



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales.

TESIS DE MAESTRÍA

**“Arranque de un reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) para la
producción biológica de H₂S”**

Alumna:
Denys Kristalia Villa Gómez.

Codirectores:
Dr. Elías Razo Flores y Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García

San Luís Potosí, SLP.

30 de Noviembre del 2006

La presente tesis de maestría en Ciencias Aplicadas con especialidad en Ciencias Ambientales fue elaborada por Denys Kristalia Villa Gómez y aprobada el 30 de noviembre del 2006 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



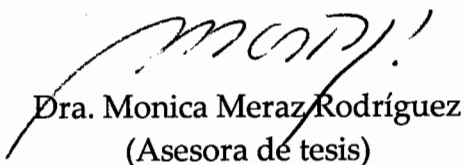
Dr. Elías Razo Flores
(Codirector de la tesis)



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



Dr. José René Rangel Méndez
(Asesor de tesis)

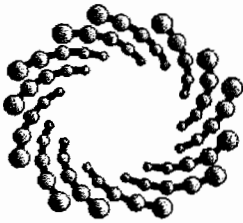


Dra. Monica Meraz Rodríguez
(Asesora de tesis)

Esta tesis fue elaborada en la División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. bajo la dirección de los doctores Elías Razo Flores y Ma. de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-192635) así como apoyo financiero obtenido a través del proyecto CONACYT-Fondos Sectoriales (SEP-2004-C01-46506)

El posgrado en Ciencias Ambientales, 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 009 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de noviembre del año 2006, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. José René Rangel Méndez	Presidente	IPICYT
Dra. Mónica Meraz Rodríguez	Secretario	UAM
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT
Dra. Ma. 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.

Denys Kristalia Villa Gómez

sobre la Tesis intitulada:

Arranque de un Reactor de Lecho Fluidificado Inverso (LFI) para la Producción Biológica de H₂S

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García
Dr. Elías Razo Flores**

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:00 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 30 días del mes noviembre de 2006.

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

Dr. Marcial Bonilla Ma.
Secretario Académico



Agradecimientos

Le doy gracias a Dios por haberme conducido por estos caminos en los que adquirí nuevas experiencias. Agradezco infinitamente a Jorge Alberto Almaraz Ramírez por todo el apoyo incondicional que me brindó durante mis estudios de maestría. También a mis padres Luis Manuel Villa Hernández y Araceli Gómez Corvera por su apoyo desde lejos.

A los miembros del jurado les agradezco las sugerencias que me hicieron para mejorar este documento, a mis maestros los cuales me hicieron adquirir conocimientos que fueron las bases del desarrollo de mi trabajo de tesis y finalmente a Dulce Partida y Mirna Salinas Hernández por su gran ayuda en el laboratorio.

ÍNDICE

Resumen	vii
Abstract	viii
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	4
2.1 Alternativas de tratamiento	5
2.1.1 Tratamientos fisicoquímicos	5
2.1.2 Tratamientos biológicos	6
2.2 Proceso biológico de la sulfatorreducción	7
2.3 Competencia entre BSR y microorganismos metanógenos	9
2.4 Toxicidad por sulfuros	13
2.5 La sulfatorreducción para la precipitación de metales	19
2.6 Biorreactores anaerobios para el proceso de sulfatorreducción	19
2.6.1 Reactor UASB	23
2.6.2 Reactores de lecho fluidificado inverso (LFI)	24
Capítulo 3. Materiales y métodos	26
3.1 Reactores	26
3.1.1 Reactor UASB	26
3.1.2 Reactor LFI	27
3.2 Fuente de biomasa	28
3.2.1 Inóculo del reactor UASB	28
3.2.2 Inóculo del reactor LFI	29
3.3 Medios de cultivo	29
3.4 Condiciones de operación de los reactores	31
3.4.1 Reactor UASB	31
3.4.2 Reactor LFI	32
3.5 Determinación de la actividad específica metanogénica y sulfatorreductora del lodo granular del reactor UASB y de la biopelícula del reactor LFI	33
3.5.1 Actividad metanogénica específica del lodo granular	34
3.5.2 Actividad sulfatorreductora del lodo granular	35
3.5.3 Actividad metanogénica específica de la biopelícula	36
3.5.4 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula	36
3.6 Análisis	37

3.6.1	Determinación de la DQO	37
3.6.2	Determinación de sulfuro por yodometría	37
3.6.3	Determinación de sulfuro por el método de Cord-Ruwisch	38
3.6.4	Determinación del pH y alcalinidad	38
3.6.5	Determinación de sulfato por el método gravimétrico	39
3.6.6	Determinación de sulfato por el método turbidimétrico	40
3.6.7	Determinación de sulfato por electroforesis capilar	41
3.6.8	Determinación de sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles	41
3.6.9	Determinación de SVI	42
3.6.10	Determinación de acetato	44
3.6.11	Microscopia electrónica de barrido (MEB)	45
3.7	Cálculos	45
3.7.1	Eficiencia de remoción de DQO	45
3.7.2	Eficiencia de conversión de Sulfatos (ECS)	46
3.7.3	Cantidad de DQO utilizada para la sulfatorreducción (%)	46
3.7.4	Concentración de sulfuro en fase gas	46
Capítulo 4. Resultados y Discusión		48
4.1	Desempeño del reactor UASB	48
4.2	Desempeño del reactor LFI	53
4.2.1	Arranque e inmovilización de las bacterias en el reactor LFI	53
4.2.2	Cambios en la velocidad superficial del líquido	58
4.2.3	Operación en continuo del reactor LFI	60
4.3	Actividades específicas	69
4.3.1	Lodo granular del reactor UASB	69
4.3.2	Biopelícula inmovilizada del reactor LFI	72
4.4	Comparación del desempeño de los reactores UASB y LFI	80
Conclusiones y recomendaciones		84
Referencias bibliográficas		87

Villa Gómez, Denys Kristalia (2006). Arranque de un reactor de lecho fluidificado inverso (LFI) para la producción biológica de H₂S. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

Resumen

En la actualidad existe una gran variedad de efluentes industriales que contienen importantes concentraciones de sulfato. Un ejemplo de estos son los drenajes ácidos de minas (DAM), los cuales son aguas residuales ácidas con alto contenido de metales disueltos. El tratamiento de DAM por el proceso biológico de sulfatorreducción es una alternativa prometedora en comparación con los métodos químicos. Las bacterias sulfatorreductoras (BSR) reducen el sulfato a sulfuro de hidrógeno en presencia de un donador de electrones o hidrógeno. Los beneficios son la remoción de metales solubles en forma de sulfuros metálicos insolubles, sulfatos y aumento del pH.

En el presente trabajo se estudió la sulfatorreducción en dos reactores anaerobios de alta tasa, uno de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) y otro de lecho fluidificado inverso (LFI) alimentados con etanol y lactato. Los objetivos principales fueron: el desarrollo de biomasa predominantemente sulfatorreductora en el reactor UASB para luego, a partir de dicha biomasa, inocular el reactor LFI y determinar el tiempo que se requería para formar una biopelícula en el soporte. Por último comparar las eficiencias de remoción de DQO y de conversión de sulfatos obtenidas en el reactor UASB con las del reactor LFI. El reactor UASB presentó un aumento gradual en el porcentaje de DQO utilizada para la sulfatorreducción de 37.2 a 86.7%, y eficiencias de conversión de sulfato de 29.5 a 77.7%. El reactor LFI se operó en lote durante 46 días y después en continuo durante 85 días. El soporte se fluidificó por recirculación del efluente y la velocidad de fluidificación mínima del líquido fue de 13.9 m/h, con una expansión del lecho de 25% del volumen del reactor. A los 90 días de operación del reactor los microorganismos cubrieron mayormente la superficie del soporte, indicando que la biopelícula se había formado. Los factores hidrodinámicos contribuyeron al desprendimiento de biomasa no adherida completamente al soporte y en la formación de una biopelícula resistente. En la operación en continuo la eficiencia de conversión de sulfato aumentó de 3.9 a 28.1% y el porcentaje de DQO utilizada para sulfatorreducción aumentó de 6.1 a 47.1%. Los resultados del reactor sugirieron la inmovilización de bacterias sulfatorreductoras de oxidación incompleta debido a que hubo acumulación de acetato en el reactor y en la determinación de las actividades específicas. Los altos valores de actividad sulfatorreductora en las determinaciones con etanol y lactato (11.7 y 15.3 d DQO/g SSV-d respectivamente) a lo largo de la operación del reactor indicaron una población microbiana mayoritariamente sulfatorreductora debida a una presión de selección en la biomasa adherida al soporte. Al analizar los datos obtenidos de los dos reactores, se pudo observar que el reactor UASB tardó más de 100 días para que la producción de sulfuro disuelto total aumentara de 46 mg/L a 200 mg/L, mientras que para el reactor LFI se requirieron solo 60 días de operación. Los reactores presentaron diferencias considerables con respecto a las eficiencias de remoción de DQO y de conversión de sulfato debido probablemente a la relación etanol:lactato alimentada y a la cantidad de biomasa presente en ambos reactores.

Villa Gómez, Denys Kristalia (2006). Start up of a down-flow fluidized bed reactor for biological production of H₂S. M.Sc. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Mexico.

Abstract

Nowadays there is a wide variety of industrial effluents that contain important sulfate concentrations. An example of these is the acid mine drainage (AMD), which is an acid wastewater with high dissolved metal content. The treatment of AMD by the biological process of sulfate reduction is a promising alternative in comparison with chemical methods. The sulfate reducing bacteria (SRB) are responsible to reduce the sulfate to hydrogen sulfide in the presence of an electron donor or hydrogen. The benefits are the removal of soluble metals in form of insoluble metallic sulfides, sulfates and the pH increment.

In this work the sulfate reduction process was studied in two high rate anaerobic reactors, an upflow anaerobic sludge bed (UASB) and a down-flow fluidized bed (DFFB) fed with ethanol and lactate. The main aims were the development of a predominantly sulfate reducing granular sludge in the UASB reactor that was used as inoculum for the DFFB reactor and to establish the time required to grow a biofilm in the support. And finally to compare the COD removal and sulfate conversion efficiencies obtained in the UASB and DFFB reactor. The UASB reactor showed a gradual increase in the COD percentage used for sulfate reduction from 37.2 to 86.7%, and sulfate conversion efficiency from 29.5 to 77.7%. The DFFB reactor was operated during 46 days in batch and in continuous during 85 days. The support was fluidized by recirculation of the effluent and the minimum fluidization rate of the liquid was 13.9 m/h, with a bed expansion of 25% of the volume of the reactor. After 90 days of reactor operation most of the support surface was covered with microorganisms, which indicated that a biofilm was entirely formed. The hydrodynamic factors contributed to the loss of biomass that was not completely adhered to the support and the formation of a strong biofilm. When the DFFB reactor was operated in continuous mode the sulfate conversion efficiency increased from 3.9 to 28.1% and the COD percentage used for sulfate reduction increased from 6.1 to 47.1%. These results suggested an immobilization of incomplete-oxidizing sulfate reducing bacteria reflected in the acetate accumulation in the reactor and during the determination of the specific activities. The high values of sulfate reducing activity obtained with ethanol and lactate (11.7 and 15.3 d DQO/g SSV-d respectively) throughout the reactor operation indicated that mainly sulfate reducing microbial population was adhered to the support due to a selection pressure in the biomass. When the collected data of both reactors was analyzed, it was observed that the UASB reactor took more than 100 days for an increase in the total dissolved sulfide production from 46 mg/L to 200 mg/L, whereas in the DFFB reactor it took only 60 days of operation. The reactors showed considerable differences with respect to COD removal and sulfate conversion efficiencies due to the ethanol:lactate ratio in the influent and the amount of biomass present in the reactors.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran variedad de efluentes industriales que contienen importantes concentraciones de sulfato. Un ejemplo de estos son los drenajes ácidos de minas (DAM), los cuales son aguas residuales ácidas y con alto contenido de metales, generados por la oxidación de sulfuros metálicos a sulfatos por bacterias del género *Thiobacillus* en minas que operan activamente y abandonadas (Tabak *et al.*, 2003).

