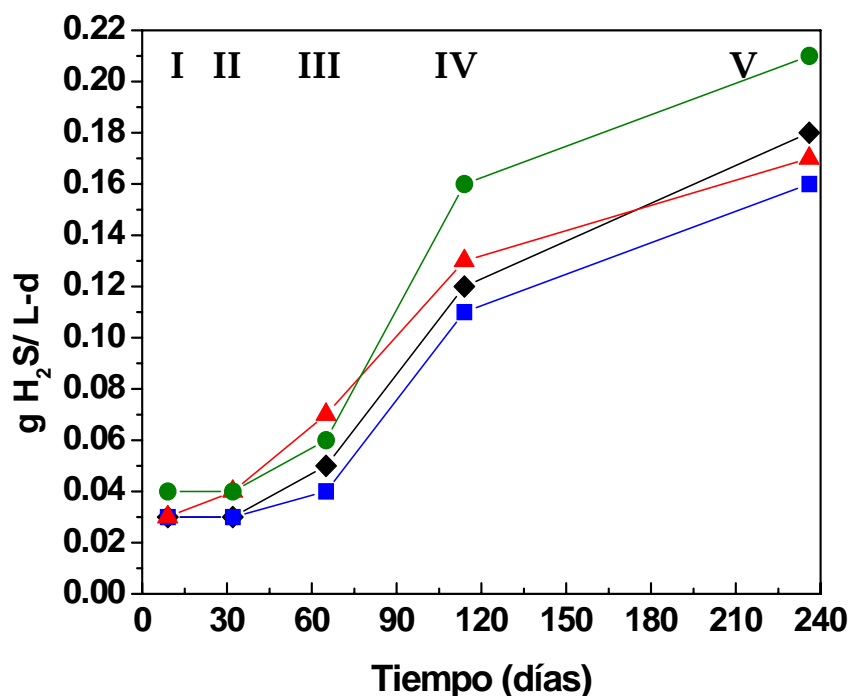


Figura 3.4 Velocidad de producción de sulfuro promedio en los diferentes días de operación en continuo de los reactores (R1-◆-, R2-■-, R3-▲-, R4-●-).

Cuando se disminuyó el TRH a 0.66 días en el periodo IV evidentemente el R4 fue mayormente favorecido, dado que presentó una gran diferencia en su velocidad de producción de sulfuro respecto de los R1, R2 y R3. La velocidad de producción de sulfuro para el R4 fue de 0.16 g H₂S/L-día y la menor velocidad de producción la presentó el R2 (0.11 g H₂S/L-día) que contenía la fracción de lodo de mayor diámetro. Fue en este periodo en donde comenzó a marcarse una tendencia de mayor velocidad de producción de sulfuro a medida que el diámetro de la fracción era menor (Figura 3.4).

Tabla 3.5 Condiciones de operación de los reactores, producción de sulfuro y eficiencias de remoción promedio en el periodo V.

Periodo (días)	V (115-236)			
	R1	R2	R3	R4
Condiciones de operación				
Etanol (g DQO/L)	2	2	2	2
*VCO (g DQO/L-día)	3.03	3.03	3.03	3.03
DQO/SO ₄ ²⁻	0.67	0.67	0.67	0.67
TRH (días)	0.66	0.66	0.66	0.66
Sulfuro (mg/L)	122.5	107.9	113.4	141.1
pH final	7.9	7.8	7.8	7.9
Eficiencias de remoción				
%DQO	91.9	91.6	90.7	92.2
%DQO-BSR	11.5	10.0	10.6	13.2
%DQO-MM	80.4	81.6	80.1	79.0

*VCO = Velocidad de carga orgánica

La producción de sulfuro en los cuatro reactores en los 122 días de operación correspondientes al periodo V aumentó considerablemente y los valores fueron de 122.5, 107.9, 113.4 y 141.1 mg H₂S/L en los reactores 1, 2, 3 y 4 respectivamente (Tabla 3.5). Se realizó un análisis de varianza simple para comparar el efecto del diámetro de gránulo en la velocidad de producción de sulfuro obtenida en el periodo V. El resultado de dicho análisis permitió corroborar que la diferencia de la velocidad de producción de sulfuro en el R4 estadísticamente es significativa con respecto a los demás reactores (ANEXO 1).

Haciendo un análisis global de los resultados, los cuatro reactores presentaron eficiencias de remoción de DQO mayores a 88% como se muestra en la Figura 3.3. La velocidad de conversión de DQO fue muy similar para los cuatro reactores a lo largo de los cinco periodos de operación. A partir del periodo III cuando la relación DQO/SO₄²⁻ se mantuvo en el valor estequiométrico de 0.67, la eficiencia de remoción de sulfato (Figura 3.5) en los reactores 3 y 4 (los de menor diámetro de gránulo) presentaron mayor remoción de sulfato en los periodos III y IV comparados con la remoción de sulfato obtenida con el lodo granular sin fraccionar (R1). Sin embargo el porcentaje de remoción de sulfato en el R2 siempre fue menor a lo largo del experimento comparado con el R1; por el contrario el R4 siempre presentó mayor remoción de sulfato que el R1 que fue considerado como el control.

Dado este comportamiento, si se quisiera arrancar un reactor UASB para remover el sulfato evaluando el tamaño de gránulo, el arranque sería viable a partir de un lodo granular de menor tamaño, debido a que presenta mayor eficiencia de remoción de sulfato. Por otro lado al aumentar la carga orgánica y la carga de sulfato en el periodo IV, se favoreció la utilización de DQO por las BSR, esta utilización de DQO se reflejó en la producción de sulfuro (Figura 3.4).

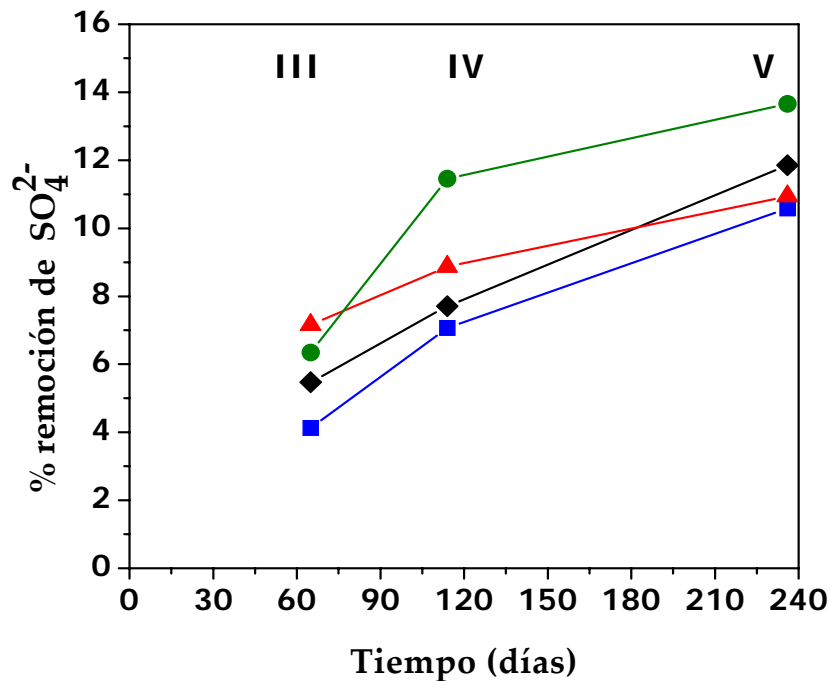


Figura 3.5 Eficiencia de remoción de sulfato en los diferentes periodos de operación de los reactores. R1 (♦), R2 (■), R3 (▲) y R4 (●).

La eficiencia de remoción de DQO se mejoró cuando se utilizó etanol como única fuente de carbono. En cambio la producción de sulfuro se incrementó en los reactores 1 y 4 mientras que los reactores 2 y 3 no presentaron un cambio notable. La DQO utilizada por las BSR presentó un incremento paulatino con respecto del tiempo sin llegar a competir considerablemente con los MM.

3.4 Caracterización del lodo granular antes de inocular los reactores y en el transcurso de los periodos de operación

En esta sección se muestran los resultados de diversos análisis realizados en las fracciones de lodo antes de inocular los reactores, así como los resultados de los análisis realizados al lodo de los reactores durante los diferentes periodos de

operación con la finalidad de identificar los cambios que ocurrieron después de operarlos en continuo durante 236 días.

La caracterización de los gránulos consistió en la determinación de las actividades tanto metanogénica como sulfatorreductora, determinación de SSV, cenizas (sólidos fijos, SF), cuantificación de BSR por el NMP y determinación del diámetro promedio mediante el análisis de imagen.

3.4.1 Sólidos suspendidos volátiles, cenizas y diámetro promedio

En la Tabla 3.6, se presentan los datos del contenido de SSV, diámetro promedio y contenido de cenizas de las diferentes fracciones de lodo. En esta tabla se puede observar que el contenido de SSV en promedio fue de 13%.

Tabla 3.6 Comparación del contenido de SSV, cenizas (SF) y diámetro promedio antes de inocular y al término de la operación en continuo.

Fracción	Antes de inocular			Reactor	Término de operación en continuo		
	%SSV	%SF	Diámetro (mm)		%SSV	%SF	Diámetro (mm)
LG	13.18	3.05	2.70	R1	9.53	1.50	2.44
	(± 0.29)	(± 0.05)	(± 0.96)		(± 0.10)	(± 0.01)	(± 0.95)
A	13.52	2.90	3.04	R2	8.27	1.55	2.72
	(± 0.22)	(± 0.00)	(± 0.93)		(± 0.20)	(± 0.03)	(± 0.79)
B	13.40	2.85	2.46	R3	8.96	1.53	2.26
	(± 0.66)	(± 0.15)	(± 0.73)		(± 0.15)	(± 0.01)	(± 0.74)
C	13.09	3.90	1.69	R4	9.13	1.75	1.69
	(± 0.71)	(± 0.20)	(± 0.68)		(± 0.51)	(± 0.09)	(± 0.61)

Sin embargo, al final del tiempo de operación de los reactores el contenido de SSV disminuyó considerablemente en las fracciones correspondientes incluyendo al lodo granular sin fraccionar, esta disminución en el contenido de

SSV estuvo asociada a la disminución del diámetro de gránulo para los reactores 1, 2 y 3 mientras que el lodo del R4 sólo presentó disminución de SSV pero no de diámetro de gránulo. La disminución de SSV fue de 13.3 a 9% en promedio y el contenido de cenizas también disminuyó al término de la operación de los reactores en más de 40% con respecto a los inóculos. El lodo del R4 presentó la mayor disminución de cenizas pero la menor disminución del porcentaje de SSV como se observa en la Figura 3.6. Además también se aprecia que al final de la operación en continuo (236 días), el contenido de SSV disminuyó a medida que el tamaño del gránulo aumenta; en cambio en las fracciones de lodo antes de inocular no hubo diferencia en el contenido de SSV.

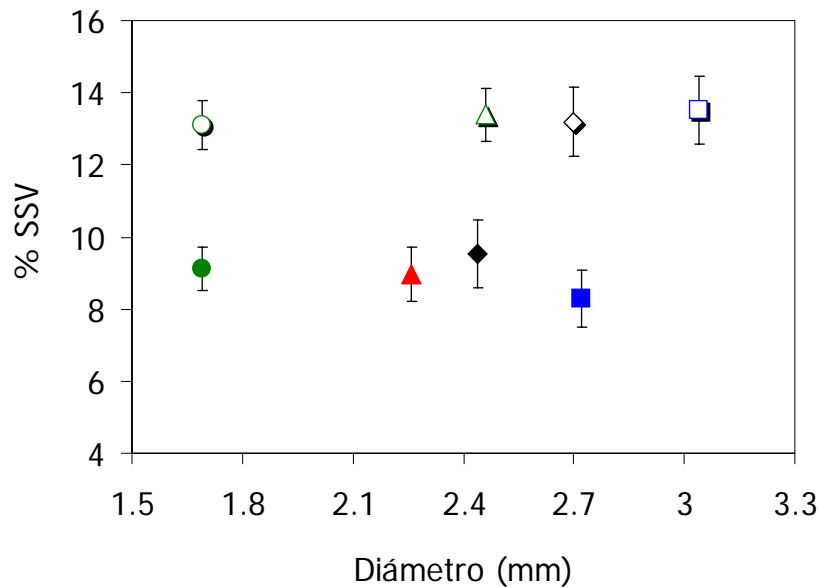


Figura 3.6 Porcentaje de SSV con respecto al diámetro de gránulo en cada una de las fracciones de lodo antes de inocular (○△□◇) los reactores y a los 236 días de operación en continuo (●▲◆). Donde ■, □ (Fracción A-R2); ▲, △ (Fracción B-R3); ●, ○ (Fracción C-R4) y ◇, ◆ LG-R1.

3.4.2 Cuantificación del número más probable de bacterias sulfatorreductoras

Las fracciones de lodo granular usadas como inóculo y el lodo de los reactores UASB operados en continuo, se incubaron 30 días en medio Postgate B después de hacer diluciones en serie (10^{-1} a 10^{-20}). Con lactato como fuente de carbono, en 5 días se observó el precipitado negro de sulfuro de hierro (FeS) en las primeras cuatro series de diluciones (10^{-1} a 10^{-4}) de todos los inóculos de las fracciones de lodo granular, mientras que en el inóculo de los reactores 1,2 y 3, el precipitado negro se observó en las dos primeras series de diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) en menos de 24 h de incubación. En el lodo del R4 el precipitado se observó hasta el tercer día de incubación de los tubos. En la Figura 3.7 se muestra la serie de diluciones con lactato de la fracción B antes de inocular y al término de operación de los reactores.

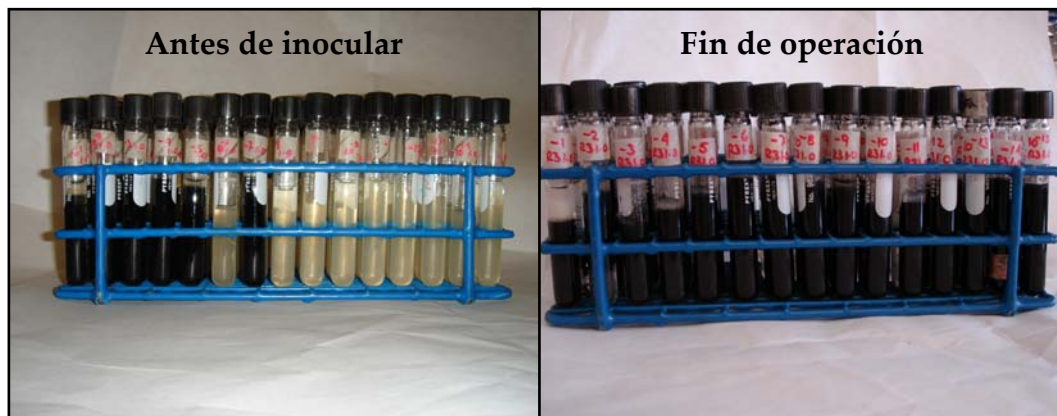


Figura 3.7 Comparación de las series de diluciones en la cuantificación de las BSR mediante el NMP de la fracción B antes de inocular y al término de operación de los reactores. En esta figura se observa la precipitación de FeS con lactato como fuente de carbono. Las diluciones van de 10^{-1} a 10^{-15} de izquierda a derecha.

El número más probable también se determinó con acetato para tener una idea sobre que grupo de BSR estaba presente en el lodo y de esta manera saber si se tenían más BSR que oxidan completa o incompletamente el sustrato. Cuando se

utilizó acetato como fuente de carbono, la aparición del precipitado negro requirió de mayor tiempo tanto en las fracciones antes de inocular (8 días) como en el lodo de los reactores (5 días). En presencia del inhibidor de las BSR (molibdato de sodio), tanto los tubos con las fracciones antes de inocular, como los tubos con el lodo de los reactores al cabo de 35 días de incubación con acetato o lactato, no presentaron precipitación de FeS.

Al realizar la determinación del (NMP-BSR)/g SSV a partir de las series de diluciones que presentaron precipitación (Ec. 2.2), se observó que la cantidad de BSR fue directamente proporcional al tamaño de gránulo como se aprecia en la Tabla 3.7. La fracción A presentó la mayor cantidad de BSR con acetato y lactato; caso contrario se presentó para la fracción C con los dos substratos. El NMP-BSR/g SSV para las muestras de lodo de los reactores en continuo indiscutiblemente fue muy superior a las fracciones de lodo y LG antes de inocular (Tabla 3.7). Sin embargo, el aumento en el NMP de BSR no se presentó de manera directa con el diámetro de gránulo, dado que con lactato la fracción B presentó la mayor cantidad de BSR, mientras que con acetato se conservó la relación directa del mayor contenido de NMP-BSR/g SSV con el mayor tamaño de gránulo.

La menor cantidad de BSR cuantificadas con acetato comparada con las cuantificadas con lactato, nos indicó que predominaron las BSR que oxidan incompletamente la materia orgánica.

Tabla 3.7 NMP de BSR determinado en las fracciones de lodo antes de inocular y después de operar los reactores con lactato o acetato como sustratos.

Fracción	(NMP-BSR)/g SSV				
	Antes de inocular		Reactor	Después de 236 días	
	Lactato	Acetato		Lactato	Acetato
LG	7.1×10^6	7.1×10^2	R1	7.6×10^{13}	9.8×10^5
A	6.9×10^6	1.7×10^2	R2	18×10^{13}	29×10^5
B	2.8×10^6	1.7×10^2	R3	320×10^{13}	1.0×10^5
C	1.6×10^5	7.0×10^1	R4	3.2×10^6	4.7×10^2

3.5 Caracterización de las fracciones de lodo mediante pruebas de actividad

El lodo sin fraccionar y cada una de las fracciones de lodo fueron caracterizados mediante las pruebas de actividad específica tanto metanogénica como sulfatorreductora.

3.5.1 Actividad sulfatorreductora

En esta determinación se evaluaron diferentes sustratos: lactato, propionato, etanol, acetato, acetato con inhibidor (BESA) de los MM, y una mezcla de etanol-lactato, dada la capacidad metabólica de las BSR de utilizar diferentes fuentes de carbono como donadores de electrones.

En la Tabla 3.8, se muestran los valores de las respectivas actividades específicas antes de inocular y durante los periodos de operación de los reactores con cada uno de los sustratos evaluados. Se observó que las fracciones B, C y el LG sin fraccionar antes de inocular los reactores presentaron mayor actividad sulfatorreductora que el lodo de los reactores con etanol como fuente de carbono.

El etanol fue el sustrato con el que se obtuvo mayor actividad sulfatorreductora antes de inocular los reactores. El segundo sustrato fue el lactato, seguido de la mezcla etanol-lactato y propionato (Figura 3.8).

Para determinar si había competencia entre las BSR y los MM por el acetato, la ASRE se determinó usando este sustrato con y sin inhibidor de los MM, encontrándose que la ASRE prácticamente fue nula para todas las fracciones con y sin inhibidor (datos no mostrados), por lo que las BSR no presentaron una competencia por acetato para los metanógenos.

La actividad sulfatorreductora con etanol presentó una relación inversa con respecto al diámetro de gránulo (Figura 3.8); es decir, la actividad sulfatorreductora fue mayor a medida que disminuyó el diámetro de gránulo.

Con los otros sustratos (mezcla etanol-lactato, lactato y propionato) no se observó una tendencia clara, dado que las actividades fueron muy similares en todas las fracciones y el LG. Con la mezcla etanol-lactato se observó la menor variación de ASRE entre las fracciones, fue por esta razón que al iniciar la operación de los reactores se utilizó esta mezcla, ya que con etanol-lactato, en principio todos los reactores tendrían la misma ASRE

Con respecto a la cuantificación de la ASRE con la mezcla etanol-lactato en los diferentes periodos de operación de los reactores, se observó que en los periodos II y III la ASRE no presentó un cambio entre un periodo y otro. Sin embargo, el aumento de la ASRE en el periodo IV fue muy notorio e incluso la actividad fue mayor que la actividad de las fracciones antes de inocular. En el periodo V con etanol se observó que el R4 presentó la mayor actividad con respecto a la actividad obtenida en los otros reactores, observándose que la ASRE fue mayor a menor diámetro de gránulo por lo que este comportamiento fue semejante al observado en las actividades de las fracciones antes de inocular los reactores (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Comparación de la ASRE en las fracciones de lodo granular antes de inocular los reactores UASB y durante la operación de los reactores en continuo en los periodos señalados. Donde: Ac: Acetato; E-L: Mezcla etanol-lactato, E: Etanol, L: Lactato y P: Propionato.

Fracción	ASRE antes de inocular			Reactor	ASRE en los reactores operados en continuo						
	g DQO-H ₂ S/g SSV-día				g DQO-H ₂ S/g SSV-día						
E	E:L	L	P	Ac	*E:L	E					
				V	II	III	IV	V	V		
LG	0.5 (±0.04)	0.15 (±0.02)	0.10 (±0.05)	0.09 (±0.02)	R1	0.02 (±0.00)	0.08 (±0.00)	0.10 (±0.00)	0.29 (±0.00)	0.20 (±0.02)	0.26 (±0.02)
A	0.24 (±0.02)	0.14 (±0.01)	0.21 (±0.03)	0.14 (±0.01)	R2	0.02 (±0.00)	0.13 (±0.01)	0.14 (±0.01)	0.36 (±0.02)	0.27 (±0.02)	0.21 (±0.03)
B	0.36 (±0.06)	0.16 (±0.03)	0.24 (±0.05)	0.12 (±0.01)	R3	0.01 (±0.00)	0.12 (±0.01)	0.11 (±0.00)	0.27 (±0.02)	0.25 (±0.01)	0.20 (±0.05)
C	0.58 (±0.10)	0.17 (±0.03)	0.21 (±0.02)	0.18 (±0.02)	R4	0.04 (±0.00)	0.15 (±0.02)	0.14 (±0.02)	0.36 (±0.03)	0.27 (±0.02)	0.32 (±0.03)

* ASRE determinada con la mezcla E:L en los diferentes periodos (II, III, IV y V) de operación en continuo de los reactores

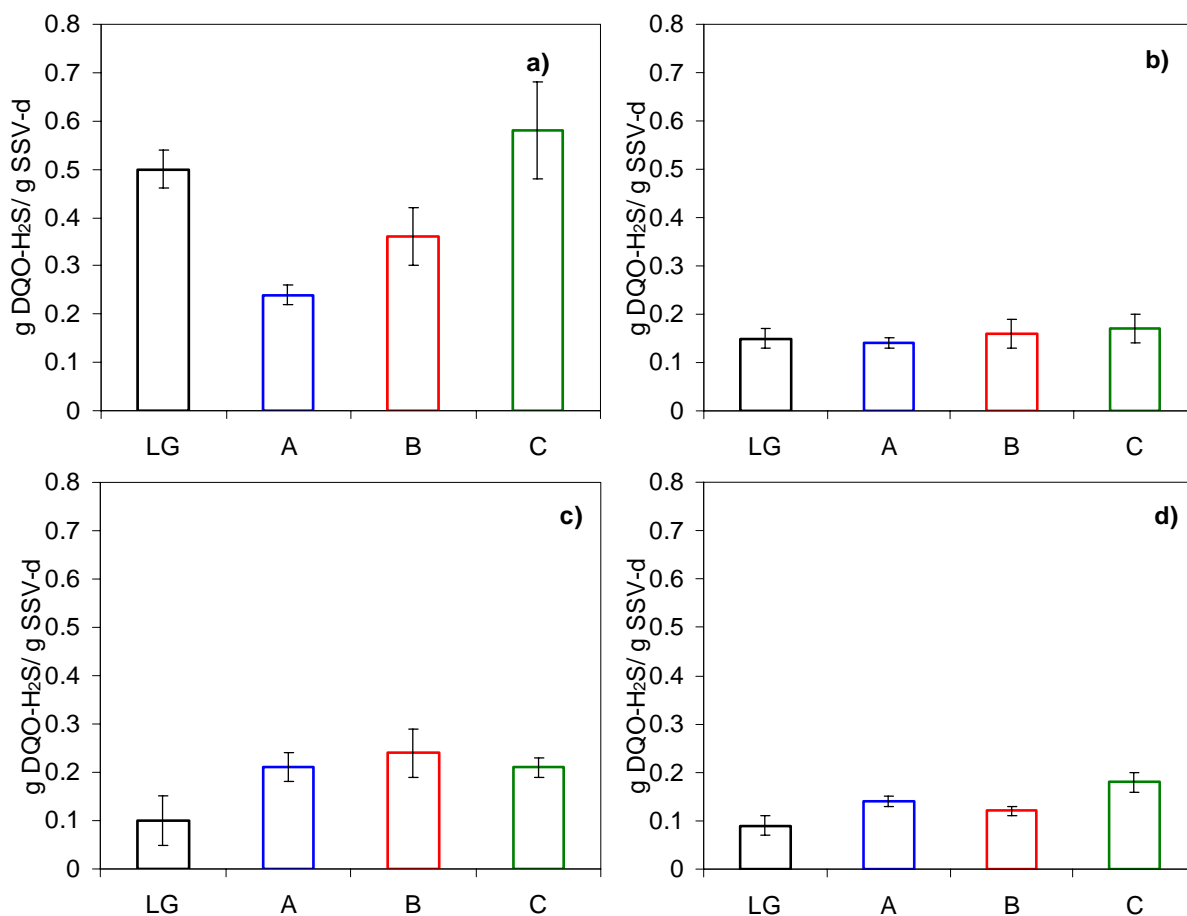


Figura 3.8 Comparación de ASRE antes de inocular los reactores en cada una de las fracciones de lodo granular y LG sin fraccionar con diferente fuente de carbono. a) Etanol, b) Mezcla etanol-lactato, c) Lactato y d) Propionato.