El tratamiento de DAM por el proceso biológico de sulfatorreducción es una alternativa prometedora en comparación con los métodos químicos. Las bacterias sulfatorreductoras (BSR) reducen el sulfato a sulfuro de hidrógeno en presencia de un donador de electrones o hidrógeno. Los beneficios de los procesos biológicos sulfatorreductores comparados con los tratamientos químicos tradicionales son: la remoción de metales solubles en forma de sulfuros metálicos insolubles, sulfatos, acidez, y la producción de menores cantidades de lodos y productos de baja solubilidad cuando se comparan con otros tratamientos (Kaksonen *et al.*, 2003).

Se ha estudiado la sulfatorreducción en varios diseños de reactores tales como el reactor de tanque agitado, 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 lecho fluidificado los microorganismos forman una biopelícula sobre partículas de un material inerte y se obtiene una mayor retención de biomasa debido a la gran área superficial específica de las partículas que funcionan como soporte (Celis-García *et al.*, 2004). Uno de los aspectos más importantes de los reactores de lecho fluidificado es la formación de la biopelícula, ya que la composición del afluente y la velocidad superficial del líquido son

determinantes para la diversidad en el consorcio microbiano de la biopelícula, la concentración de la biomasa y consecuentemente, la densidad y grosor (Castilla *et al.*, 2000).

Los reactores de lecho fluidificado inverso (LFI) utilizan soportes con densidades menores que las del agua, tales como polietileno, polipropileno, poliestireno, por lo que el lecho se expande hacia abajo debido al flujo descendente del líquido.

Se ha reportado la inmovilización de bacterias anaerobias en reactores LFI (González *et al.*, 1992; Meraz *et al.*, 1995; Castilla *et al.*, 2000; Celis-García *et al.*, 2004) para diversos tipos de afluentes y se ha precisado que la formación de una biopelícula estable y activa es necesaria para una alta capacidad de conversión de contaminantes.

En el presente trabajo se estudió la sulfatorreducción en dos reactores anaerobios de alta tasa, uno UASB y el otro LFI. Los objetivos particulares al operar el reactor UASB fueron la activación y el desarrollo de biomasa predominantemente sulfatorreductora y el estudio de las eficiencias de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) y de conversión de sulfato bajo condiciones de sulfatorreducción. Los objetivos particulares en la operación del reactor LFI fueron determinar el tiempo que requería la biomasa en adherirse al soporte y la evolución de la actividad sulfatorreductora en la biopelícula, entender el efecto que tiene la velocidad de recirculación del líquido y la expansión del lecho sobre el proceso sulfatorreductor y comparar las eficiencias de remoción de la DQO y de conversión de sulfatos obtenidas en el reactor UASB con las del reactor LFI.

Este trabajo se encuentra inmerso en el marco de un proyecto que se enfoca al desarrollo de un proceso biológico de sulfatorreducción para el tratamiento de DAM basado en un reactor LFI para llevar a cabo en una sola etapa, el proceso de sulfatorreducción y precipitación de sulfuros metálicos insolubles.

2. ANTECEDENTES

En la actualidad existe una gran variedad de efluentes industriales que contienen altas concentraciones de sulfato, tales como los generados por la industria de pulpa y papel (1 -2 g/L), las fábricas de curtido de pieles (alrededor de 2 g/L), las plantas de fermentación alcohólica (2.9 - 6 g/L) y de producción de ácido cítrico (2.4 -4.5 g/L), entre otras. Todos estos efluentes tienen en común la presencia de sustratos orgánicos en concentraciones variables, con relaciones entre el contenido en materia orgánica, expresada como DQO, y la concentración de sulfato (relación DQO/SO_4^{2-}) comprendidas entre 17 y 1. Hay un segundo grupo de efluentes con altas concentraciones de sulfato pero que sin embargo no presentan un contenido significativo de materia orgánica, teniendo por tanto una relación DQO/SO_4^{2-} muy baja, normalmente por debajo de 1. En este grupo se encuentran los efluentes de lavado y lixiviado de numerosas explotaciones mineras, efluentes de la producción de ácido sulfúrico y corrientes líquidas procedentes del lavado de gases ácidos (Omil *et al.*, 1997b).

Los DAM son un problema severo de contaminación atribuido a las actividades mineras. Los DAM son aguas residuales ácidas y con alto contenido de metales disueltos generados por la oxidación de sulfuros metálicos a sulfatos por bacterias del género *Thiobacillus* en minas que operan activamente y abandonadas. La exposición de dichos desechos de mina con el agua y el aire da como resultado una serie de reacciones de oxidación químicas y biológicas que producen un efluente altamente ácido que contiene altas cantidades de sulfatos y metales tales como arsénico, cadmio, hierro, plomo, zinc y cobre (Tabak, 2003). Muchos autores describen como aguas ácidas de mina a los drenados con un pH comprendido entre 2 y 4, y altos contenidos de metales disueltos por ejemplo de 0.01 a 1465 mg/L de hierro (Alcaraz, 2004). En relación a los DAM existen informes sobre la

mortandad de peces y crustáceos de ríos, afecciones al ganado, y destrucción de cultivos y riberas; siempre asociado a una coloración ocre-amarillenta de los lechos de ríos y lagos afectados, y un incremento de la turbiedad de las aguas. La contaminación que producen los drenados ácidos de mina ha sido ampliamente descrita por numerosos investigadores (Nordstrom y Alpers, 1999; Pamo *et al.*, 2002).

Nordstrom y Alpers (1999) describen el proceso de oxidación de la pirita como el principal responsable de la formación de aguas ácidas; esta oxidación se ve favorecida en áreas mineras debido a la facilidad con la que el aire entra en contacto con los sulfuros a través de las labores mineras de acceso y por los poros existentes en las pilas y residuos así como al incremento de la superficie de contacto de las partículas.

Se han utilizado varios tratamientos físicos, químicos y biológicos para evitar la formación de DAM o, donde esto no es factible, remediar las aguas afectadas.

2.1 Alternativas de tratamiento

El objetivo principal en todas las alternativas de tratamiento es la neutralización de la acidez, la precipitación de los metales pesados y la eliminación de los sólidos en suspensión. Para ello se actúa cambiando las condiciones de pH del afluente de forma que se favorezca la formación de especies insolubles que precipiten y retengan la carga contaminante (Tabak *et al.*, 2003).

2.1.1 Tratamientos físico-químicos

El método más usado para remediar los DAM es el proceso de aereación y la adición de un químico neutralizante, generalmente descrito como tratamiento activo. Se deben utilizar diferentes agentes neutralizantes, tales como el óxido de

calcio, carbonato de calcio e hidróxido de sodio. El principal objetivo es acelerar la oxidación y precipitar los metales en forma de hidróxidos y carbonatos (Johnson, 2000). Sin embargo, estos tratamientos tienen algunas desventajas como son los altos costos de mantenimiento y de operación además de que se producen grandes cantidades de lodos los cuales requieren un tratamiento posterior y disposición como residuo peligroso (Kaksonen *et al.*, 2003).

2.1.2 Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos inocuos. Esta estrategia biológica depende de las actividades metabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de carbono y/o energía (Metcalf y Eddy, 2003).

Existen varios procesos biológicos que generan alcalinidad y que por lo tanto tienen el potencial de usarse para remediar los DAM. Estos incluyen fotosíntesis, amonificación, y varios procesos reductores tales como la reducción del hierro y sulfato. Los métodos de tratamiento biológico más utilizados son los humedales artificiales (aerobios o anaerobios) y los reactores biológicos (Johnson, 2000).

Los reactores biológicos sulfatorreductores se han vuelto una alternativa para el tratamiento de aguas residuales provenientes de procesos mineros en comparación con los tratamientos químicos. Los reactores biológicos que tratan contaminantes azufrados se basan principalmente en la retención dentro del reactor de una microbiota específica que participa en el ciclo del azufre para llevar a cabo la conversión deseada. Hasta el momento, la mayoría de los reactores sulfatorreductores utilizan células bacterianas inmovilizadas en gránulos (no

requieren material de soporte) o en biopelículas (células adheridas a materiales inertes) (Lens *et al.*, 2000).

Muchas de las aplicaciones de los biorreactores utilizadas para el tratamiento de DAM constan de procesos unitarios para la reducción de sulfatos y la precipitación de metales en unidades separadas. Esto elimina problemas asociados a la toxicidad por metales, pero incrementa el capital de inversión y los costos de operación (Kaksonen *et al.*, 2004).

2.2 Proceso biológico de sulfatorreducción

Las bacterias sulfatorreductoras (BSR) son anaerobias estrictas, que tienen la habilidad de usar el sulfato como aceptor final de electrones para la oxidación de hidrógeno y de varios compuestos orgánicos. Dentro de las BSR se pueden distinguir dos grandes grupos metabólicos: Grupo a) que comprende especies que oxidan sus sustratos incompletamente siendo acetato y ácido sulfhídrico los productos finales (ej. *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium*) (Schauder *et al.*, 1986) y el Grupo b) en donde se encuentran las bacterias sulfatorreductoras que, en principio, son capaces de oxidar completamente los sustratos orgánicos incluyendo el acetato produciendo CO₂ y H₂S como productos finales (ej. *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium*). También puede ocurrir la oxidación de acetato por bacterias sulfatorreductoras utilizadoras de acetato y oxidación de hidrógeno molecular por BSR hidrogenotróficas (Widdel, 1988).

Las BSR que oxidan incompletamente sus sustratos pueden crecer significativamente más rápido que las BSR que oxidan completamente los sustratos. Bajo condiciones óptimas, las especies de *Desulfovibrio* que utilizan hidrógeno, lactato o piruvato pueden alcanzar tiempos de duplicación de 3 a 4 horas. Por lo tanto, en cultivos en lote enriquecidos con donadores de electrones

que puedan ser usados por las BSR que oxidan incompleta y completamente los substratos se obtiene un cultivo rico en BSR que oxidan incompletamente la fuente de carbono (Widdel, 1988).