Sin embargo, al final de la operación de los reactores las ASRE realizadas con la mezcla etanol-lactato fueron muy semejantes entre las diferentes fracciones y aumentaron ligeramente con respecto a las que se obtuvieron en las fracciones antes de inocular (Figura 3.9). En cambio, las actividades determinadas con etanol en el periodo V disminuyeron alrededor de 45% con respecto a las actividades determinadas antes de inocular los reactores. Sin embargo, esta disminución de actividad no se reflejó en la producción de sulfuro. La biomasa del R2 fue la que presentó el menor decremento de actividad ya que disminuyó de 0.24 a 0.21 g DQO-H₂S/g SSV-día (Figura 3.9).

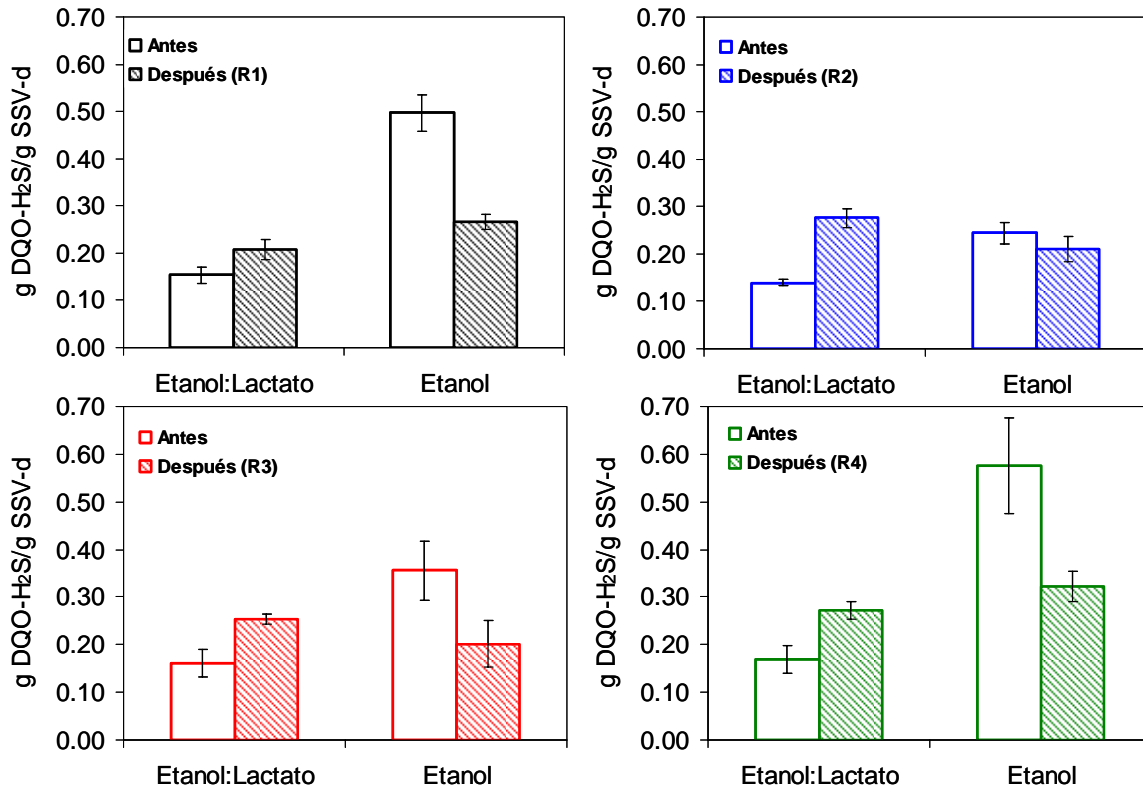


Figura 3.9 Comparación de la ASRE de las diferentes fracciones con mezcla etanol-lactato y etanol antes de inocular los reactores y después de 196 días de operación en continuo. a) Lodo granular, R1; b) Fracción A, R2; c) Fracción B, R3 y d) Fracción C, R4.

3.5.2 Actividad metanogénica

La actividad metanogénica específica se evaluó con acetato (actividad acetoclástica) y con una mezcla de sustratos (etanol-lactato). La AME con la mezcla etanol-lactato presentó la mayor recuperación de metano en todas las fracciones y por lo tanto la mayor actividad metanogénica específica se obtuvo con dicha mezcla, la cual fue aproximadamente el doble de la actividad obtenida con acetato como sustrato (Tabla 3.9). Para evaluar la competencia de las BSR con los MM por el acetato, se realizó la AME con acetato en presencia del inhibidor de las BSR (Molibdato de sodio). Los resultados obtenidos mostraron menor actividad en

las tres fracciones de lodo e incluso en el lodo granular sin fraccionar con respecto a la AME cuantificada únicamente con acetato, lo cual mostró que el molibdato no solo tuvo un efecto inhibitorio sobre las BSR sino que también ocasionó un efecto adverso en los MM, lo que posiblemente pudo ser ocasionado por la generación de compuestos intermediarios al adicionar el molibdato de sodio.

Un aspecto relevante por destacar es la relación que se presentó entre el incremento de la AME con acetato y la mezcla etanol-lactato evaluados y el aumento del diámetro del gránulo. El lodo granular sin fraccionar presentó la mayor actividad con los tres sustratos como se muestra en la Tabla 3.9, mientras que en su forma fraccionada, la mayor actividad la presentó la fracción A cuyo valor más alto fue de 0.62 g DQO-CH₄/g SSV-día con la mezcla etanol-lactato como sustrato. Al cuantificar la AME, con acetato, mezcla etanol-lactato y etanol, en el curso de operación de los cuatro reactores se observó que en el periodo V la AME con acetato disminuyó hasta 94% (R3) con respecto a los valores iniciales, estas actividades prácticamente fueron nulas, pues fueron menores a 0.1 g DQO-CH₄/g SSV-día.

Al comparar la AME con la mezcla etanol-lactato en los diferentes periodos de operación de los reactores, se observó una tendencia de aumento de actividad hasta el periodo cuatro. Este aumento de actividad a lo largo del tiempo no fue mayor a las actividades observadas obtenidas en la etapa inicial. En el periodo V cuando la fuente de carbono en los reactores consistía únicamente de etanol, la AME evaluada con la mezcla etanol-lactato fue prácticamente nula (Tabla 3.9), y las actividades en estos periodos no presentaron una relación con el diámetro de gránulo.

Tabla 3.9 Comparación de la AME en las fracciones de lodo granular antes de inocular los reactores UASB y durante la operación de los reactores en continuo en los periodos señalados. Donde (Ac: Acetato, A+Mo: Acetato con molibdato de sodio, E-L: Mezcla etanol-lactato y E: Etanol).

Fracción	Antes de inocular g DQO-CH ₄ /g SSV-día			En los reactores operados en continuo g DQO-CH ₄ /SSV-día						
	Ac	Ac+ Mo	E:L	Reactor	V	II	III	IV	V	E
LG	0.39	0.29	0.72	R1	0.03	0.22	0.38	0.55	0.06	0.20
	(±0.04)	(±0.003)	(±0.02)		(±0.02)	(±0.02)	(±0.02)	(±0.13)	(±0.01)	(±0.21)
A	0.33	0.36	0.62	R2	0.03	0.22	0.27	0.68	0.05	0.15
	(±0.01)	(±0.06)	(±0.14)		(±0.03)	(±0.03)	(±0.08)	(±0.14)	(±0.00)	(±0.02)
B	0.32	0.28	0.61	R3	0.02	0.27	0.29	0.47	0.06	0.10
	(±0.02)	(±0.06)	(±0.06)		(±0.02)	(±0.02)	(±0.04)	(±0.18)	(±0.02)	(±0.09)
C	0.26	0.22	0.53	R4	0.07	0.22	0.45	0.34	0.02	0.14
	(±0.04)	(±0.04)	(±0.03)		(±0.02)	(±0.05)	(±0.04)	(±0.11)	(±0.02)	(±0.11)

Sin embargo, al evaluar la AME solamente con etanol en el mismo periodo se observó un incremento. Con este sustrato tampoco se observó una relación entre la AME y el diámetro de gránulo. Finalmente, al término de la operación en continuo de los reactores se observó una tendencia de disminución de la AME tanto con etanol-lactato como con acetato (Figura 3.10). Esta tendencia se relaciona con la disminución de utilización de DQO por los MM en los reactores, efecto esperado al operar los reactores bajo condiciones de sulfatorreducción.

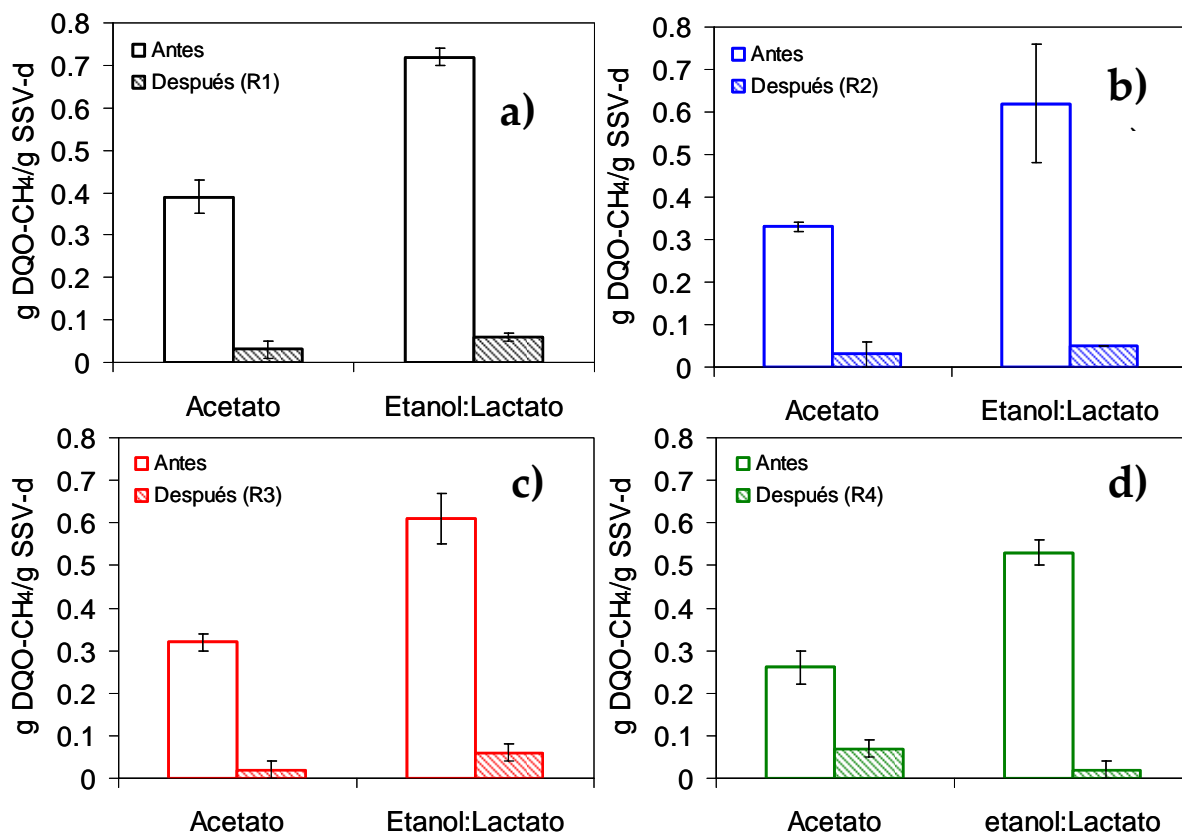


Figura 3.10 Comparación de la AME de las fracciones con acetato y mezcla etanol-lactato antes de inocular y después de 196 días de operación en continuo de los reactores 1-4. a) Lodo granular, b) Fracción A, c) Fracción B y d) Fracción C.

3.6 Diámetro promedio de los gránulos

Para la determinación del diámetro promedio del lodo granular antes de inocular y al final de la operación de los reactores, se analizaron las imágenes en el software *ImageTool* de un promedio de 600 gránulos por muestra. En la Figura 3.11 se muestran los perfiles de distribución de diámetro de los gránulos en cada una de las fracciones de lodo inoculado y el análisis estadístico obtenido después de generar los histogramas se muestra en la Tabla 3.10.

El diámetro promedio del lodo granular sin fraccionar fue de 2.7 mm, en tanto que el diámetro promedio fue de 3.04, 2.46 y 1.69 mm para las fracciones A, B y C, respectivamente. Las fracciones de lodo de los reactores, con excepción del lodo del reactor cuatro, presentaron una ligera disminución del diámetro promedio de gránulo al término de los 236 días de operación en continuo. La distribución del diámetro de partícula en la fracción A después de operar el reactor R2 fue la que más cambió, pues ya no se observaron gránulos con diámetro de partícula mayores a 4.0 mm. La distribución del diámetro de los gránulos para el LG y la fracción B no presentó un cambio significativo. Los diámetros promedio obtenidos fueron 2.44, 2.72, 2.26 y 1.69 mm para el lodo granular y las fracciones A, B y C, respectivamente. Dicha disminución se observa mejor en la Figura 3.11 en la cual se aprecia el perfil de distribución del total de gránulos cuantificados en cada una de las fracciones.

Durante la manipulación de los gránulos, se observó que éstos eran de color negro homogéneo en todas las fracciones de lodo. Sin embargo, fue evidente una diferencia en la resistencia de los gránulos a la manipulación al momento de inmovilizarlos en la grenetina semi-sólida. La resistencia a la manipulación fue mayor en el lodo antes de inocular los reactores, pues al momento de colocar los gránulos en la grenetina éstos se asentaban en el fondo y no se disgregaban. En

cambio los gránulos de los reactores operados bajo condiciones sulfatorreductoras presentaron menor resistencia, es decir fueron más susceptibles a disgregarse. La fracción (A) de mayor diámetro, presentó la menor resistencia dado que durante su manipulación se disgregaba fácilmente y permanecía en la superficie de la grenetina; mientras que el lodo con diámetro menor se asentaba rápidamente en el fondo de la grenetina y no se disgregaba.

Tabla 3.10 Comparación de la distribución del diámetro de los gránulos contenidos en las fracciones de lodo granular bajo diferentes condiciones de operación. \emptyset = Diámetro

Fracción	Antes de inocular			Reactor	A los 236 días de operación en continuo		
	\emptyset_{Medio} (mm)	$\emptyset_{Máximo}$ (mm)	$\emptyset_{Mínimo}$ (mm)		\emptyset_{Medio} (mm)	$\emptyset_{Máximo}$ (mm)	$\emptyset_{Mínimo}$ (mm)
LG	2.70 (± 0.96)	5.19	0.83	R1	2.44 (± 0.95)	5.17	0.60
A	3.04 (± 0.93)	5	0.85	R2	2.72 (± 0.79)	3.96	0.54
B	2.46 (± 0.73)	4.77	0.85	R3	2.26 (± 0.74)	4.39	0.53
C	1.69 (± 0.68)	3.37	0.17	R4	1.69 (± 0.61)	3.02	0.37

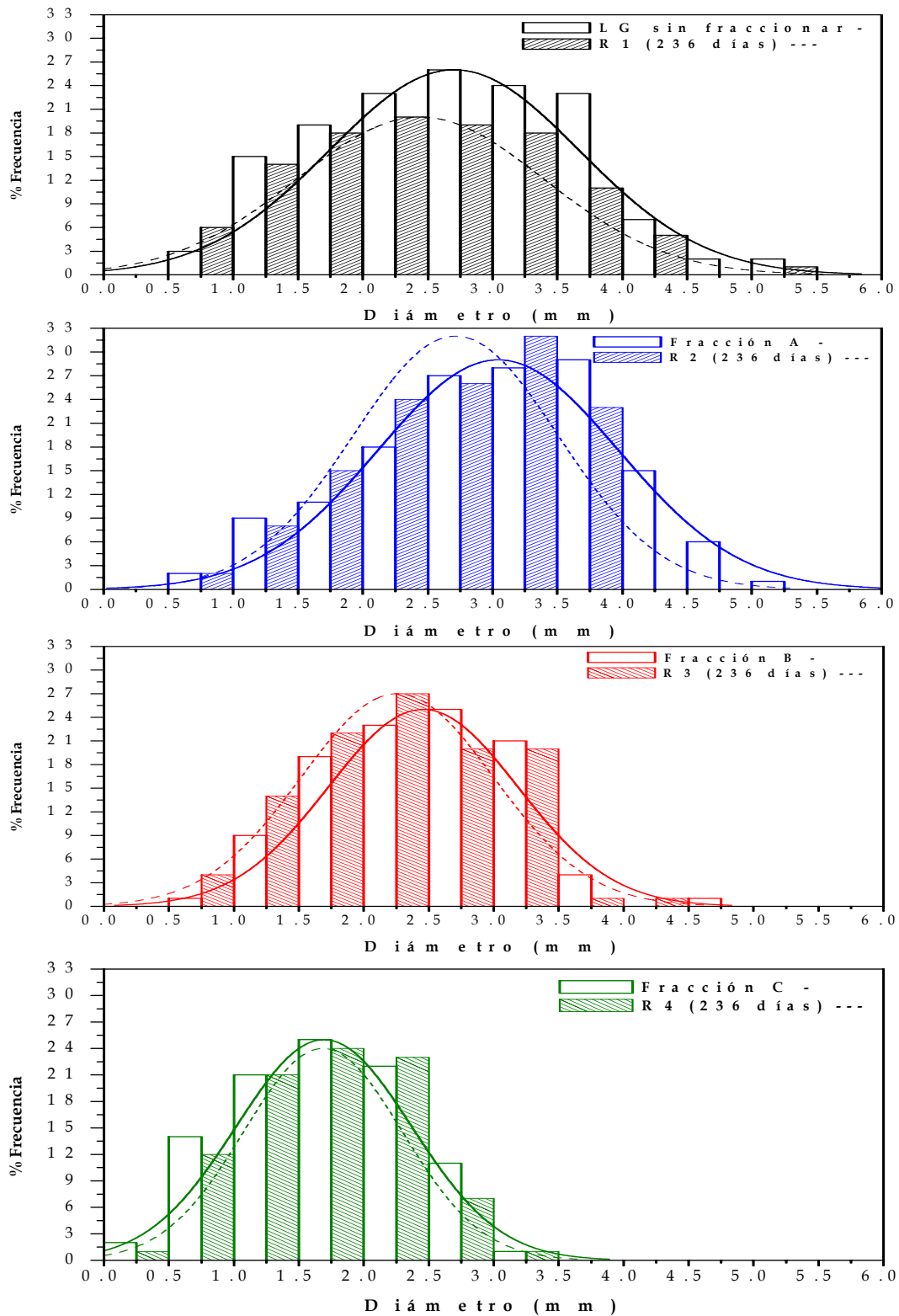


Figura 3.11 Distribución del diámetro de los gránulos en las diferentes fracciones y al término de la operación en continuo de los reactores UASB.

4. Discusión

Las bases sobre las que en un inicio se planteó que el diámetro de gránulo tendría un efecto sobre el enriquecimiento preferencial de las BSR, están relacionadas con aspectos microbiológicos, nutricionales y cinéticos.

Desde el aspecto cinético las BSR tienen una velocidad de crecimiento mayor que los MM. Nutricionalmente las BSR pueden usar mayor variedad de sustratos (etanol, lactato) que los metanógenos (acetato, H_2 y CO_2). Microbiológicamente las BSR pueden encontrarse en los lodos metanogénicos.

A continuación se discuten los resultados más relevantes relacionados con estos aspectos.

4.1 Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos (K_s y q_{max}) de las fracciones de lodo y del lodo granular antes de inocular los reactores, se calcularon a partir de la producción de sulfuro y de metano bajo condiciones de sulfatorreducción. Con la finalidad de establecer con que sustrato se favorecía el proceso sulfatorreductor o metanogénico. También para identificar si dentro de los reactores podría haber competencia entre ambos procesos.

Al ajustar las curvas tipo Monod mediante el modelo de Hanes para obtener los valores de las constantes de afinidad por el sustrato (K_s) con etanol o lactato, se observó mayor afinidad por el lactato (Tablas 3.2 y 3.3).

Cuando se comparan los resultados obtenidos de utilización de sustrato (q_{max}) con etanol se observó una mayor q_{max} en el proceso metanogénico (Tabla 3.3) que en el proceso sulfatorreductor (Tabla 3.2), lo cual pudo representar una desventaja para que el proceso de sulfatorreducción predominara en los reactores.

Si además de esta desventaja cinética y dado que el lodo se obtuvo de un reactor metanogénico, se podría explicar porque no se observó un incremento del proceso sulfatorreductor en poco tiempo (p.ej. menos de 100 días).

Los valores de K_s obtenidos con etanol a partir de la producción de sulfuro fueron de 0.66, 0.90, 0.81 y 1.45 g DQO/L para el lodo granular y las fracciones A, B y C, respectivamente. Estos valores de K_s tienen una equivalencia en concentración de etanol de 316, 431, 368 y 695 mg/L y difieren de los valores de K_s reportados en la literatura. O'Flaherty *et al.* (1998) reportaron un valor de K_s de 30 mg/L de etanol para un lodo granular adaptado a etanol y sulfato, Nagpal *et al.* (2000) reportan un valor de 200 mg/L de etanol para un cultivo enriquecido de bacterias sulfatorreductoras, mientras que González (2007) al evaluar un lodo sulfatorreductor reporta un valor de 86 mg/L de etanol. Esta variación en los valores reportados se debe en gran medida a las condiciones bajo las cuales se determinaron las constantes y al tipo de inóculo. El lodo evaluado en este trabajo fue un lodo que operaba en condiciones metanogénicas y no se aclimató a etanol y sulfato en comparación con los experimentos antes mencionados, los cuales de alguna manera ya tenían una biomasa adaptada a los substratos o bien era biomasa sulfatorreductora.