Para el tratamiento de aguas con bajo o nulo contenido de materia orgánica, la elección de un donador de electrones es un punto importante a considerar. Es posible el crecimiento de las BSR tanto de manera autótrofa como heterótrofa con hidrógeno o formato. Otros compuestos que pueden ser degradados de manera completa o incompleta por las BSR son los ácidos grasos de cadena ramificada y de cadena larga, etanol y otros alcoholes, ácidos orgánicos (lactato, succinato, malato) y compuestos aromáticos como benzoato, catecol, fenol y anilina. Incluso compuestos sin un grupo funcional tales como el tolueno y los alcanos pueden ser degradados por las BSR (Oude Elferink *et al.*, 1994). Algunas de las reacciones que son llevadas a cabo por las BSR son listadas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Reacciones de sulfatorreducción involucradas en la degradación de materia orgánica (Oude Elferink *et al.*, 1994).

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

2.3 Competencia entre BSR y microorganismos metanógenos

La degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso complejo llevado a cabo por múltiples poblaciones microbianas interactuando en sintrofia.

De forma general, la aplicación de un proceso anaerobio con concentraciones mínimas de sulfato en el afluente causa la coexistencia de las BSR con los microorganismos metanógenos, estableciéndose una situación de competencia entre ambos grupos microbianos por los sustratos orgánicos disponibles, especialmente por los compuestos intermedios más comunes en el proceso anaerobio, tales como acetato, hidrógeno y otros ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta como propionato y butirato (Omil *et al.*, 1997b). Como se muestra en la Figura 2.1 las bacterias acidogénicas y los microorganismos metanógenos se encuentran en competencia con las BSR por los sustratos disponibles. El resultado de esta competencia es importante porque determinará en parte hasta donde el sulfuro y el metano, los productos finales de ambos procesos de mineralización, serán producidos.

La relación DQO/SO_4^{2-} es un parámetro importante que define la existencia de la competencia de las BSR con los microorganismos metanógenos. La relación de estequiometría de las reacciones de sulfatorreducción indican que por encima de un valor de 0.67 hay un exceso de materia orgánica, por lo que coexistirán la metanogénesis y la sulfatorreducción (Omil *et al.*, 1997b). Estudios anteriores han comprobado que se puede desarrollar una biomasa con actividad completamente sulfatorreductora si se opera con relaciones DQO/SO_4^{2-} menores a 0.67 (Omil *et al.*, 1997a; Harada *et al.*, 1994). Algo interesante de esta relación es que cuando se opera a relaciones de DQO/SO_4^{2-} menores a 0.67 también se presenta la competencia entre los diferentes grupos de bacterias sulfatorreductoras (Visser *et al.*, 1993). Generalmente, el resultado de la competencia es determinado por las bases termodinámicas y cinéticas de la sulfatorreducción y la metanogénesis. Las

constantes de afinidad (K_s) por el sustrato se encuentran alrededor de 32.8 mg acetato/L para las metanógenas y 9.3 mg acetato/L para las BSR (Rittman y McCarty, 2001). Estas bases teóricas predicen que se puede esperar que las BSR predominen sobre los microorganismos metanógenos (Rinzema y Lettinga, 1988). Sin embargo, se ha encontrado que la competencia entre las BSR y las metanógenas también es influenciada por otros factores tales como la duración del experimento, el tipo de lodo inoculado, la capacidad de adhesión de las bacterias, la concentración de materia orgánica y sulfato, el pH del reactor y la temperatura (Lens *et al.*, 2000; Oude Elferink *et al.*, 1994).

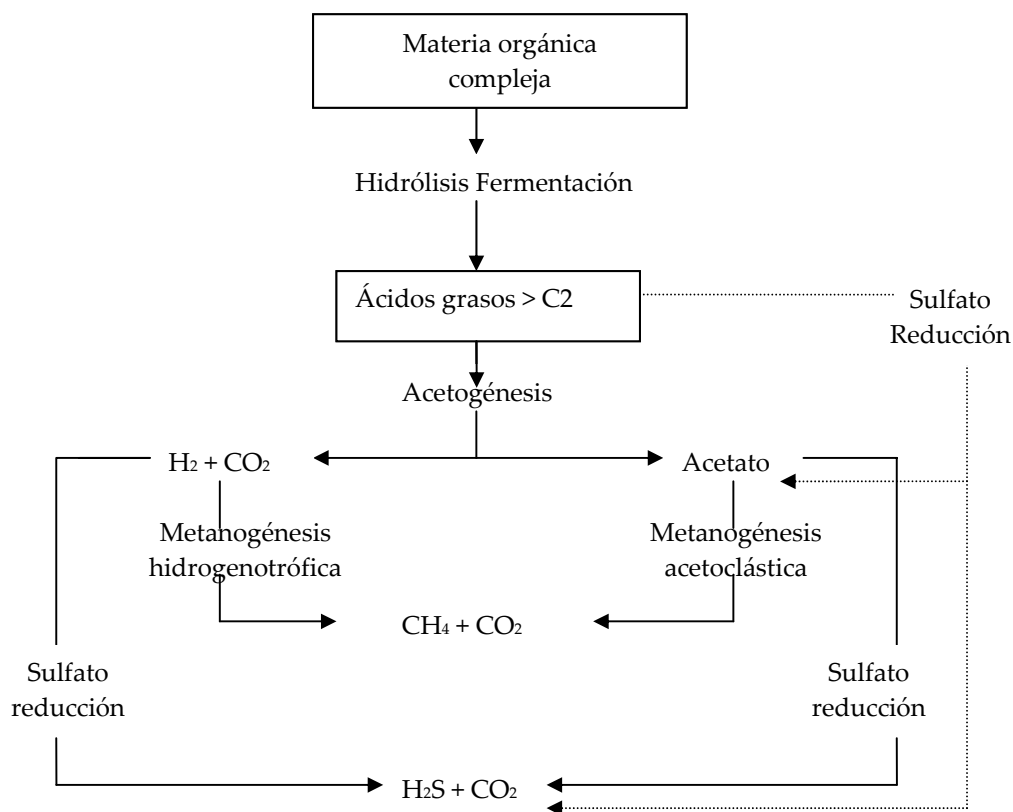


Figura 2.1. Proceso de digestión anaerobia de materia orgánica por BSR, microorganismos metanógenos y acetogénicos (Johnson, 2000).

Con respecto a la duración del experimento, Harada *et al.*, (1994) estudiaron la competencia entre BSR y metanógenos en un reactor UASB, alimentado con desechos complejos a diferentes concentraciones de sulfato, y encontraron que las BSR presentaron una competencia por acetato pobre en comparación con los microorganismos metanógenos cuando la duración del experimento es menor a 100 días. Sin embargo, a largo plazo, las BSR desplazan gradualmente a los microorganismos metanógenos debido a su gran afinidad por dicho sustrato y a sus altas velocidades de remoción de sustrato. Visser *et al.* (1993) y Omil *et al.* (1997a), coinciden con esto ya que estudiaron la competencia a largo plazo de las metanógenos acetoclásticos y las BSR utilizadoras de acetato en reactores UASB operando con exceso de sulfato y encontraron que se requirieron más de 200 días para que las BSR utilizadoras de acetato pudieran desplazar a las metanógenas como organismos predominantes acetotróficos. En el estudio de Omil *et al.* (1997a) se observó también la importancia del tipo de lodo inoculado, ya que se usó un lodo granular con bajo número de BSR utilizadoras de acetato, reflejado por la ausencia de actividad sulfatorreductora, por lo que se requirieron más de 50 días para que se pudiera detectar degradación del acetato por sulfatorreducción.

La competencia entre diferentes bacterias está también determinada por la capacidad de inmovilización de los microorganismos; en el caso de lodos granulares y biopelículas las bacterias que presentan poca adhesión son lavadas del reactor (Oude Elferink *et al.*, 1994). A este respecto, Celis-García *et al.* (2004) reportaron que la tolerancia al sulfuro de las BSR y metanógenas dependía del tipo de consorcio formado por las bacterias, encontraron que en las biopelículas había una mayor tolerancia que en los lodos granulares. Esto puede ser atribuido a la adherencia selectiva de las BSR en soportes inertes para la formación de la biopelícula (Visser *et al.*, 1996). También encontraron que las biopelículas tienen una mayor actividad sulfatorreductora y metanogénica, en comparación con los

lodos granulares, debido a la presión de selección en sistema biopelícula causando un mejor desarrollo de la BSR. En contraste, otros estudios sugieren una mayor capacidad de inmovilización de los microorganismos metanógenos con respecto a las BSR en biopelículas debido a un lavado selectivo y afinidades por el sustrato (Isa *et al.*, 1986; Yoda *et al.*, 1987; Visser *et al.*, 1993). Uno de los factores que promueven esta capacidad de inmovilización de los microorganismos metanógenos es la velocidad ascensional del líquido, ya que modifica el mezclado en el reactor y por lo tanto el acceso a los sustratos presentes. Omil *et al.* (1996) observaron un incremento en la actividad metanogénica después de imponer velocidades ascensionales del líquido mayores a 4 m/h, en un reactor UASB, debido a una mayor capacidad de adherencia de los microorganismos metanógenos acetotróficos al lodo granular que la de las BSR que utilizan acetato.

Uno de los factores ambientales más importantes en la competencia entre BSR y metanógenas es el pH. El efecto del pH en la competencia de las BSR con los microorganismos metanógenos está directamente relacionado con el rango óptimo de crecimiento, que para las BSR está entre un pH de 6 y 9 (Zehnder *et al.*, 1982) y para los metanógenos entre 6.5 y 7.6 (Rittman y McCarty 2001), y con la concentración de sulfuro disuelto en forma no ionizada (Oude Elferink *et al.*, 1994). Estudios efectuados en botellas serológicas con lodo granular sulfatorreductor obtenido de reactores UASB indicaron que a un pH menor a 7 los microorganismos metanógenos tienen mejores propiedades de crecimiento que las BSR y por lo tanto se espera que los metanógenos predominen en vez de las BSR, las cuales tienen mayores velocidades de crecimiento a un pH mayor a 7.5 (Visser *et al.*, 1996; O'Flaherty *et al.*, 1998). Visser *et al.*, (1996) reportaron que la variación del pH de 8 a 7 causó un decremento en la producción de metano debido a la concentración de sulfuro libre en el medio, estudiado en un lodo granular de un reactor UASB. Al respecto existen varios reportes que indican una mayor sensibilidad de los

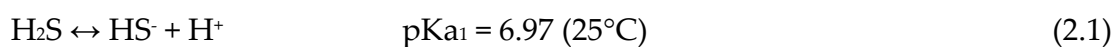
microorganismos metanógenos hacia el sulfuro que las BSR (Celis-García *et al.*, 2004; Visser *et al.*, 1996; Omil *et al.*, 1996; Omil *et al.*, 1997a; O'Flaherty *et al.*, 1998).

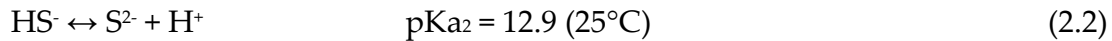
Entre las estrategias utilizadas para canalizar los equivalentes reductores hacia las BSR se encuentra la habilidad de competencia de éstas por el sustrato disponible y la sensibilidad de las otras bacterias por el sulfuro (Lens *et al.*, 2000). Así mismo, otro factor ambiental importante en la competencia de las BSR y las metanógenas es la temperatura. Existen estudios que indican que las metanógenas son más sensibles al incremento de la temperatura que las BSR. Rintala y Lettinga (1992) mostraron que el acetato fue convertido por las metanógenas cuando un reactor se operaba a 37°C aún a altas concentraciones de sulfato, mientras que el acetato fue principalmente degradado por las BSR cuando el reactor fue operado a 55° C utilizando un inóculo mesofílico.