Respecto a los parámetros cinéticos con los diferentes diámetros de gránulo, se observó que la máxima velocidad de utilización de etanol en el proceso de sulfatorreducción disminuyó a medida que aumentó el diámetro de gránulo (Tabla 3.2). Por otro lado no se encontró una relación significativa entre la K_s y el diámetro del gránulo lo cual coincide con lo reportado por Alphenaar (1994); a diferencia de lo reportado por Gonzalez-Gil *et al.* (2001) quienes observaron que al aumentar el diámetro de gránulo, la velocidad de consumo de substrato disminuye y se refleja en el aumento del valor de K_s . Con lactato como substrato no se encontró una relación clara entre el diámetro de gránulo y los parámetros cinéticos, pero cuando

se comparan las K_s de lactato con las de etanol se observa que fueron menores. Por lo tanto los microorganismos presentes en el lodo presentaron mayor afinidad por lactato. Con lo cual se puede concluir que las condiciones bajo las cuales se determinan los parámetros cinéticos como son temperatura, pH y tipo de sustrato son muy importantes, por lo que los valores de K_s y q_{max} son específicos para cada tipo de inóculo.

4.2 Número más probable de bacterias sulfatorreductoras

La cuantificación de las BSR con diferentes sustratos tuvo la finalidad de proporcionar un estimado de la cantidad de las BSR presentes en el lodo utilizado como inóculo. Por otra parte el haber utilizado lactato o acetato como sustrato fue para estimar la proporción de los diferentes grupos metabólicos de BSR, dado que el grupo de BSR que oxidan completamente el sustrato tiene la capacidad de utilizar acetato como fuente de carbono. Los resultados mostrados en la Tabla 3.7 indican que la cantidad inicial de BSR acetotróficas es comparable con las reportadas por Omil *et al.* (1998) quienes reportan que partiendo de un lodo granular metanogénico con una cantidad del orden de 10^3 BSR acetoclásticas y 10^9 de MM acetoclásticos, se requieren aproximadamente 1000 días para establecer un equilibrio entre las poblaciones de BSR y MM. Este orden de magnitud inicial de 10^3 es mayor al obtenido en este trabajo el cual fue de 10^2 para el LG y las fracciones A y B, mientras que el orden de magnitud de la fracción C fue aun menor (10^1) con acetato como sustrato. Por otro lado, con lactato se cuantificó mayor cantidad de BSR dado que este sustrato en principio, puede ser degradado por los dos grupos metabólicos de BSR (que oxidan completa e incompletamente la materia orgánica).

Lens *et al.* (2007) propusieron que se puede disminuir el tiempo requerido para establecer el equilibrio entre las diferentes poblaciones de BSR y MM a través de la manipulación de la cantidad de BSR y MM en el inóculo mediante la inhibición de los MM o bioaumentación con cultivos puros. Sin embargo en este trabajo se demostró que el hecho de tener un mayor número de BSR en el gránulo, no necesariamente implica que el desempeño del reactor será eficiente en términos de sulfatorreducción. Lo anterior, también fue demostrado por Omil *et al.*, (1997a) al operar un reactor UASB bioaumentado con BSR acetotróficas ya que concluyó que la adición de una cepa pura de *Desulforhabdus amnigenus* no fue exitosa aún cuando el reactor se operó en lote por 14 días.

Al final de la operación en continuo de los reactores, el aumento de las BSR fue considerable (Tabla 3.7), ya que en los reactores con el LG y las fracciones A y B la cantidad de BSR aumentó a 10^{12} y 10^5 NMP-BSR/g SSV con lactato y acetato, respectivamente. En el reactor 4 la fracción C presentó un incremento menor con ambos substratos (Tabla 3.7), pues solo aumentó de 10^5 a 10^6 NMP-BSR/ g SSV con lactato y de 10^1 a 10^2 con acetato. Este pequeño incremento de la cantidad de BSR en el R4 no se reflejó en su desempeño, dado que presentó la mejor eficiencia de remoción de DQO por las BSR (13%) y mayor concentración de sulfuro (141 mg H_2S/L).

Respecto a la cuantificación de BSR en sistemas sulfatorreductores los valores reportados son muy diversos debido a las diferentes condiciones de operación bajo las cuales fueron determinados, estos valores van de 4.1×10^4 hasta 1.5×10^{10} NMP-BSR/g SSV (Oude-Elferink *et al.*, 1994; Goncalves *et al.*, 2005).

Con base en los datos reportados en la literatura y los valores obtenidos en el presente trabajo, la posibilidad de obtener un lodo sulfatorreductor a partir de un lodo granular metanogénico requiere de un prolongado tiempo para favorecer a las BSR y no necesariamente depende de la relación estequiométrica DQO/SO_4^{2-} ,

ni de la cantidad de BSR presentes como sucedió en este trabajo, en el cual se requirieron de 204 días para incrementar del 5% (periodos II y III) de DQO removida por las BSR (R4) hasta 13% (periodo V), sino también depende de la estrategia y condiciones con las que se inicie el proceso.

4.3 Pruebas de actividad específica

Los resultados obtenidos durante la determinación de la actividad específica de las diferentes fracciones de lodo antes de inocular los reactores se encuentran entre los valores reportados en la literatura. Para la AME dichos valores están entre 0.30 g DQO-CH₄/g SSV-día (Fang y Chui, 1993) y mayores a 2 g DQO-CH₄/g SSV-día (Hulshoff Pol *et al.*, 2004), los valores de AME obtenidos en el presente trabajo fueron de 0.26 a 0.72 g DQO-CH₄/g SSV-día con los diferentes substratos utilizados antes de inocular los reactores. Se observó una relación importante entre la AME y el diámetro del gránulo; la AME fue mayor a medida que aumentó el diámetro del gránulo, este comportamiento se presentó con y sin inhibidor de las BSR. La relación fue más evidente cuando se adicionó el inhibidor de las BSR como se mostró en la Tabla 3.9, la AME con acetato fue de 0.33 g DQO-CH₄/g SSV-día para la fracción A (2.7 mm) y para la fracción C de menor diámetro (1.69 mm) de 0.26 gDQO-CH₄/g SSV-día. Esta tendencia es comparable con lo reportado por Bhunia y Ghangrekar (2007) quienes al evaluar la AME de un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños (0.27 a 3.03 mm) encontraron que la AME se incrementó con el tamaño de las biopartículas en el intervalo mencionado, desde 0.11 hasta 0.51 g DQO-CH₄/g SSV-día.

Para descartar la competencia por el substrato entre las BSR y los MM se realizaron pruebas de actividad específica con acetato con y sin sulfato, adicionando el inhibidor correspondiente para cada género. Para el caso de las BSR

se adicionó 30 mM de molibdato de sodio y para inhibir a los MM, 30 mM de BESA. Respecto al molibdato de sodio, es un inhibidor que entra a la célula mediante el sistema de transporte del sulfato e interfiere con la formación de adenosina fosfosulfato, lo que origina la pérdida de compuestos reducidos de azufre necesarios para el crecimiento, debido a la formación de fosfoadenosinmolibdato (Barton, 1992). Al adicionar los inhibidores se esperaba que las correspondientes actividades aumentaran; sin embargo, sucedió lo contrario dado que tanto la actividad metanogénica como la sulfatorreductora disminuyeron considerablemente. Smith y Klug (1981) encontraron que el molibdato provocó un efecto desfavorable tanto a las BSR como a los MM, aún cuando la concentración de inhibidor utilizada se encontraba en el rango reportado (0.2 a 200mM). Se ha reportado que se producen compuestos complejos como son el $\text{MoO}_2\text{S}_2^{2-}$ y MoS_4^{2-} los cuales son tóxicos para los MM (Patidar y Tare, 2005), que de haberse generado durante el desarrollo de la AME nos explica por qué se obtuvo una menor actividad. Un comportamiento similar a nuestro caso fue el que obtuvieron O'Reilly y Colleran (2006), quienes encontraron una disminución de la AME al adicionar 2 mM de molibdato cuando evaluaron la AME con diferentes relaciones de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ y diferente sustrato. Con acetato y molibdato la AME disminuyó en 10% respecto de la AME sin inhibidor, en este trabajo la disminución de la AME con acetato y molibdato fue entre el 15 y 25% en las diferentes fracciones.

Al determinar la actividad sulfatorreductora de las fracciones de lodo antes de inocular, se observó que con etanol las actividades fueron mayores para todas las fracciones y se presentó un comportamiento inverso al de la AME. La fracción de menor tamaño tuvo la mayor actividad sulfatorreductora y ésta disminuyó conforme el diámetro de gránulo fue mayor. Con etanol-lactato, lactato y

propionato no se observó relación alguna entre la actividad obtenida y el diámetro del gránulo.

Durante los periodos de operación en continuo de los reactores se determinaron las actividades específicas tanto metanogénicas como sulfatorreductoras con la mezcla etanol-lactato y al final del periodo V con acetato y etanol con el fin de evaluar el efecto de las condiciones impuestas sobre las diferentes fracciones de lodo. Durante los periodos II y III tanto la AME como la ASRE evaluadas con la mezcla etanol-lactato no presentaron diferencia entre un periodo y otro; además en estos periodos la ASR de los reactores siempre fue igual o menor a la actividad realizada antes de inocular los reactores. Se requirieron de 45 días (periodo IV) para que se percibiera un aumento considerable en la ASRE de los reactores, con respecto a la actividad obtenida antes de inocular los reactores y en el periodo III; lo cual indica que el aumento de la actividad sulfatorreductora no ocurre rápidamente ya que se necesitaron más de 30 días para duplicarla cuando se usó etanol-lactato como sustrato. Así mismo, la AME con etanol-lactato en el mismo periodo, aumentó sin llegar a ser mayor que la actividad obtenida antes de inocular los reactores.

Sin embargo, a las actividades metanogénica y sulfatorreductora con etanol-lactato no se les pudo dar un seguimiento adecuado dado que en el periodo V los reactores se alimentaron sólo con etanol, lo que afectó el desempeño del lodo puesto que al determinar nuevamente la actividades usando etanol-lactato al final del periodo V, éstas disminuyeron con respecto a las obtenidas en el periodo IV.

Cuando se determinó la ASRE con etanol al finalizar la operación de los reactores se encontró que fue menor comparada con la respectiva actividad antes de inocular los reactores (Tabla 3.8). En cuanto a la actividad metanogénica al final de la operación de los reactores con etanol-lactato, la disminución de ésta fue

drástica pero no se reflejó en el desempeño de los reactores donde los MM siguieron removiendo alrededor de 80% de la DQO (Tabla 3.5 y Figura 3.3).

Finalmente, los valores de actividad sulfatorreductora obtenidos en este trabajo, son comparables con los valores reportados en la literatura para sistemas sulfatorreductores los cuales varían entre 0.10 y 2.1 g DQO/g SSV-día (Gonzalez, 2007; Omil *et al.*, 1996).

4.4 Distribución de diámetro de gránulos en las fracciones y características físicas

Las diferentes fracciones de lodo granular antes de inocular y después de operar los reactores presentaron una amplia distribución de diámetro que fue desde 0.17 mm hasta 5.2 mm. Díaz *et al.* (2006), reportaron que los lodos metanogénicos contienen gránulos de diferentes tamaños que van de micrómetros hasta milímetros.

El análisis de imagen permitió evaluar el cambio en el diámetro de gránulo al someter el lodo a una condición de operación diferente a la que estaba operando: metanogénesis *vs.* sulfatorreducción. Al cabo de 236 días de operación bajo condiciones de sulfatorreducción, se observó que el diámetro promedio de gránulo de las fracciones después de operar los reactores disminuyó con respecto a las fracciones sin inocular (Tabla 3.10). En la fracción A dicha disminución fue más notoria ya que presentó la mayor disminución del diámetro, de 3.04 a 2.72 mm (Tabla 3.10 y Figura 3.12); este mismo comportamiento se observó con el contenido de SSV el cual disminuyó de 13.5 a 8.3% (Tabla 3.6 y Figura 3.6). También, fue en esta fracción donde se observó menor resistencia a la manipulación cuando los gránulos se inmovilizaron en la grenetina semi-sólida. Estos cambios repercutieron en la eficiencia de producción sulfuro y remoción de DQO por las BSR en el R2.

Además, presentó la menor actividad con etanol y la mezcla etanol-lactato en el periodo V.