2.4 Toxicidad por sulfuros

Los principales problemas relacionados al proceso de sulfatorreducción provienen de la generación de sulfuro de hidrógeno, compuesto corrosivo y característico por su mal olor. Además, el sulfuro de hidrógeno es un compuesto tóxico para casi cualquier bacteria anaerobia, toxicidad que se considera, por lo general, directamente relacionada con la concentración de sulfuro de hidrógeno libre, H₂S (Rinzema y Lettinga, 1988).

Se asume generalmente que la forma no disociada del sulfuro es la principal forma tóxica debido a que solo una molécula neutra puede penetrar la membrana celular (Oude Elferink *et al.*, 1994). La concentración de sulfuro no disociado depende del equilibrio químico:





Conforme el primer valor de pKa de sulfuro de hidrógeno se acerca a 7, pequeñas variaciones en el intervalo de pH de 6 - 8 afectarán significativamente la concentración de H₂S no disociada (Oude Elferink *et al.*, 1994; Kaksonen *et al.*, 2004).

Es difícil obtener de la literatura una mayor comprensión acerca de la toxicidad del sulfuro en las poblaciones sulfatorreductoras, ya que no siempre es considerado el efecto del pH en los diseños experimentales. Varios estudios han citado el efecto del sulfuro en el crecimiento de las BSR, la utilización del substrato o la reducción del sulfato, y estos no siempre son correlacionados.

Visser *et al.* (1996) encontraron que la naturaleza de la toxicidad del sulfuro depende de la forma que tiene la biomasa y del pH. Los autores reportaron que por arriba de un pH de 7 la inhibición de la actividad sulfatorreductora por sulfuros en lodo granular era causada por la concentración de sulfuro total y el 50% de inhibición para concentraciones de H₂S estaba entre 90 y 250 mg S/L a valores de pH de 7.8 - 8 y 6.4 - 7.2 respectivamente, mientras que en lodos suspendidos la concentración de H₂S no disociado determina la toxicidad a valores de pH tanto altos como bajos y el 50% de inhibición se presenta a concentraciones de H₂S entre 50 y 130 mg/L. Entre un pH de 6.8 y 7.2, O'Flaherty *et al.* (1998) encontraron que la inhibición por sulfuro sobre varias especies de bacterias sintróficas y sulfatorreductoras así como microorganismos metanógenos estaba relacionada con el sulfuro no ionizado, mientras que a un pH mayor a 7.2 la inhibición estuvo más relacionada con la concentración de sulfuro disuelto.

Los resultados de inhibición obtenidos con lodo granular o suspendido no son aplicables directamente en sistemas de biopelículas tales como los reactores de lecho fluidificado (FBR por sus siglas en inglés). Kaksonen *et al.*, (2004) estudiaron

el efecto tóxico del sulfuro en un proceso sulfatorreductor de biopelícula utilizando etanol y acetato como sustratos; demostraron que la inhibición por sulfuro en el crecimiento era 50% más baja en las biopelículas que en los lodos anaerobios y 50% más baja también para el estudio con acetato comparado con lodos granulares de un reactor UASB en un ensayo en lote. Recientemente Celis-García *et al.* (2004), reportaron que las BSR en un sistema de biopelícula mostraron mayor tolerancia al sulfuro (860 mg S/L) que las BSR en un lodo granular. En la Tabla 2.2 se muestran los valores obtenidos por efectos de inhibición reportados por diversos autores.

Tabla 2.2. Efectos inhibitorios del sulfuro disuelto total (SD) y no disociado H₂S en el crecimiento y la utilización de sustrato de las BSR que utilizan acetato y etanol. Modificada de Kaksonen *et al.*, (2004).

Sustrato	Biomasa	Tipo de experimento	T (°C)	pH	SD (mg S/L)	H ₂ S (mg S/L)	Inhibición (%)	Referencia
Etanol	Lodo anaerobio	Botella serológica en lote	37	6.8	500-561	262-294	50 ^a	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
				7.2	788-880	241-269		
				7.6	878-990	131-147		
				8	1019-1130	66-74		
				8.5	1004-1164	22-25		
Etanol	<i>Desulfococcus multivorans</i>	Botella serológica en lote	37	6.8	498	261	50 ^a	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
				7.2	851	250		
				7.6	1383	206		
				8	1488	97		
				8.5	1570	34		
Etanol	Lodo de reactor UASB	UASB en continuo	35	7.1-8	1700-9951	570-610	100 ^b	Kalyuznyi <i>et al.</i> , 1997
Etanol	Cultivo mixto de BSR en FBR	FBR en continuo	35	6.9-7.3	248	84	K _i ^c	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004

Tabla 2.2. (Continuación).

Sustrato	Biomasa	Tipo de experimento	T (°C)	pH	SD (mg S/L)	H ₂ S (mg S/L)	Inhibición (%)	Referencia
	Lodo de reactor							Visser <i>et al.</i> , 1996
Acetato	UASB	UASB en lote	30	7	521	217	50 ^a	
				7.5	569	107		
				8	921	64		
				9	943	7		
	<i>Desulfonema magnum</i> , <i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> o <i>Desulfobacter postgatei</i>	Botella serológica en continuo	30-37	6.8	443-583	233-306	50 ^a	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
Acetato				7.2	671-926	205-283		
				7.6	660-1360	98-203		
				8	659-1500	43-98		
				8.5	708-1450	15-31		

Tabla 2.2. (Continuación).

Sustrato	Biomasa	Tipo de experimento	T (°C)	pH	SD (mg S/L)	H ₂ S (mg S/L)	Inhibición (%)	Referencia
Acetato	Lodo anaerobio	Botella serológica en lote	37	6.8	374	196	50 ^a	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
				7.2	550	168		
				7.6	867	129		
				8	990	65		
				8.5	1011	22		
Acetato	Lodo de reactor UASB	Botella serológica en lote	35	7	699	270	50 ^b	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1999
8.1-8.3	1125	54						
Acetato	Cultivo mixto de BSR	Botella serológica en lote			35	8	K _i ^c	Maillacheruvu y Parkin 1996
Acetato	BSR en FBR	FBR en continuo	35	6.9-7.3	356	124	K _i ^c	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004
Acetato/ Propionato	Cultivo mixto anaerobio	Botella serológica en lote	35	7.5	860		50 ^b	Celis-García <i>et al.</i> , 2004

a: Inhibición de crecimiento, b: Inhibición de la actividad sulfatorreductora, c: Inhibición de la actividad de utilización de sustrato

2.5 La sulfatorreducción para la precipitación de metales

El proceso biológico de la sulfatorreducción está basado en la producción de sulfuros por las BSR seguido de la precipitación del sulfuro metálico y la neutralización del agua debido a la alcalinidad producida por la oxidación microbiana del donador de electrones (Christensen *et al.*, 1996).



dónde CH_2O es el donador de electrones



dónde M^{2+} = metal



Las ventajas potenciales de la precipitación biológica de sulfuros metálicos incluyen la baja producción de lodo y productos de baja solubilidad comparados con la precipitación con hidróxidos (método fisicoquímico). Además, también se pueden recuperar los metales con valor económico de los sulfuros metálicos precipitados (Kaksonen *et al.*, 2003).

2.6 Biorreactores anaerobios para el proceso de sulfatorreducción

Los biorreactores que se utilizan para tratar contaminantes ricos en sulfatos generalmente son de alta retención y concentración de biomasa y la mayoría utilizan biomasa inmovilizada en gránulos o biopelículas. El principio de los reactores anaerobios de alta tasa está basado en la habilidad de las bacterias

anaerobias de inmovilizarse en lodos granulares o en partículas sólidas (Oude Eleferink *et al.*, 1994).

Una biopelícula se define como una estructura compleja de células y productos celulares como polímeros extracelulares, los cuales tienen formas alargadas o de gránulos densos (Lettinga *et al.*, 1980) aunque también crecen unidos a una superficie estática sólida (biopelículas estáticas) o sobre acarreadores suspendidos (biopelículas soportadas) (Nicoletta *et al.*, 2000). El lodo granular metanogénico y sulfatorreductor consiste de agregados microbianos con alta sedimentabilidad que se desarrollan por las uniones mutualistas de células bacterianas en la ausencia de un material acarreador (Lettinga, 1995). El desarrollo de la biopelícula es influenciado por varios procesos, incluyendo adsorción y desorción de microorganismos hacia y desde la superficie sólida, la adhesión de los microorganismos a la superficie, el crecimiento de la biopelícula y el desprendimiento de ésta (Characklis *et al.*, 1990). En estado estacionario, el balance entre el crecimiento de la biopelícula y la pérdida de ésta determina su estructura física, y por consecuencia las características de sedimentación y/o de fluidificación.

El diseño exitoso y operación de los reactores de biopelícula se basa en la información de las características de sedimentación y fluidificación de las partículas utilizadas como soporte, tales como la expansión o fluidificación del lecho como función de la velocidad superficial del líquido. La información acerca de la velocidad superficial del líquido es muy importante, ya que establece el tiempo de retención de los sólidos y el área específica de la biopelícula en la zona biológicamente activa (Nicoletta *et al.*, 2000).

La fuerza cortante hidrodinámica es un factor importante en la formación de biopelículas estables. En un reactor con una alta fuerza cortante hidrodinámica da se tiene como resultado una biopelícula más resistente, en cambio una baja fuerza cortante produce una estructura de biopelícula que tiende a ser heterogénea,

porosa y débil. También es importante enfatizar que la hidrofobicidad de la superficie bacteriana juega un papel crucial durante los fenómenos iniciales de formación de la biopelícula y de los lodos granulares. Las condiciones hidrodinámicas asociadas a la estructura de la biopelícula influyen la eficiencia de difusión del sustrato y la selección ecológica de dichas estructuras.

Otro fenómeno importante asociado a la fuerza cortante es la sobreproducción de exopolímeros extracelulares, los cuales pueden regular la cohesión y adhesión de las células y juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la matriz de la biopelícula (Liu y Tay, 2002).

Un problema con los reactores de biopelícula es que ésta tiende a cambiar en densidad, grosor y forma durante la operación. El mayor resultado de este cambio es que la transferencia de masa, las características hidrodinámicas y de reacción del lecho se alteran con el tiempo (Nicolella *et al.*, 2000). Las biopelículas proveen tiempos de retención de biomasa más largos que los que se tienen con el lodo granular, pero tienen desventajas de operación debidas al tiempo requerido para desarrollar la biopelícula, a pesar de la tendencia natural de las células a adherirse a superficies (Castilla *et al.*, 2000).

También se ha estudiado la sulfatorreducción y precipitación de metales en varios tipos de reactores tales como el reactor de tanque agitado, procesos anaerobios de contacto, UASB, EGSB y de lecho fluidificado. Muchos de los parámetros de diseño, tales como la velocidad óptima de recirculación, la composición y destino de los metales precipitados, producción de biomasa y su destino, o fallas del proceso causados por sobrecarga y posterior recuperación permanecen en gran parte sin ser examinados (Kaksonen *et al.*, 2002). Para el proceso sulfatorreductor se han utilizado diferentes tipos de reactores los cuales se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Condiciones de operación, eficiencias de remoción de sulfato y grado de reducción de sulfato en la digestión anaerobia de aguas residuales ricas en sulfato en varios tipos de reactores. Modificada de Lens *et al.*, 1998.

Reactor	Afluente		Remoción de sulfato		Referencia	
	Tipo	DQO (g/L)	SO ₄ ⁻² (g/L)	% reducción SO ₄ ⁻² % DQO _{BSR}		
CSTR	Melazas	40.90	4.2-5.1	38-71	3.0-8.0	Hilton y Archer, 1988
UASB	Ac	1.5-2.1	0.7-3.4	70	50-90	Visser <i>et al.</i> , 1993
UASB	Etanol	1.2	0.84	85	nr	Kalyuznyi <i>et al.</i> , 1997
UASB	Lac	0.65	2.45	80	nr	Kaksonen <i>et al.</i> , 2003
EGSB	Ac/Prop/But	0.5-2.5	1.2-4.6	27-68	59-97	Omil <i>et al.</i> , 1996
USSB	Ac/Prop/But	0.5-6.0	1.0-12.0	35	67-81	Lens <i>et al.</i> , 1998
FA	Ac	5.00	0.6-15.0	3.0-38	3.0-7.0	Isa <i>et al.</i> , 1986
FA	Melazas	40.90	0.60	47-100	4.0-11	Hilton y Archer, 1988
FBR	Lac	0.88	1.00	80	nr	Kaksonen <i>et al.</i> , 2003
LFI	Lac/Prop/But	3.5	5.22	73.5	86	Celis-García, 2004

CSTR reactor perfectamente agitado; nr: no reportado; USSB: reactor de lecho de lodo de flujo ascendente en etapas; %DQO_{BSR} porcentaje de DQO consumido por las BSR. Ac:Acetato, Prop:Propionato, But:Butirato, Lac:Lactato.

2.6.1 Reactor UASB

El concepto de reactor UASB fue desarrollado en los años 70 (Lettinga *et al.*, 1980) y se aplica mundialmente para el tratamiento de aguas. La operación de estos reactores se basa en la actividad microbiana de diversos grupos actuando en simbiosis, los cuales se encuentran en forma de gránulos cuya densidad les permite sedimentar y permanecer en el reactor. El efluente pasa a través de un lecho de lodo granular donde se llevan a cabo las reacciones biológicas de oxidación y reducción de la materia orgánica. El líquido es distribuido dentro del tanque y asciende hacia el lecho de lodos anaerobios en donde los microorganismos entran en contacto con los substratos (Lettinga *et al.*, 1983).

Los reactores UASB han sido puestos en práctica para una gran variedad de aguas residuales y de diferentes concentraciones, desde 1500 mg DQO/L, en los efluentes de cervecería, hasta concentraciones mayores a 20,000 mg DQO/L presentes en efluentes de difícil degradación como los efluentes de destilería de alcohol (Harada *et al.*, 1994).

Las ventajas de los reactores UASB comparados con los tratamientos anaerobios tradicionales, por ejemplo los procesos de contacto, son la capacidad de retener altas concentraciones de biomasa a pesar de la velocidad de flujo ascendente del afluente y de la producción de biogás. Como consecuencia, el reactor puede operar a tiempos de retención hidráulico (TRH) cortos ya que el tiempo de retención de sólidos es independiente de éste. La operación exitosa bajo estas condiciones requiere una biomasa con una buena capacidad de sedimentación y mineralización.

Las principales características de los reactores UASB son: 1) el lecho de lodo granular, 2) el separador gas-líquido-sólido y 3) el sistema de distribución del afluente. El afluente es bombeado por el fondo del reactor y pasa a través del lecho de lodo granular. Aquí, los compuestos orgánicos son degradados biológicamente

y se produce biogás. El biogás y el líquido son separados en el separador gas-líquido-sólido al igual que los gránulos que sean arrastrados por el biogás, regresando estos al lecho de lodo. El lodo floculento sale del reactor junto con el efluente (Schmidt y Ahring, 1996).

2.6.2 Reactor LFI

Las primeras aplicaciones del reactor LFI en tratamiento de aguas fueron realizadas por Shimodaira y Yushina (1983). A partir de entonces, esta configuración ha sido probada a escala laboratorio tanto para tratamientos aerobios (Nikolov y Karamanev, 1987) como anaerobios (García-Calderón *et al.*, 1998; Castilla *et al.*, 2000; Arnaiz *et al.*, 2003; Celis-García, 2004).

En este tipo de reactores se utilizan partículas de menor densidad que el agua (ej. nylon, poliéster, polietileno, perlita) como soporte. Las partículas son fluidificadas por un flujo descendente del líquido. El flujo del gas (generado por el proceso o suministrado al reactor) y el flujo del líquido, que circula en direcciones opuestas a la fuerza de flotación de las partículas, ayudan a la expansión del lecho (García-Calderón *et al.*, 1998).

En los reactores de lecho fluidificado se alcanza una mayor retención de biomasa gracias a la mayor área específica de las partículas. Además, la fluidificación del reactor proporciona un buen mezclado de la fase líquida haciendo que estos sistemas sean más eficientes y estables para el tratamiento de aguas residuales que reactores como el UASB o filtro anaerobio (FA) (Buffière *et al.*, 1995).

Las principales ventajas de este tipo de reactores son la gran área interfacial biopelícula-líquido, las altas velocidades interfaciales y la mayor transferencia de masa (Atkinson, 1981). Una de las desventajas de estos reactores se encuentra en el periodo de arranque debido al desarrollo de la biopelícula sobre el soporte que

puede variar entre 45 y 100 días (Meraz *et al.*, 1995; Buffière *et al.*, 2000; Castilla *et al.*, 2000). Además de este problema se pueden sumar otros, como el tipo de soporte empleado, procedimientos de inoculación, carga orgánica durante el arranque, etc. (Beristain, 2004).

Estudios previos han indicado que la presión de selección existente en sistemas fluidificados enriquece selectivamente las biopelículas formadas en los soportes con biomasa con alta actividad sulfatorreductora y alta afinidad por el donador de electrones (Kaksonen *et al.*, 2003; Celis-García, 2004), punto crucial para tener una actividad biológica tal que asegure una baja concentración de sulfato y carbono orgánico total en el efluente del sistema.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactores

3.1.1 Reactor UASB

Se utilizó un reactor UASB de vidrio con un volumen de 1.13 L, diámetro interno de 5.4 cm y una relación altura/diámetro de 10.5. Para alimentar el reactor se utilizó una bomba peristáltica marca MasterFlex, el flujo de alimentación fue de 1 mL/min. El biogás se midió por desplazamiento de una solución salina concentrada a un pH de 2.0. La Figura 3.1 muestra un esquema del reactor UASB.

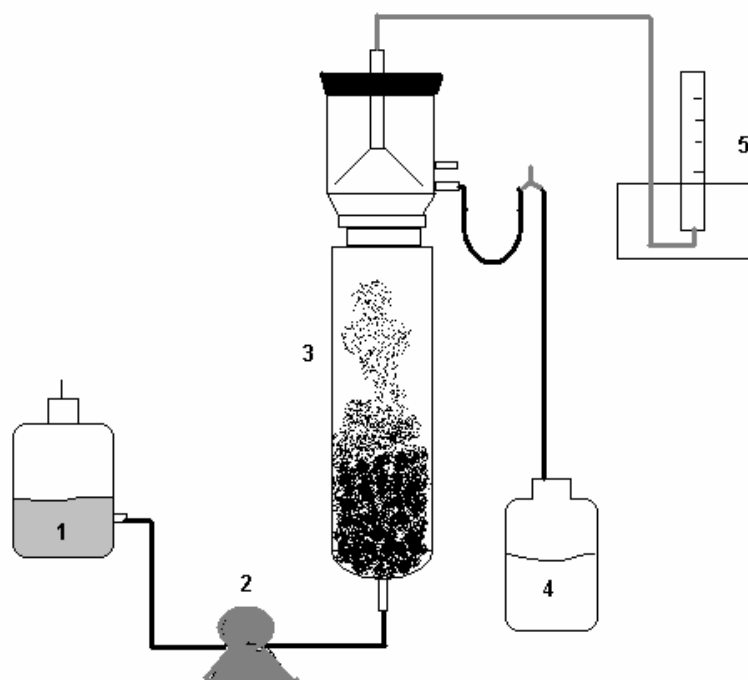


Figura 3.1 Representación esquemática del reactor UASB utilizado. 1. Afluente, 2. Bomba de alimentación, 3. Reactor UASB, 4. Efluente, 5. Columna invertida con solución salina para medición de biogás.

3.1.2 Reactor LFI

Se utilizó un reactor LFI de acrílico de 2.5 L de volumen, 5.5 cm de diámetro interno, 16.7 de relación altura/diámetro y fondo cónico; un separador de fases que también sirve para ajustar el nivel del líquido y un ecualizador de flujo en donde se eliminaban los pulsos de la bomba peristáltica y se obtenía un flujo constante a la entrada del reactor. El reactor fue diseñado y construido en el Laboratorio de Aguas Residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. En la Figura 3.2 se muestra el arreglo experimental del sistema. Se utilizaron bombas peristálticas marca MasterFlex para la alimentación y recirculación del efluente. La entrada del afluente se mezclaba en línea con la recirculación y entraba por la parte superior del reactor, salía por la parte inferior y entraba al separador de fases. Después de pasar por el separador, el flujo se dividía y una fracción pasaba por la bomba de recirculación y la otra salía del sistema constituyendo el efluente. El líquido que pasaba por la bomba de recirculación entraba a un ecualizador y regresaba al reactor.

Como material de soporte se utilizaron 500 mL de partículas finas de polietileno de baja densidad que ocupaban el 15% del reactor (sin expansión), con un diámetro de entre 500 y 1000 μm y densidad aparente de 400 Kg/m^3 en base seca. Las partículas se acondicionaron poniéndolas en un matraz Erlenmeyer de un litro que contenía 500 mL de agua destilada, 0.5 g de peptona de caseína y 0.5 g de extracto de levadura. Las partículas se mantuvieron en agitación por 48 horas mediante un agitador magnético a velocidad media. Una vez acondicionadas, el reactor se llenó con medio mineral y 2.5 g DQO/L de una mezcla de lactato y etanol (3:2 en base a DQO). El soporte de plástico se agregó por la parte superior del reactor.