El cambio en la resistencia a la manipulación podría estar relacionado con la limitación de transferencia de masa como se ha reportado en la literatura. La consistencia del gránulo podría estar relacionada con los problemas de difusión, dado que se presenta desintegración del gránulo al disminuir la concentración de sustrato y por la limitación de la transferencia de masa debida a las bajas velocidades ascensionales y la baja producción de biogás (Grotenhuis *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1989; Liu y Pfeffer, 1991). Sin embargo, este cambio en la consistencia también podría estar relacionado con la disminución de los microorganismos filamentosos, *Methanothrix*, debida a la limitación de sustrato, ya que dichos microorganismos se consideran pilares de la granulación. Alphenaar (1994) establece que probablemente el diámetro del gránulo es controlado por la difusión de sustrato hacia el interior del gránulo, lo que puede reducir el crecimiento bacteriano y provocar lisis celular. De tal forma que el gránulo se debilita debido a la fractura de las estructuras, dado que la mayor conversión de sustrato ocurre en la capa externa, por lo que la capa interna puede recibir mucha menor concentración de sustrato. En casos extremos la población interna en los gránulos puede disminuir y por consiguiente éstos se desintegran.

En el presente trabajo se observó que al manipular los gránulos que habían sido sometidos a condiciones sulfatorreductoras, se disgregaban. Lo anterior se relaciona con las observaciones de Visser *et al.*, 1993a, que reportan una mayor resistencia mecánica de los gránulos metanogénicos comparados con gránulos obtenidos de reactores metanogénicos/sulfatorreductores y puramente sulfatorreductores.

Al analizar la distribución de diámetros de gránulo en la fracción más pequeña (Figura 3.11) vemos que ésta tiene una mayor frecuencia de diámetros

menores a 1 mm, comparado con las fracciones A y B. Si se considera por un lado, que la gran cantidad de gránulos pequeños en los reactores UASB puede jugar un papel importante como fuente de núcleos en el proceso de granulación (Grontenhuis *et al.*, 1991) y por otro, que los diámetros menores a 1 mm se encuentran en una etapa de crecimiento (Ahn 2000) la fracción C sería la más susceptible a formar gránulos sulfatorreductores dentro del reactor. Lo anterior puede ser apoyado también por el experimento realizado por Visser *et al.* (1993a), en condiciones de sulfatorreducción a partir del lodo disgregado donde 50% del volumen tenía un diámetro entre 0.0 y 0.5 mm. Al cabo de 161 días de operar un reactor, esta fracción disminuyó al rededor de 10% y se formaron gránulos entre 2.0 y 2.5 mm. Los autores concluyeron que las BSR fueron capaces de adherirse y crecer en los gránulos junto con los MM (Visser *et al.*, 1993a)

4.5 Desempeño de los reactores UASB

Los resultados obtenidos en los diferentes periodos de operación en continuo de los reactores UASB mostraron claramente una eficiencia de remoción de DQO mayor al 90% en promedio; así mismo, presentaron excelente velocidad de conversión de DQO. La concentración de sulfuro aumentó en promedio de 30 hasta 100 mg H₂S/L gradualmente con el tiempo mostrando una tendencia de mayor concentración a medida que disminuyó el diámetro de gránulo. A lo largo de los cinco periodos de operación los porcentajes de remoción de sulfato permanecieron por debajo del 15% aún cuando la relación DQO/SO₄²⁻ fue de 0.67 a partir del periodo III. Sin embargo, el reactor cuatro fue el que presentó la mayor eficiencia de remoción de sulfato 13.7%. Las eficiencias de remoción de sulfato en este trabajo fueron muy diferentes a la eficiencia de remoción de sulfato obtenida por Kalyuzhny *et al.* (1997) quienes obtuvieron 80% de remoción de sulfato al

operar un sistema UASB bajo condiciones de sulfatorreducción y etanol como fuente de carbono con un rango de TRH de 5 y 0.85 días inoculado con lodo adaptado a sulfato; mientras que en este trabajo se manejó un TRH entre 1 y 0.66 días y el inóculo fue un lodo metanogénico (sin adaptar a sulfato). Lo anterior se reflejó en una escasa remoción de DQO por las BSR (mayor al 10% en los cuatro reactores) y poca competencia con los microorganismos metanógenos durante los 236 días de operación de los reactores. Estos resultados coinciden con los reportes sobre el prolongado tiempo que se requiere para obtener un lodo granular sulfatorreductor a partir de un lodo granular metanogénico, como lo han demostrado Visser *et al.*, (1993a), Omil *et al.*, (1997b) y Celis (2004) en reactores UASB alimentados con una mezcla de AGV (acetato, propionato y butirato).

Por un lado Visser *et al.* (1993a), encontraron que las BSR solamente removieron 21% de la DQO al término de 170 días de operación usando una mezcla de AGV en una proporción 1:1:1; mientras que Celis (2004) obtuvo 50% de DQO removido por las BSR al cabo de 270 días de operación, utilizando la misma mezcla de AGV pero en una proporción 1:2:2. Ambos trabajos mantuvieron una relación DQO/SO_4^{2-} de 0.5 y 0.57, respectivamente. Por otro lado Omil *et al.*, (1998) evaluaron un lodo granular, previamente adaptado a condiciones sulfatorreductoras durante 360 días, a una relación DQO/SO_4^{2-} de 0.5, con la mezcla de AGV pero en una proporción mayor (5:3:2). Bajo estas condiciones fueron necesarios 250 días para aumentar la eficiencia de remoción de DQO por las BSR de 50 a 90%.

Esta diferencia en los resultados tiene que ver con el tipo de inóculo utilizado, Visser y Celis utilizaron un lodo metanogénico, mientras que Omil usó un lodo sulfatorreductor. Para el caso del presente estudio, los reactores UASB fueron inoculados con un lodo granular metanogénico, con lo cual se confirma que

el origen del inóculo, curso del experimento y la estrategia para iniciar el arranque del reactor son muy importantes. Omil *et al.* (1997b) mediante la evaluación de un lodo metanogénico que contenía baja cantidad de BSR, detectaron que al cabo de 100 días las BSR lograron remover únicamente el 10% de acetato alimentado. Por otro lado, el enfoque desde el cual se desarrolló este trabajo, permite inferir que el diámetro de gránulo puede trascender en la obtención de un lodo granular puramente sulfatorreductor, por lo que esta estrategia podría usarse en conjunto con las ya evaluadas, las cuales van desde la inhibición de los MM mediante la exposición del lodo a concentraciones de oxígeno (Omil *et al.*, 1997a), adición de químicos como el cloroformo (Visser *et al.*, 1993a), alteración de pH (Omil *et al.*, 1997a), shock por incremento de temperatura a 65°C (Visser *et al.*, 1993c), bioaumentación mediante la adición de cultivos puros (Omil *et al.*, 1997a) o de lodo sulfatorreductor (O'Flaherty y Colleran, 1999), bioactivación de las BSR mediante mezcla de substratos (Goncalves *et al.*, 2005).

En el lodo de los reactores al final de su operación se observó un pequeño incremento de BSR con acetato como substrato (Tabla 3.7), esto apunta a que posiblemente las BSRA estuvieron en desventaja numérica con respecto a los MM. Se ha reportado que los MM acetoclásticos están presentes en gran cantidad ($> 10^8$) en los biorreactores, mientras que el número de BSRA es menor ($< 10^4$), (Oude-Elferink *et al.*, 1994).

Si además consideramos que las BSR que predominaban eran del grupo que oxida incompletamente el substrato y genera acetato, se podría explicar el por qué los MM no estuvieron limitados por substrato aún cuando los reactores fueron operados en condiciones de sulfatorreducción. Por otro lado Lens *et al.* (1998), encontraron que en reactores sulfatorreductores UASB de una sola etapa y con compartimientos, el factor limitante es la capacidad de remoción de acetato, debido

al lento desarrollo de las BSR. Aun cuando parte del inóculo tenía la capacidad de utilizar acetato y sulfato, los MM permanecieron en el lodo.

En otros estudios también se ha reportado que el etanol y lactato son utilizados comúnmente por las BSR que oxidan incompletamente la materia orgánica (Nagpal *et al.*, 2000).

La presencia de BSR que oxidan incompletamente el substrato se ha confirmado mediante técnicas moleculares. En reactores UASB y de lecho fluidificado alimentados con lactato, etanol y sulfato, se encontró que la comunidad que predominó en esos reactores fueron las BSR heterotróficas de la familia *Desulfovibrionaceae* (Kaksonen *et al.*, 2004). Por otro lado, cuando se realizó la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) al lodo de un reactor UASB industrial sulfatorreductor que se alimentó con etanol y sulfato, se observó que 70% de la comunidad de BSR pertenecían a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfobulbus* que oxidan incompletamente el substrato y solamente 20% fue similar al género *Desulfobacca acetoxidans*, que oxida completamente el substrato (Dar *et al.*, 2007).

Finalmente con respecto a la remoción de sulfato al cabo de 236 días de operación de los reactores la eficiencia de remoción de DQO-BSR fue mayor de 10%.

5. Conclusiones y recomendaciones

No se observó una relación entre el diámetro de gránulo y los parámetros cinéticos determinados con etanol o lactato como sustratos.

La cantidad de BSR cuantificadas en el lodo granular mostró una relación directa con el diámetro de gránulo; sin embargo, esto no se reflejó en la actividad específica, en las constantes cinéticas y sobre todo en el desempeño de los reactores, en los que predominó la metanogénesis.

Al término de 236 días de operación en continuo de los reactores no se observó una disminución considerable en la utilización de DQO por los microorganismos metanógenos. Sin embargo, fue evidente el aumento gradual de la utilización de DQO por las BSR de 3% hasta 10% en promedio para los cuatro reactores, este aumento fue mayor en el menor diámetro de gránulo.

En cuanto a DQO removida, los diferentes diámetros de gránulo no influyeron sobre ésta. Por el contrario en términos de remoción de sulfato, fue el reactor con el lodo de menor diámetro donde se observó el mejor desempeño (13%) aunque el tiempo en el que se alcanzó fue muy prolongado. Por lo que si la finalidad es remover sulfato durante el arranque de un reactor UASB, es recomendable iniciar el proceso con un lodo de diámetro pequeño como se observó en el presente trabajo.

En general, no se encontró relación entre las actividades específicas metanogénica y sulfatorreductora con el diámetro de gránulo.

La baja contribución de las BSR en la remoción de la DQO de los reactores (Figura 3.3) al cabo de 236 días de operación se atribuye a la poca afinidad por el substrato obtenida con etanol y lactato (Tablas 3.2 y 3.3), dado que los valores de K_s determinados mediante la cuantificación de metano bajo condiciones de sulfatorreducción fueron muy bajos en comparación con los valores de K_s obtenidos mediante la cuantificación de la producción de sulfuro.

La estrategia con la cual se arranque un sistema en el cual se busca favorecer a las BSR, juega un papel importante, además de otras características físico-químicas y biológicas, contenido de BSR presentes en el lodo, tipo de substrato, que en un trabajo a futuro pudieran determinarse bajo condiciones sulfatorreductoras.

Finalmente, no basta operar los reactores a una relación estequiométrica de DQO/SO_4^{2-} de 0.67 para tener un lodo granular sulfatorreductor; sino que también, son importantes otros factores como las condiciones de operación del reactor (TRH), substrato, tipo de inóculo (diámetro de gránulo).

El usar un lodo con distribución de diámetros pequeños podría ayuda a tener más “partículas” que favorezcan la formación de núcleos, los cuales pueden ser orientados a formar gránulos sulfatorreductores, mediante el acoplamiento de ciertas estrategias de arranque de un reactor, caracterización del lodo desde un aspecto físico y microbiológico, tipo de substrato, relación DQO/SO_4^{2-} , las cuales en conjunto podrían contribuir a obtener un lodo sulfarorreductor en corto tiempo (menos de 100 días).