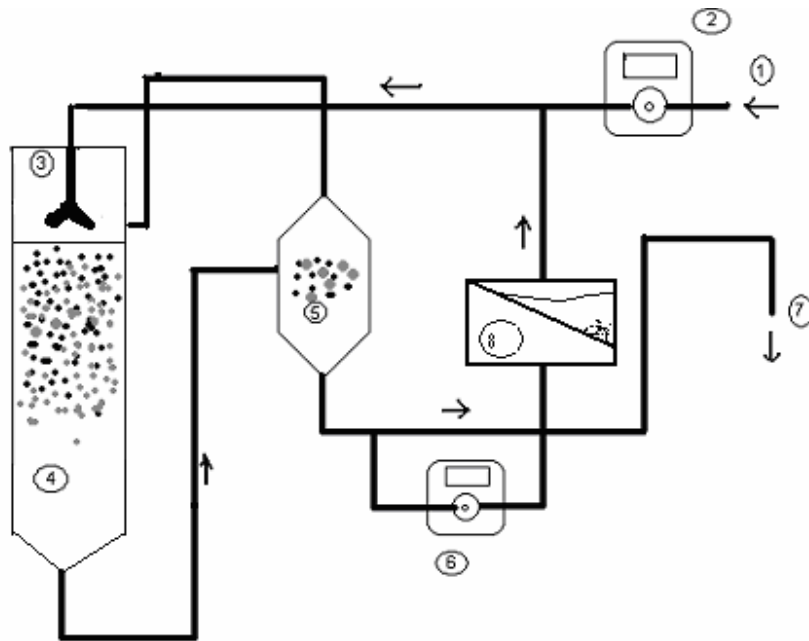


Figura 3.2 Representación esquemática del arreglo del sistema del reactor LFI. (1) Línea de afluente, (2) bomba de alimentación, (3) distribuidor de líquido, (4) reactor LFI de acrílico, (5) separador de fases, (6) bomba de recirculación, (7) línea del efluente y (8) ecualizador de flujo.

3.2 Fuente de biomasa

3.2.1 Inóculo del reactor UASB

El reactor UASB se inoculó con lodo granular sulfatorreductor obtenido de un reactor UASB que trataba sulfatos, proveniente de la industria papelera Eerbeek, de Holanda. El lodo granular contenía 0.11307 g sólidos suspendidos volátiles (SSV) por g lodo en base húmeda. Se inocularon aproximadamente 400 g de lodo en el reactor alcanzando una concentración de 40 g SSV/L. El lodo granular se caracterizó mediante la realización de ensayos de actividades metanogénica acetoclástica y sulfatorreductora.

3.2.2 Inóculo del reactor LFI

El reactor LFI se inoculó con 12 mL de lodo granular sulfatorreductor del reactor UASB equivalentes a 1.15 g SSV cuando este último ya había sido operado bajo condiciones sulfatorreductoras por un período de 100 días. El lodo se disgregó haciéndolo pasar repetidas veces por una jeringa.

3.3 Medios de cultivo

El medio de alimentación para ambos reactores se preparó con una solución mineral con macro- y micronutrientes, fuente de carbono y fuente de sulfato, además se ajustó al pH deseado con bicarbonato de sodio. La composición del medio de cultivo se muestra en la Tabla 3.1 y la composición de la solución de elementos traza se muestra en la Tabla 3.2.

El medio mineral utilizado para las pruebas de actividad metanogénica acetoclástica y sulfatorreductora se presenta en la Tabla 3.3. El medio se ajustó al pH deseado con bicarbonato de sodio.

Tabla 3.1 Composición del medio de cultivo (adaptado de Visser *et al.*, 1993).

Compuesto	mg/L
Extracto de levadura	20
NH ₄ Cl	300
CaCl ₂ *2H ₂ O	15
KH ₂ PO ₄	200
MgCl ₂ *6H ₂ O	120
KCl	250
Solución de elementos traza	1 mL (Véase Tabla 3.2)
Fuente de carbono	Variable según Tabla 3.4 y 3.5
Fuente de Sulfato	Variable según Tabla 3.4 y 3.5

Tabla 3.2 Composición de la solución de elementos traza.

Compuesto	Concentración (g/L)
FeCl ₂ · 4H ₂ O	1.50
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.1
EDTA	0.5
H ₃ BO ₃	0.062
ZnCl ₂	0.07
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.036
AlCl ₃ · 6H ₂ O	0.04
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.024
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.07
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.02
HCl 36%	1.00 mL
Resazurina	0.5

Tabla 3.3 Composición del medio mineral utilizado en la determinación de las actividades específicas.

Compuesto	mg/L
NH ₄ Cl	280
CaCl ₂ · 2H ₂ O	6
KH ₂ PO ₄	600
MgCl ₂ · 6H ₂ O	116
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	703
NaHCO ₃	2000
Extracto de levadura	2
Solución de elementos traza	1 mL

3.4 Condiciones de operación de los reactores

3.4.1 Condiciones de operación del reactor UASB

El reactor UASB se operó bajo cinco diferentes periodos (A – E) los cuales se muestran en la Tabla 3.4. Al inicio (periodos A y B) el reactor se operó a un pH de 7.0 y a partir del día 48 (periodo C) se operó con un pH inicial en el afluente de 6.5. El reactor se operó a temperatura ambiente durante todo el experimento, variando entre 20 y 30° C y con una temperatura promedio de 25° C. Se utilizó lactato como sustrato durante los periodos A – C y durante los periodos D y E se utilizó una mezcla etanol-lactato a diferentes proporciones. La relación DQO/SO₄²⁻ se mantuvo en 0.6 a lo largo de la operación del reactor, mientras que la carga orgánica fue aumentando al modificar las concentraciones de los sustratos en el afluente.

Durante la operación en continuo del reactor se midieron el flujo de alimentación, el pH y la alcalinidad en el reactor. Se realizaron análisis rutinarios de DQO y sulfato en el afluente y efluente del reactor y de sulfuro en el efluente del reactor.

Tabla 3.4. Condiciones de operación del reactor UASB.

Periodo	A	B	C	D	E
Días de operación	1-13	14-47	48-93	94-103	104-135
TRH (d)	1	1	1	0.9	0.9
DQO _{afluente} (g/L)	0.5	1	1.5	2	2.5
Etanol:Lactato (en base a DQO)	0:1	0:1	0:1	1:3	2:3
Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	0.5	1	1.5	2.33	2.77
Carga de sulfato volumétrica (g SO ₄ ²⁻ /L-d)	0.83	1.66	2.5	3.33	4.63

3.4.2 Condiciones de operación del reactor LFI

La operación del reactor LFI se llevó a cabo a un pH a la entrada del reactor de entre 6.0 y 6.5 y a temperatura ambiente (25 - 30° C). La relación DQO/SO₄²⁻ se mantuvo en 0.6 a lo largo de la operación del reactor. El reactor se inoculó con 12 mL de lodo granular proveniente del reactor UASB equivalente a 1.15 g SSV.

Inicialmente, después de inocular el reactor, se operó en lote por un período de 46 días con concentraciones de alimentación similares a las que se tenían en el reactor UASB al final de la operación (período E). Durante la operación en lote el reactor se llenaba con medio mineral fresco con una concentración de 2.5 g DQO/L de etanol y lactato como sustratos en una proporción de 2:3 y se mantenía en recirculación por 48 horas. Al cabo de éste tiempo, se eliminaba el medio agotado y se reponía por medio fresco. Durante esta etapa, cada 15 días aproximadamente, se realizaron determinaciones de los sólidos volátiles inmovilizados (SVI) en el soporte con el fin de determinar la cantidad de biopelícula formada.

Posteriormente, el reactor se operó en continuo bajo tres diferentes periodos (A-C). Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 3.5. La velocidad descendente del líquido fue controlada por el flujo de recirculación del efluente, esto con el fin de mantener una expansión del lecho de entre 25 y 30% con respecto al volumen del reactor.

Los análisis de rutina para el afluente y efluente del reactor fueron: DQO, pH, alcalinidad, sulfuro, sulfato y, después de 66 días de operación del reactor, acetato.

La concentración de sulfato se determinó durante los primeros 81 días de operación del reactor por el método gravimétrico y a partir del día 82 de operación del reactor se utilizó el método turbidimétrico. Adicionalmente se utilizó el método de electroforesis capilar para determinar sulfato a partir del día 55 de operación del

reactor, esto con el fin de corroborar los resultados obtenidos por los dos métodos mencionados anteriormente.

Tabla 3.5. Condiciones de operación en continuo del reactor LFI

Periodo	A	B	C
Días de operación	47-65	66-76	77-131
TRH (días)	2	2	2
DQO _{afuente} (g/L)	1	1	2
Etanol:Lactato (en base a DQO)	1:1	1:0	1:0
Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	0.5	0.5	1
Carga volumétrica de sulfato (g SO ₄ ²⁻ /L-d)	0.83	0.83	1.66
Flujo de recirculación (mL/min)			
(Tasa de recirculación %)	500 (20)	550 (22)	550 (22)
Velocidad superficial (m/h)	12.6	13.9	13.9

La cantidad de sólidos suspendidos volátiles inmovilizados al soporte se cuantificó por gravimetría (APHA, 1998) y se reportó como gramos de sólidos volátiles inmovilizados (SVI) por litro de soporte seco (g SVI/L). La formación de biopelícula se observó por microscopía electrónica de barrido.

3.5 Determinación de la actividad específica metanogénica acetoclástica y sulfatorreductora del lodo granular del reactor UASB y de la biopelícula del reactor LFI

La actividad específica metanogénica acetoclástica se define como la velocidad de producción de metano por el lodo granular a partir de acetato y está expresada en unidades de DQO y referida al contenido de SSV en el lodo por unidad de tiempo (g DQO-CH₄/g SSV-d). De igual forma, la actividad sulfatorreductora se define como la velocidad de producción de sulfuro o la reducción de SO₄²⁻ expresada en

unidades de DQO y referida al contenido de SSV en el lodo por unidad de tiempo (g DQO-H₂S/g SSV-d).

3.5.1 Actividad metanogénica acetoclástica del lodo granular

El experimento se llevó a cabo en botellas serológicas de 70 mL. Cada botella contenía 1.5 g SSV/L de lodo granular, 25 mL de medio mineral (Tabla 3.3) y 1 g DQO/L de acetato a partir de una solución concentrada (67.2 g DQO/L). El pH se ajustó a 7. Las botellas se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio, posteriormente se equilibró la presión con una aguja conectada a una manguera sumergida en agua. Las botellas se incubaron a 30°C con agitación (100 rpm) durante 24 horas. La producción de metano se cuantificó periódicamente por medio del desplazamiento de una solución de NaOH al 3%, el líquido desplazado se colectó en una probeta de 10 mL. Como control se utilizaron botellas serológicas con la misma concentración de SSV, medio de cultivo y sin sustrato. El control se utilizó para corregir la producción de metano endógena. Los experimentos se realizaron por triplicado. La actividad metanogénica se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar la cantidad de metano producido (acumulado) a través del tiempo (en la fase exponencial) y dividida entre la concentración de SSV en la botella utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad metanogénica acetoclástica} = \frac{mCH_4}{V_B \times SSV \times fc} \quad (3.1)$$

dónde:

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

fc = conversión de CH₄ a DQO = 0.35 L CH₄/g DQO a condiciones STP

V_B = volumen del líquido en la botella (L)

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

3.5.2 Actividad sulfatorreductora del lodo granular

Para determinar la actividad sulfatorreductora se usaron botellas serológicas de 160 mL que contenían 1.5 g SSV/L de lodo granular y 160 mL de medio mineral (Tabla 3.3). De esta forma, al no existir una fase gaseosa en la botella, todo el sulfuro producido permaneció en el líquido. La prueba se realizó sin adicionar elementos traza, con el objetivo de que los metales presentes no reaccionaran químicamente con el sulfuro. Las concentraciones de etanol y sulfato adicionadas a cada botella fueron 1 g DQO/L y 1.5 g SO_4^{2-} /L respectivamente, para tener una relación DQO/ SO_4^{2-} de 0.67. El pH se ajustó a 7. Las botellas se mantuvieron a 30°C en agitación a 100 rpm, y se midió periódicamente el sulfuro disuelto total por el método de Cord-Ruwisch (1985). La prueba se realizó sin ningún tipo de inhibición para los metanógenos. Como control se utilizaron botellas serológicas con la misma cantidad de lodo y medio pero sin sustrato ni SO_4^{2-} . Lo anterior para no tomar en cuenta la producción de sulfuro endógeno. Los experimentos se realizaron por triplicado. La actividad sulfatorreductora se calculó con la pendiente obtenida durante la fase exponencial al graficar la concentración de sulfuro disuelto total producido contra el tiempo a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Sulfatorreductora} = \frac{mH_2S}{V_B \times SSV} \quad (3.2)$$

dónde:

mH_2S = pendiente de la producción de sulfuro disuelto total contra el tiempo (g H_2S /L-d)

V_B = volumen del líquido en la botella (L)

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

3.5.3 Actividad metanogénica específica de la biopelícula

La actividad metanogénica acetoclástica para el soporte se realizó por triplicado en botellas serológicas de 60 mL. Cada botella contenía 5 mL de soporte del reactor con biomasa inmovilizada, 40 mL de medio mineral (Tabla 3.3) y 1 g DQO/L de acetato a partir de una solución concentrada (67.2 g DQO/L). El pH se ajustó a 7. Como control se utilizaron botellas serológicas preparadas de la manera descrita. Los pasos subsecuentes del protocolo son similares al descrito previamente en el punto 3.5.1. Al final de cada experimento se determinó la cantidad de SVI en el soporte ($\text{gSVI}/L_{\text{soporte}}$) y se realizaron los cálculos para obtener los datos de actividad.

3.5.4 Actividad sulfatorreductora de la biopelícula

Cada prueba de actividad sulfatorreductora se realizó por triplicado en botellas serológicas de 70 mL. A cada botella se le agregaron 5 mL de soporte del reactor con la biomasa inmovilizada y 65 mL de medio mineral (Tabla 3.3). La actividad sulfatorreductora se determinó con los siguientes sustratos de manera individual: etanol, lactato y acetato. La concentración de sustrato adicionada a cada botella fue de 1 g DQO/L y 1.5 g SO_4^{2-} /L como sulfato de sodio para tener una relación DQO/ SO_4^{2-} de 0.67. El pH se ajustó a 6.5. Como control se utilizaron botellas serológicas preparadas de la manera descrita. Los pasos subsecuentes del protocolo son similares al descrito previamente en el punto 3.5.2. Simultáneamente, también se tomaron muestras de una de las tres botellas usadas en cada prueba para cuantificar la concentración de acetato en un cromatógrafo de gases. Al final de cada experimento se determinó la cantidad de SVI en el soporte ($\text{gSVI}/L_{\text{soporte}}$) y se realizaron los cálculos para obtener los datos de actividad.

3.6 Análisis

3.6.1 Determinación de la DQO

Se utilizó el micro método de reflujo cerrado (APHA, 1998) utilizando 2 mL de muestra previamente centrifugada en una microcentrífuga a 9000 rpm. La muestra se oxidó en ácido sulfúrico con dicromato y sulfato de plata como catalizador a 160° C por 2 horas en tubos de vidrio cerrados. La concentración se determinó espectrofotométricamente a partir de la absorbancia obtenida a 600 nm con la correspondiente curva estándar en un intervalo de 0-1 gDQO/L. El sulfuro presente en las muestras se removió antes de la determinación de DQO burbujeando por 5 minutos aire en el recipiente que contenía la muestra.

3.6.2 Determinación de sulfuro por yodometría

La producción de sulfuros en el reactor se determinó por el método yodométrico basado en la reacción del iodo con el sulfuro en solución ácida, oxidándolo hasta azufre (APHA, 1998). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 10 mL de agua destilada, 10 mL de solución de yodo 0.025 N, 1 mL de HCl 3 N, se agregaron 5 mL de muestra, enseguida se agregaron 5 gotas de solución de almidón (20 g/L), se homogenizó la mezcla y se tituló con una solución de tiosulfato de sodio 0.025 N. Los cálculos que se realizaron para determinar los mg/L de S²⁻ fueron:

$$\text{mg/L S}^{-2} = \frac{[(N_{\text{yodo}} * Y) - (N_{\text{Tio}} * T)] * F}{\text{mL muestra}} \quad (3.3)$$

dónde:

N = Normalidad

Y = mL de Yodo

T = mL de Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

F = Factor de conversión (16000)

3.6.3 Determinación de sulfuro por el método de Cord-Ruwisch

Para medir la producción de sulfuros en las botellas de las actividades sulfatorreductoras se utilizó el método de Cord-Ruwisch (1985). En un tubo marca Hach se adicionaron 4 mL de una solución que tenía sulfato de cobre 5 mM y HCl 50 mM. Posteriormente se agregó 0.1 mL de muestra a la celda y se agitó vigorosamente, en seguida se analizó en un espectrofotómetro UV-Visible marca Thermospectronic, modelo Helios Aquamate, a una longitud de onda de 480 nm. La concentración de sulfuro se determinó a partir de una curva de calibración de 2 a 20 mM de sulfuro, usando $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ como estándar.

3.6.4 Determinación del pH y alcalinidad

Para la determinación del pH y la alcalinidad se utilizó el método de alcalinidad 2320 (APHA, 1998) utilizando 20 mL de muestra en un vaso de precipitado, se colocó un electrodo conectado a un potenciómetro y se midió su pH inicial. Para la determinación de alcalinidad se titularon 20 mL de muestra con HCl 0.1 M y cuando alcanzó un pH de 5.8 se midieron los mL gastados, luego se siguió titulando hasta alcanzar un pH de 4.3 y se midieron los mililitros totales gastados. Los cálculos para la determinación de alcalinidad total expresada en mg CaCO_3/L son los siguientes:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = (V_{4.3} \times \text{EQ} \times \text{NA}) / \text{VM} \quad (3.4)$$

dónde:

$V_{4.3}$ = volumen de ácido gastado para llegar a pH 4.3 (mL)

EQ = peso equivalente del CaCO_3 (50000 eq.)

NA = normalidad del ácido clorhídrico

VM = volumen de muestra (mL)

Para la determinación de la alcalinidad de bicarbonato en la muestra expresada en mg CaCO_3/L se realizan los siguientes cálculos:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = (V_{5.8} \times \text{EQ} \times \text{NA}) / \text{VM} \quad (3.5)$$

dónde:

$V_{5.8}$ = volumen de ácido gastado para llegar a pH 5.8 (mL)

EQ = peso equivalente del CaCO_3 (50000 eq.)

NA = normalidad del ácido clorhídrico

VM = volumen de muestra (mL)

3.6.5 Determinación de sulfato por el método gravimétrico

Para la determinación de sulfatos se utilizó el método gravimétrico con ignición del residuo que se basa en la precipitación del sulfato de bario mediante la adición de BaCl_2 (APHA 1998). Se tomaron de 10 a 25 mL de muestra y se llevaron a 250 mL con agua destilada en un matraz aforado, para que la muestra tuviera alrededor de 200 mg de $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$. El pH se ajustó entre 4.5 y 5.0 con HCl diluido 1:3. La muestra se calentó hasta hervir y mientras se agitó lentamente, se adicionó la solución caliente de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 M hasta que comenzó a formarse un precipitado blanco, entonces se adicionaron cerca de 2 mL de BaCl_2 en exceso. El precipitado se digirió a una temperatura de 85°C durante un mínimo de dos horas. Para recuperar el precipitado la muestra digerida se pasó por un filtro sin cenizas (Whatman 42). El precipitado se lavó con agua destilada caliente hasta que los

lavados quedaron libres de cloro, cuando en 10 mL del agua de lavado no se observó turbiedad al adicionar 1 mL de un reactivo preparado con 8.5 g de AgNO_3 y 0.5 mL de HNO_3 aforado en 500 mL de agua destilada. El filtro se retiró y se colocó en una cápsula (previamente puesta a peso constante) y se calcinó a 800°C durante una hora. Cuando la muestra alcanzó la temperatura ambiente se determinó su peso. Para calcular la concentración de sulfato en la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$mgSO_4^{2-} / L = \frac{(mgBaSO_4) * (411.6)}{\text{ml de muestra}} \quad (3.6)$$

3.6.6 Determinación de sulfato por el método turbidimétrico

Otro método utilizado para la determinación de sulfato fue el método turbidimétrico. Este método está basado en la precipitación del ión sulfato con cloruro de bario en un medio ácido y en condiciones en las que se formen cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme, para después medir la turbiedad producida a través de espectrofotometría.

Primero se enjuagó una celda de vidrio con agua destilada y se limpió perfectamente, se llenó con agua destilada y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro a 420nm. (Blanco 1). Se colocaron 10 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agregaron 20 mL de una solución amortiguadora que contenía 30 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 g de KNO_3 y 20 mL de CH_3COOH , todo esto aforado en un litro de agua destilada. El matraz se agitó por 30 segundos, después se enjuagó la celda con la misma solución y se midió su absorbancia (blanco 2). Posteriormente se le agregó al matraz una cantidad suficiente de BaCl_2 para que precipitara todo el sulfato presente y se puso en agitación durante un minuto, dejándolo reposar

posteriormente durante cinco minutos y en seguida se midió la absorbancia (abs. BaCl₂). La concentración se determinó a partir de la absorbancia obtenida a 420 nm con la correspondiente curva estándar.

$$\text{Absorbancia} = (\text{Abs. Blanco 2} - \text{Abs. BaCl}_2) \quad (3.7)$$

3.6.7 Determinación de sulfato por electroforesis capilar

La determinación de sulfato también se realizó en un sistema de electroforesis capilar (Agilent G1600A) equipado con detector de arreglo de diodos (190- 600 nm). La muestra se centrifugó a 9000 rpm y se diluyó con agua desionizada, posteriormente se filtró en un membrana de 0.22 µm. Se utilizó un capilar de silica fundida de 50 µm de diámetro interno y 72 cm de longitud. La muestra se inyectó con una presión de 50 mbar por 4 segundos, se aplicó un voltaje de -30 kV, la temperatura del capilar fue de 20°C y se usó un buffer para aniones inorgánicos (Agilent 8500-6797). La señal se detectó a 380 nm con detección indirecta de UV con una referencia de 245 nm. El tiempo de análisis fue de 7 minutos. La curva estándar para sulfato se hizo a partir de una mezcla de aniones (Agilent Technologies 5062-8524).

3.6.8 Determinación de sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles

Los sólidos se determinaron de acuerdo a lo descrito en los métodos estándar (APHA, 1998). Se pusieron a peso constante dos cápsulas de porcelana en la mufla a 550° C durante 1 h y se registró el peso de cada una (A), después se agregó entre 2 y 3 g de muestra y se registró el peso (X), después se colocaron las cápsulas en la estufa a 110° C toda la noche, luego se pesaron y se registró el peso (B). Posteriormente las cápsulas se colocaron en la mufla a 550° C para calcinar el

residuo seco y se registró nuevamente el peso (C). Los sólidos volátiles se tomaron como los SSV ya que en lodos granulares no es apreciable la diferencia.