6. Referencias bibliográficas

- Aiyuk, S., Verstraete, W. (2004). Sedimentological evolution in an UASB treating SYNTHES, a new representative synthetic sewage, at low loading rates. *Bioresource Technol.* **93**, 269-278.
- Alphenaar, P.A., Visser, A., Lettinga, G. (1993). Effect of liquid upward velocity and hydraulic retention time on granulation in UASB reactors treating wastewater with a high sulphate content. *Bioresource Technol* **43**, 249-258.
- Alphenaar, P.A. (1994). Anaerobic granular sludge: Characterization, and factors affecting its functioning. Tesis de Doctorado. Universidad de Wageningen. Holanda.
- Ahn, Y-H. (2000). Physicochemical and microbial aspects of anaerobic granular pellets. *J Environ Sci Heal C.* **A35(9)**, 1617-1635.
- APHA-AWA-WPCF, (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater, 19a. Edición, *American Public Health Association*, Washington, D.C., U.S.A.
- Barnes, L.J., Janssen, F.J., Scheeren, P.J.H., Versteegh, J.H., Koch, R.O. (1991). Simultaneous microbial removal of sulphate and heavy metals from wastewaters. *Trans. Instn. Metall. (Sect. C: Mineral Process Extr. Metal).* **101**, C183-189.
- Barton, L.L. (1992). Sulfur metabolism. En: *Encyclopedia of Microbiology*. Lederberg, J. (ed). Vol. 4. Academic, New York. pp. 135-150.
- Batstone, D.J., Keller, J., Blackall, L.L. (2004). The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Res.* **38**, 1390-1404.
- Bellouti, M., Alves, M.M., Novais, M.J., Mota, M. (1997). Floccs vs. granules: differentiation by fractal dimension. *Water Res.* **31**, 1227-1231.
- Bhunia, P., Ghangrekar, M.M. (2007). Required minimum granule size in UASB reactor and characteristic variation with size. *Bioresource Technol.* **98**, 994-999.
- Bollag, D.M., Edelstein, S.J. (1991). Protein Methods. Department of Biochemistry, University of Geneva, Geneva, Suiza. Editorial *Wiley-Liss*, 4-5.
- Boone, D.R., Jonson, R.L., Liu, Y. (1989). Diffusion of interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of Km for H₂ or formate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1735-1741.
- Calli, B., Mertoglu, B., Roest, K., Inanc, B. (2006). Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating lanfill leachate. *Bioresource Technol.* **97**, 641-647.

- Celis García, M.L.B. (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis doctoral. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F., México.
- Chistensen, F.K., Kristensen, G.H., La tour Cansen, J. (1989). Biofilm structure: an important and neglected parameter in waste water treatment. *Water Sci. Technol.* **21**(8-9), 805-814.
- Colleran, E., Finnegan, S., Lens, P. (1995). Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek.* **67**, 29-46.
- Conrad, R., Phelps, T.J., Zeikus, J.G. (1985). Metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**, 595-601.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **4**, 33-36.
- Chan, O.C., Liu, W.T., Fang, H.H.P. (2001). Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water Sci. Technol.* **43**(1), 77-82.
- Chen, J., Lun, S-Y. (1993). Study on mechanisms of anaerobic sludge granulation in UASB reactors. *Water Sci. Technol.* **28**(7), 171-178.
- Choi, E., Rim, J.M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Sci. Technol.* **23**(7-9), 1259-1264.
- Dar, S. A., Stams, A.J.M., Kuenen, J.G. (2007). Co-existence of physiologically similar sulfate-reducing bacteria in a full-scale sulfidogenic bioreactor fed with a single organic electron donor. *Appl. Microbiol. Biot.* **75**, 1463-1472.
- De Smul, A., Verstraete, W. (1999). Retention of sulfate-reducing bacteria in expanded granular-sludge-blanket reactors. *Water Environ. Res.* **71**, 427-431.
- De Zeeuw, W.J. (1987). Granular sludge in UASB reactors. En: *Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology*. Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J.T.C., Hulshoff Pol, L.W. (Eds). Pudoc. Wageningen. Holanda. pp. 132-145.
- Díaz, E.E., Stams, A.J.M., Amils, R., Sanz, J.L. (2006). Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4942-4949.
- Dolfing, J. (1987). Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. Tesis Doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- Dubourgier, H.C., Prensier, G., Albagnac, G. (1987). Structure and microbial activities of granular anaerobic sludge. En: *Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology*. Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J.T.C., Hulshoff Pol, L.W. (Eds). Pudoc. Wageningen. Holanda. pp. 18-33.

- Fang, H.H.P., Chui, H.K. (1993). Maximum COD loading capacity in UASB reactors at 37°C. *J. Environ. Eng.* **119**, 103-119.
- Fauque, G.D. (1995). Ecology of sulfate-reducing bacteria. En: *Sulfate-Reducing Bacteria*. Larry, L., Barton, (ed). Plenum Press. Nueva York, pp. 217-241.
- Ghangrekar, M.M., Asolekar, S.R., Ranganathan, R.K., Joshi, G.S. (1996). Experience with UASB reactor start-up under different operation conditions. *Water Sci. Technol.* **34**(5-6), 421-428.
- Goncalves, M.M.M., Leite, S.G.F., Sant'Anna, G.L. (2005). The bioactivation procedure for increasing the sulphate-reducing bacteria in a UASB reactor. *Braz. J. Chem. Eng.* **22**, 565-571.
- Gonzalez-Gil, G. Seghezze, L., Lettinga, G., Kleerebezem, R. (2001). Kinetics and mass-transfer phenomena in anaerobic granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 125-134.
- González Silva, B.M. (2007). Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor. Tesis de maestría. División de Ciencias Ambientales. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí. México.
- Grotenhuis, J.T.C., Kiessel, J.C., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., Zehnder, A.J.B. (1991). Role of substrate concentration in particle size distribution of methanogenic granular sludge in UASB reactors. *Water Res.* **25**, 21-27.
- Guiot, S.R., Pauss, A., Costerton, J.W. (1992). A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water. Sci. Technol.* **25**(7), 1-10.
- Gupta, A., Flora, J.R. V., Gupta, M., Sayles, G.D., Suidan, M.T. (1994). Methanogenesis and sulfate reduction in chemostats I. Kinetic studies and experiments. *Water Res.* **22**, 1075-1083.
- Hao, O.J., Chen, J.M., Huang, L., Buglass, R.L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **26**, 155-187.
- Harada, H., Uemura, S., Momonoi, K. (1994). Interactions between sulphate-reducing bacteria and methane producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Water Res.* **28**, 355-367.
- Harvey, M., Forsberg, C.W., Beveridge, T. J., Pos, J., Ogilvie, J.R. (1984). Methanogenic activity and structural characteristics of the microbial biofilm on a needlepunched polyester support. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 633-638.
- Hickey, R.F., Wu, W.M., Veiga, M.C., Jones, R. (1991). Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Water Sci. Technol.* **24**(8), 207-255.
- Hoeks, F.M.J.M.M., ten Hoopen, H.J.G., Roels, J.A., Kuenen, J.G. (1984). Anaerobic treatment of acid water (methane production in a sulfate-rich environment). *Prog. Ind. Microbiol.* **20**, 113-119.

- Hulshoff Pol, L.W., van de Worp, J.J.M., Lettinga, G., Beverloo, W.A. (1986). Physycal characterization of anaerobic granular sludge. En: Proc. Watertreatment Conference AQUATECH'86. Amsterdam. Holanda. pp. 89-101.
- Hulshoff Pol, L.W., Heijnekamp, K., Lettinga, G. (1987). The selection pressure as a driving force behind the granulation of anaerobic sludge. En: *Granular anaerobic sludge: microbiology and technology* Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J.T.C., Hulshoff Pol, L.W. (Eds). Pudoc. Wageningen. Holanda. pp. 153-161.
- Hulshoff Pol, L.W. (1989). The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. Tesis Doctoral, Agricultural University Wageningen. Holanda.
- Hulshoff Pol, L.W., De Zeeuw, W.J., Velzeboer, C.T.M., Lettinga, G. (1983). Granulation in UASB reactors. *Water Sci. Technol.* **15**(8-9), 291-304.
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P., Stams, A.J.M., Lettinga, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters: microbial and process technological aspects. *Biodegradation.* **9**, 213-224.
- Hulshoff Pol, L.W., De Castro Lopes, S.I., Lettinga, G., Lens, P.N.L. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Res.* **38**, 1376-1389.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S., Verstraete, W. (1986a). Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Technical aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 572-579.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S., Verstraete, W. (1986b). Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Microbiological aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 580-587.
- Jeison, D., Chamy, R. (1998). Novel technique for measuring the size distribution of granules from anaerobic reactors for wastewater treatment. *Biotechnol. Tech.* **12**, 659-662.
- Kaksonen, A.H., Franzmann, P.D., Puhakka, J. (2003). Performance and ethanol oxidation kinetics of sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation.* **14**, 207-217.
- Kaksonen, A.H., Plumb, J.J. Franzmann, P.D, Punhakka, J.A. (2004). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate- containing wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 279-289.
- Kalyuzhnyi, S., Fragoso, C. y Rodríguez, J. (1997). Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with etanol as the electron donor. *Microbiology.* **66**, 562-567.
- Karri, S., Sierra-Alvarez, R., Fiel, J.A. (2006). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere.* **62**, 121-127.

- Lens, P., Massone, A., Rozzi, A., Verstraete, W. (1995a). Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed film reactors. *Water Res.* **29**, 857-870.
- Lens, P., De Pooter, M-P., Cronenberg, C.C., Verstraete, W.H. (1995b). Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment. *Water Res.* **29**, 871-880.
- Lens, P.N.L., Bosch van Den, M.L., Husholff Pol, L.W., Lettinga, G. (1998a). Effect of staging on volatile fatty acid degradation in sulphidogenic granular sludge reactor. *Water Res.* **32**, 1178-1192.
- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Husholff Pol, L.W., Lettinga, G. (1998b). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit Rev Env. Sci. Tec.* **38**, 41-88.
- Lens, P.N.L., Omil, F., Lema, J.M., Hulshoff Pol, L.W. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental Technologies to treat Sulfur Pollution Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L.W. (Eds.) International Water Association. Londres. pp. 153-168.
- Lens, P.N.L., Meulepas, R.J.W., Sampaio, R., Vallero, M., Esposito, G. (2007). Bioprocess engineering of sulfate reduction for environmental technology. En: *Microbial Sulfur Metabolism*. Dahl, C., Friedich, C.G. (Eds.) Springer-Verlag. Alemania. pp 285-295.
- Lettinga, G., Van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., De Zeeuw, W., Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological waste water treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 699-734.
- Lettinga, G., Hulshoff Pol, L.W., Homba, S.W., Grin, P., Johg, de P., Roersma, R., Jspeert, P.I. (1983). The use of a floating settling granular sludge bed reactor in anaerobic treatment. En: Proc. European Symp. on anaerobic waste water Treatment. Holanda. pp. 411-429.
- Liu, B.Y.M., Pfeffer, J.T. (1991). Out diffusion of fermentation products in anaerobic biofilms. *Res. J. WPCF.* **63**, 773-779.
- Liu, Y., Xu, H.L., Yang, S.F., Tay, J.H. (2003). Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res.* **37**, 661-673.
- Liu, Y., Tay, J.H. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* **22**, 533-563.
- McCartney, D.M. y Oleszkiewicz, J.A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res.* **25**, 203-209.
- MacLeod, F.A., Guiot, S.R., Costerton, J.W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1598-1607.

- Mahoney, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N., Murray, R.G.E. (1987). The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. *Water Sci. Technol.* **9**, 249-260.
- Maree, J.P., Hulse, G., Dods, D., Schutte, C.E. (1991). Pilot plant studies on biological sulphate removal from industrial effluent. *Water Sci. Technol.* **23**(7-9), 1293-1300.
- Morgan, J.W., Evison, L.M., Foster, C.F. (1991). Upflow sludge blanket reactors: the effect of bio-supplements on performance and granulation. *J. Chem. Technol. Biot.* **52**, 243-255.
- Mu, Y., Yu, H.Q., Wang, G. (2006). Permeabilities of anaerobic CH₄-producing granules. *Water Res.* **40**, 1811-1815.
- Mulder, A. (1984). The effects of high sulfate concentrations on the methane fermentation of waste water. *Progr. Ind. Microbiol.* **20**, 133-143.
- Nagpal S., Chichulcherm S., Livingston A., Peeva L. (2000). Ethanol utilization by sulphate reducing bacteria: An experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 534-543.
- Noyola, A., Moreno, G. (1994). Granulation production from raw waste activated sludge. *Water Sci. Technol.* **30**(12), 339-346.
- O'Flaherty, V., Mahony T., O'Kennedy R., Colleran E. (1998). Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. *Process. Biochem.* **33**, 555-569.
- O'Flaherty, V., Colleran E. (1999). Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor I: Process disturbance and remediation. *Bioresource Technol.* **68**, 101-107.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L. y Lettinga, G. (1996). Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* **31**, 699-710.
- Omil, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Lens, P., Hulshoff Pol, L. y Lettinga, G. (1997a). Effect of the inoculation with *Desulforhabdus amnigenus* and pH or O₂ shocks on the competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in an acetate fed UASB reactor. *Bioresource Technol.* **60**, 113-122.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1997b). Characterization of biomass from a sulfidogenic, volatile fatty acid-degrading granular sludge reactor. *Enzyme Microb. Tech.* **20**, 229-236.
- Omil, F., Lens, P., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1998). Long term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 676-685.
- O'Reilly, C. y Colleran, E. (2006). Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on mesophilic reactor biomass populations: physico-chemical and microbiological properties. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **56**, 141-153.

- Oremland, R.S. y Capone, D.G. (1988). Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. En: *Advances in Microbial Ecology* (Edited by Marshall KC). New York. pp 285-383.
- Oude-Elferink, S.J.W.H., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W., Stams, A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS. Microbiol. Rev.* **15**, 119-136.
- Overmeire, A., Lens, P. y Verstraete, W. (1994). Mass transfer limitation of sulfate in methanogenic aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 387-391.
- Park, J.E., Kim, J.O., Lee, W.B., Lee, S.T., Lee, J.J. (1997). UASB performance in presence of algae and synthetic media. *Water Sci. Technol.* **36**(12), 125-133.
- Patidar, S.K., Tare, V. (2005). Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomasa. *Bioresource Technol.* **96**, 1215-1222.
- Pereboom, J.H.F. (1994). Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC reactors. *Water. Sci. Technol.* **30**(12), 211-221.
- Polprasert, C., Haas, C.N. (1995). Effect of sulfate on anaerobic processes fed with dual substrates. *Water Sci. Technol.* **31**(9), 101-107.
- Postgate, J. R. (1984). *The Sulfate Reducing Bacteria*. Cambridge University. Press.
- Rinzema, A., Lettinga, G. (1988). Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. En: *Biotreatment systems*, (Wise, D.L., ed.). Vol. III, pp. 65-109. CRC Press Inc., Boca Raton U.S.A
- Roest, K., Heiling, H.G., Smidt, H., de Vos, W.M., Stams, A.J.M., Akkermans, A.D.L. (2005). Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 175-185.
- Robertson, L.A., Kuenen, 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., Dworkin, M., Harder, W., Schliefer, H.K., eds.) Segunda edición. Springer Verlag, New York. Vol. 1, Pp. 385-413.
- Santegoeds, C.M., Ferdelman, T.G., Muyzer, G., de Beer, D. (1998). Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3731-3739.
- Särner, E. (1990). Removal of sulphate and sulphite in an anaerobic trickling (ANTRIC) filter. *Water Sci. Technol.* **22**(11), 395-404.
- Sam-Soon PALNS. Loewenthal, R.E., Dold, P.L., Marais, G.V.R. (1987). Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor. *Water SA.* **13**, 69-80.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K. (1994). Extracellular polymer in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Appl. Microbiol. Biot.* **42**, 457-462.

- Schmidt, J.E., Ahring, B.K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 229-246.
- Scheeren, P.J.H., Koch, R.O., Buisman, C.J.N., Barnes, L.J., Versteegh, J.H. (1991). New biological treatment plant for heavy metal contaminated groundwater. *Trans. Instn. Min. Metall.* (Sect. C: Mineral Process. Extr. Metall.). **101**: C190-C199.
- Show, Y.K., Wang, Y., Foong, F.S., Tay, H.J. (2004). Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Res.* **38**, 2293-2304.
- Smith, R.L., Klug, M.J. (1981). Electron donors utilized by sulfate-reducing bacteria in eutrophic lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 116-121.
- Speece, R.E. (1996). *Anaerobic Biothechnology for Industrial Waste-Waters*. Archae Press. Nashville. T.N. pp. 287-318.
- Stucki, G., Hanselmann, K.W., Hürzeler, A. (1993). Biological sulfuric acid transformation: reactor design and process optimization. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 303-315.
- Takahashi, M., Kyosai, S. (1991). Pilot plant study on microaerobic self-granulated sludge process (multi-stage reversing-flow bioreactor: MRB): *Water Sci. Technol.* **23**(4-6), 973-980.
- Tarvin, D. y Buswell, A.M. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 1751-1755.
- Tay, J.H., Yan, Y.G. (1996). Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Environ. Res.* **68**, 1140-1150.
- Tay, J.H., Xu, H.L., Teo, K.C. (2000). Molecular mechanism of granulation I: H⁺ translocation-dehydration theory. *J. Environ. Eng.* **126**, 403-410.
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2001). Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge reactor. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 168-175.
- Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B., Vandermeren, P., Verstraete, W. (1995). Granulation and sludge bed stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3681-3686.
- Tichy, R., Lens, P., Grotenhuis, J.T.C., Bos, P. (1998). Solid-state reduced sulfur compounds: environmental aspects and bioremediation. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **28**, 1-40.
- Tramper, J., van Gronestijn, J.W., Luyben, K. Ch. A. M., Hulshoff Pol, L.W. (1984). Some physical and kinetics properties of granular anaerobic sludge. En: *Innovations in Biotechnology*. Houwink E.H. y van der Meer, R.R. (Eds). Elsevier Science, Amsterdam. pp. 145-155.

- Vanderhaegen, B., Ysebaert, K., Favere, K., van Wambeke, M., Peeters, T., Panic, V., Vandenlangenberg, V., Verstraete, W. (1992). Acidogenesis in relation to in-reactor granule yield. *Water Sci. Technol.* **25**(7), 21-30.
- van Lier, J.B., Tilche, A., Ahring, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Hulshoff Pol, L.W. (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **43**(1), 1-18.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J.B. (1987a). The role of cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1893-1897.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J.B. (1987b). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1898-1901.
- Visser, A., Gao, Y., Lettinga, G. (1992). The anaerobic treatment of a synthetic sulfate containing wastewaters under thermophilic (55°C) conditions. *Water Sci. Technol.* **25**(7), 193-202.
- Visser, A., Alpheenar, P.A., Gao, Y., van Rossum, G., Lettinga, G. (1993a). Granulation and immobilization of methanogenic and sulfate-reducing bacteria in high rate anaerobic reactors. *Appl. Microbiol. Biot.* **40**, 575-581.
- Visser, A., Beeksma, I., van der Zee, F., Stams, A.J.M., Lettinga, G. (1993b). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulfate concentrations. *Appl. Microbiol. Biot.* **40**, 549-556.
- Visser, A., Gao, Y., Lettinga, G. (1993c). Effects of short-term temperature increase on the mesophilic anaerobic breakdown of sulfate containing synthetic wastewater. *Water Res.* **27**, 541-550.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate-containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- Visser, A., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci. Technol.* **33**(3), 99-110.
- Wang, Y., Show, Y.K., Tay, H.J., Sim, H.K. (2004). Effects of cationic polymer on start-up and granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *J. Chem. Tec. Biot.* **79**, 219-228.
- Weijma, J., Stams, A.J.M., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (2000). Thermophilic sulfate reduction and methanogenesis with methanol in a high rate anaerobic reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 354-363.
- Widdel F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. (ed. A.J.B. Zehnder). John Wiley and Sons, New York. pp. 469-586.
- Wiegant, W.M. (1987). "The spaghetti theory" on anaerobic sludge formation, or the inevitability of granulation. En: *Granular anaerobic sludge: Microbiology and*

- technology*. Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J.T.C, Hulshoff Pol, L.W. (Eds). Pudoc. Wageningen. Holanda. pp. 146-152.
- Wu, J.H., Liu, W.T., Tseng, I.C., Cheng, S.S. (2001). Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology*. **147**, 373-382.
- Wu, Wei-min., Jain, M.K., Zeikus, J.G. (1996). Formation of fatty acid-degrading, anaerobic granules by defined species. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2037-2044.
- Yoda, M., Kitagawa, M., Miyayi, Y. (1987). Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in anaerobic biofilm. *Water Res.* **21**, 1547-1556.
- Yan, G.Y., Tay, H.J. (1997). Characterisation of the granulation process during UASB start-up. *Water Res.* **31**(7), 1573-1580.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., Tay, J.H. (2000). Effects of Fe²⁺ on sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Sci. Technol.* **41**(12), 199-205.
- Zhang, Y., Aiyuk, S., Xu, H., Chen, G., Verstraete, W. (2005). Study of microbial community structures in UASB sludge treating municipal wastewaters by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA. *Sci. China Ser. C.* **48**, 128-135.
- Zhu, J., Hu, J., Gu, X. (1997). The bacterial numeration and the observation of a new syntrophic association for granular sludge. *Water Sci. Technol.* **36**(6-7), 133-140.

ANEXO 1

Análisis de varianza simple

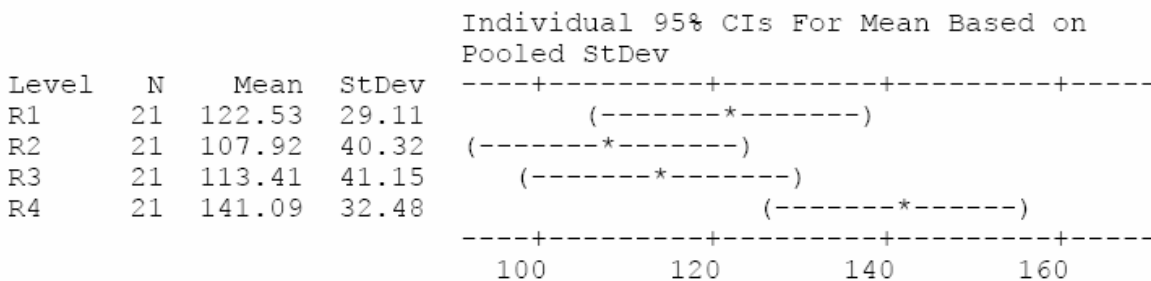
Los valores de concentración de sulfuro obtenidos durante el periodo V de operación en continuo de los reactores se analizaron mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) con el software Minitab 15.

Este análisis permitió corroborar que la concentración de sulfuro entre los reactores presentó estadísticamente una diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95% como se muestra en el análisis estadístico adjunto.

One-way ANOVA: R1, R2, R3, R4

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	13325	4442	3.40	0.022
Error	80	104434	1305		
Total	83	117759			

S = 36.13 R-Sq = 11.32% R-Sq(adj) = 7.99%



Pooled StDev = 36.13

ANEXO 2

Seguimiento de los reactores

Durante la escritura del presente documento, se continuó el seguimiento de los reactores alimentados con etanol como única fuente de carbono y con un TRH de 0.66 días. Con respecto a la concentración de sulfuro en el efluente se observó que la concentración de sulfuro aumentó más de 50% del día 236 al día 252. Las concentraciones incrementaron de 122.5, 107.9, 113.4 y 141.1 mg H₂S/L hasta 240, 264, 216 y 260 mg H₂S/L para los reactores 1, 2, 3 y 4 respectivamente. En este intervalo de tiempo, el R2 (fracción A) presentó prácticamente la misma concentración de sulfuro que el R4 (fracción C). A partir de los 253 días de operación, la concentración de sulfuro se determinó únicamente en los reactores 1, 2 y 3, ya que por cuestiones técnicas en el reactor 4 se perdió lodo granular (10 mL aproximadamente). Se observó que la concentración de sulfuro entre los días 253 y 289 fue en promedio 174, 182 y 192 mg H₂S/L para los reactores 1, 2 y 3, respectivamente. Estas concentraciones fueron menores que las obtenidas a los 252 días y mayores que las cuantificadas entre los días 115-236 (período V de la tabla 3.5).