Cálculos:

$$\text{Sólidos totales (g ST/L)} = (B-A)*1000/X \quad (3.8)$$

$$\text{Sólidos volátiles (g SV/L)} = (B-C)*1000/X \quad (3.9)$$

$$\text{Sólidos fijos (g SF/L)} = (C-A)*1000/X \quad (3.10)$$

3.6.9 Determinación de los SVI

La cantidad de sólidos volátiles adheridos al soporte se midió por gravimetría (APHA, 1998) después de haber desprendido la biopelícula del soporte utilizando un baño sónico y se reportó como masa de SVI por volumen de soporte seco ($\text{gSVI}/L_{\text{soporte}}$). Esta determinación se hizo a la biopelícula contenida en las botellas serológicas después de ser usadas en la determinación de la actividad sulfatorreductora.

Para desprender la biopelícula del soporte, la botella serológica abierta se colocó en un baño sónico y se sonicó por cinco minutos, posteriormente se sustrajo el líquido de la botella y se filtró con vacío usando un filtro de fibra de vidrio colocado en un crisol gooch a peso constante (G1). Posteriormente se adicionó un volumen conocido de agua desionizada a la botella (con el soporte) y se sonicó de nuevo por cinco minutos. El líquido se retiró de la botella y se filtró con vacío usando el mismo filtro. Este procedimiento se repitió al menos cinco veces hasta que se observó que el soporte quedó completamente limpio.

El crisol se secó en la estufa a una temperatura de 105° C durante una hora. Se dejó enfriar y se registró el peso (G2). Se introdujo el crisol con el residuo seco a la mufla, a una temperatura de 550° C durante 15 minutos. Se sacó y se puso en la estufa a 105° C por 20 minutos aproximadamente. Se sacó y se dejó enfriar a temperatura ambiente en un desecador y se determinó el peso (G3).

El contenido de los sólidos suspendidos totales se calculó de la siguiente forma:

$$SST = (G2 - G1) \times 1000/V \quad (3.11)$$

dónde:

SST = sólidos suspendidos totales (mg/L)

G1 = peso del crisol con el disco a peso constante (mg)

G2 = peso del crisol con el disco y el residuo seco (mg)

V = volumen de la muestra (mL)

El contenido de sólidos suspendidos volátiles se calculó como sigue:

$$SSV = (G2 - G3) \times 1000/V \quad (3.12)$$

dónde:

SSV = sólidos suspendidos volátiles (mg/L)

G2 = peso del crisol con el disco y el residuo seco (mg)

G3 = peso del crisol con el disco y el residuo después de la calcinación (mg)

V = volumen de la muestra (mL)

Los gramos de SSV por litro de soporte en base húmeda ($gSSV/L_{soporte}$) se calcularon de la siguiente manera:

$$g\text{ SVI}/L_{soporte} = (g\text{ SSV}/L) * (\text{Vol. líquido de la botella})/L_{soporte} \quad (3.13)$$

dónde:

Vol. del líquido de la botella = 65 mL

Los gramos de SVI por gramo de soporte seco ($gSVI/g_{soporte}$) se calcularon así:

$$gSVI/g_{soporte} = (gSVI/L_{soporte})/ \text{Densidad aparente} \quad (3.14)$$

dónde:

Densidad aparente = $4000\text{ g}/L_{soporte}$

Para tener el cálculo de la densidad aparente se midieron 5 mL de soporte seco en una probeta, luego se pesó. Dicho peso se dividió entre los 5 mL de soporte utilizados para tener gramos por litro de soporte.

3.6.10 Determinación de acetato

Se centrifugaron 3 mL de la muestra durante 10 minutos, después se tomaron 950 μL de sobrenadante y se agregaron 50 μL de HCl al 50%, luego se filtró con una membrana de 0.45 μm . Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases HP Agilent Technologies, modelo 6890N, equipado con una columna capilar D8-FAP de 0.25 mm de diámetro y 30 cm de longitud y con un detector de ionización de flama (FID). Como gas portador se utilizó nitrógeno con un flujo de 25 mL/min. Para el detector se utilizó hidrógeno y aire sintético con un flujo de 40 y 400 mL/min respectivamente. Se inyectó un volumen de muestra de 1 μL , en modo de

partición. La temperatura del inyector y detector fue de 250 y 140°C respectivamente. Se aplicó una rampa de temperatura en el horno comenzando en 100°C por un minuto y después subiendo 10°C por minuto hasta alcanzar 140°C y allí se mantuvo durante un minuto. La duración total del análisis fue de seis minutos.

3.6.11 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Para observar el soporte limpio y la biopelícula se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido (Phillips modelo XL-30), equipado con un espectrómetro de rayos-X por dispersión de energía marca EDAX. La muestra se montó en un porta muestra de aluminio y se recubrió con carbón. Las micrografías se llevaron a cabo mediante la ayuda de un detector de electrones retrodispersos a 10KV.

3.7 Cálculos

3.7.1 Eficiencia de Remoción de DQO

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

$$| \text{Eficiencia de remoción de DQO} = \frac{[DQO]_{\text{Afluente}} - [DQO]_{\text{Efluente}}}{[DQO]_{\text{Afluente}}} \times 100 \dots\dots(3.15)$$

3.7.2 Eficiencia de Conversión de Sulfatos (ECS)

Para la ECS se utilizaron las concentraciones de sulfato medidas en el afluente y efluente del reactor por los tres métodos descritos anteriormente y se calculó de la siguiente forma:

$$ECS = \frac{[SO_4^{-2}]_{Afluente} - [SO_4^{-2}]_{Efluente}}{[SO_4^{-2}]_{Afluente}} \times 100 \quad (3.16)$$

3.7.3 Cantidad de DQO utilizada para la sulfatorreducción

La cantidad de DQO utilizada para la sulfatorreducción se calculó a partir de la eficiencia de conversión de sulfatos y de la eficiencia de remoción de DQO.

$$\frac{ECS}{\text{Eficiencia de remoción de DQO}} \times 100 \quad (3.22)$$

3.7.4 Concentración de sulfuro en fase gas

Como no se conoce la composición del biogás la concentración de sulfuro en el gas se calculó utilizando la ley de Henry de la siguiente forma:

$$H_2S_{gas} \Leftrightarrow H_2S_{liq} \quad \alpha = \frac{[H_2S]_{liq}}{[H_2S]_{gas}} \Rightarrow [H_2S]_{gas} = \frac{[H_2S]_{liq}}{\alpha} \quad (3.17)$$

$$H_2S_{liq} \Leftrightarrow HS^- + H^+ \quad K_{H_2S} = \frac{[HS^-][H^+]}{[H_2S]_{liq}} \quad (3.18)$$

$$ST = [H_2S]_{liq} + [HS^-] \rightarrow [HS^-] = ST - [H_2S]_{liq} \quad (3.19)$$

$$\text{Combinando (3.17) y (3.18)} \Rightarrow [H_2S]_{liq} = \left(1 + \frac{K_{H_2S}}{[H^+]}\right)^{-1} ST = \left(1 + K_{H_2S} 10^{pH}\right)^{-1} ST$$

(3.20)

Combinando (3.16) y (3.19) $\Rightarrow [H_2S]_{gas} = \frac{f}{\alpha} ST$ siendo $f = (1 + K_{H_2S} 10^{pH})^{-1}$ (3.21)

dónde:

f = fracción de sulfuro disuelto no ionizado en el sulfuro total

$$K_{H_2S} = (0.382T + 1.892)10^{-8}$$

$$\alpha = 3.442 - 0.044T$$

T = °C

ST = sulfuro total

(Hulshoff Pol *et al.*, 1995)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Desempeño del reactor UASB

El reactor UASB fue operado por más de 130 días bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.4. La operación del reactor se dividió en cinco periodos para una mejor visualización y análisis de su desempeño. Los valores promedio de eficiencias de remoción de DQO y SO_4^{2-} , la concentración de sulfuro producido, el pH y la cantidad de DQO utilizada para la sulfatorreducción se presentan en la Tabla 4.1 para los periodos en los que se operó el reactor. Algunas mediciones mostradas en la Tabla 4.1 fueron hechas a partir de cálculos, mientras que otras se hicieron sólo una vez durante el periodo indicado, por lo que no se tomaron en cuenta sus desviaciones estándar. El desempeño del reactor con respecto al tiempo de operación se presenta en la Figura 4.1. Los valores reportados son los obtenidos durante la operación en estado estacionario, el cual se consideró que se alcanzó después de operar el reactor al menos durante 5 TRH después de cada cambio de condiciones operacionales.

Durante el periodo A se aplicó una carga orgánica en el reactor de 0.5 g DQO/L-d de lactato para que el lodo comenzara a activarse, sin embargo, se observó que el efluente tenía una ligera coloración rosácea debido a la resazurina, un indicador que se vuelve incoloro cuando se reduce químicamente, indicando que en el efluente no había o era poco el sulfuro presente que es producido cuando existen condiciones reductoras en el sistema. La eficiencia de conversión de sulfato en este periodo fue 29.52% y no se dio seguimiento a la DQO.

En el periodo B se aumentó la carga orgánica a 1 g DQO/L-d alcanzándose una eficiencia de remoción de DQO de 69.6 % La ECS no varió notablemente siendo de 25.9% y se alcanzaron al final del periodo concentraciones de sulfuro disuelto de 73.6 mg/L.

Tabla 4.1 Desempeño del reactor UASB operado bajo condiciones de sulfatorreducción.

Periodo	A	B	C	D	E
Días	1-13	14-47	48-93	94-103	104-135
Remoción de DQO (%)	nr	69.6 ± 10	94.2 ± 16.3	86 ± 5.9	89.7 ± 8.4
Conversión de sulfato (%)	29.5	25.9	36.1	42.4	77.7
DQO utilizada para la sulfatorreducción (%)	nr	37.2	38.3	49.4	86.7
Sulfuro disuelto (mg/L)	nr	73.6	153.6	217.6	368.8
Sulfuro no ionizado (mg/L)	nr	4.7	11.5	22.4	67.5
pH final	8.27 ± 0	8.27 ± 0	8.19 ± 0.2	8 ± 0.1	7.7 ± 0.3

nr: no reportado

En el periodo C se aumentó la carga orgánica a 1.5 g DQO/L-d. Las variaciones de la carga orgánica observadas en la Figura 4.1a se debieron a modificaciones en el TRH por problemas en la bomba de alimentación y a errores en la concentración de DQO en el afluente. Este periodo de operación fue el más largo de todos siendo de 45 días, esto propició que la eficiencia de remoción de DQO aumentara a 94.2%, lo que indicó un aumento en la actividad del lodo granular. Sin embargo, la participación de las BSR en la degradación del sustrato no tuvo un aumento considerable con respecto al periodo anterior, lo cual se ve reflejado en la ECS, en la DQO utilizada para la sulfatorreducción y la concentración de sulfuro disuelto las cuales presentaron valores de 36.1%, 38.3% y 153.6 mg/L respectivamente.

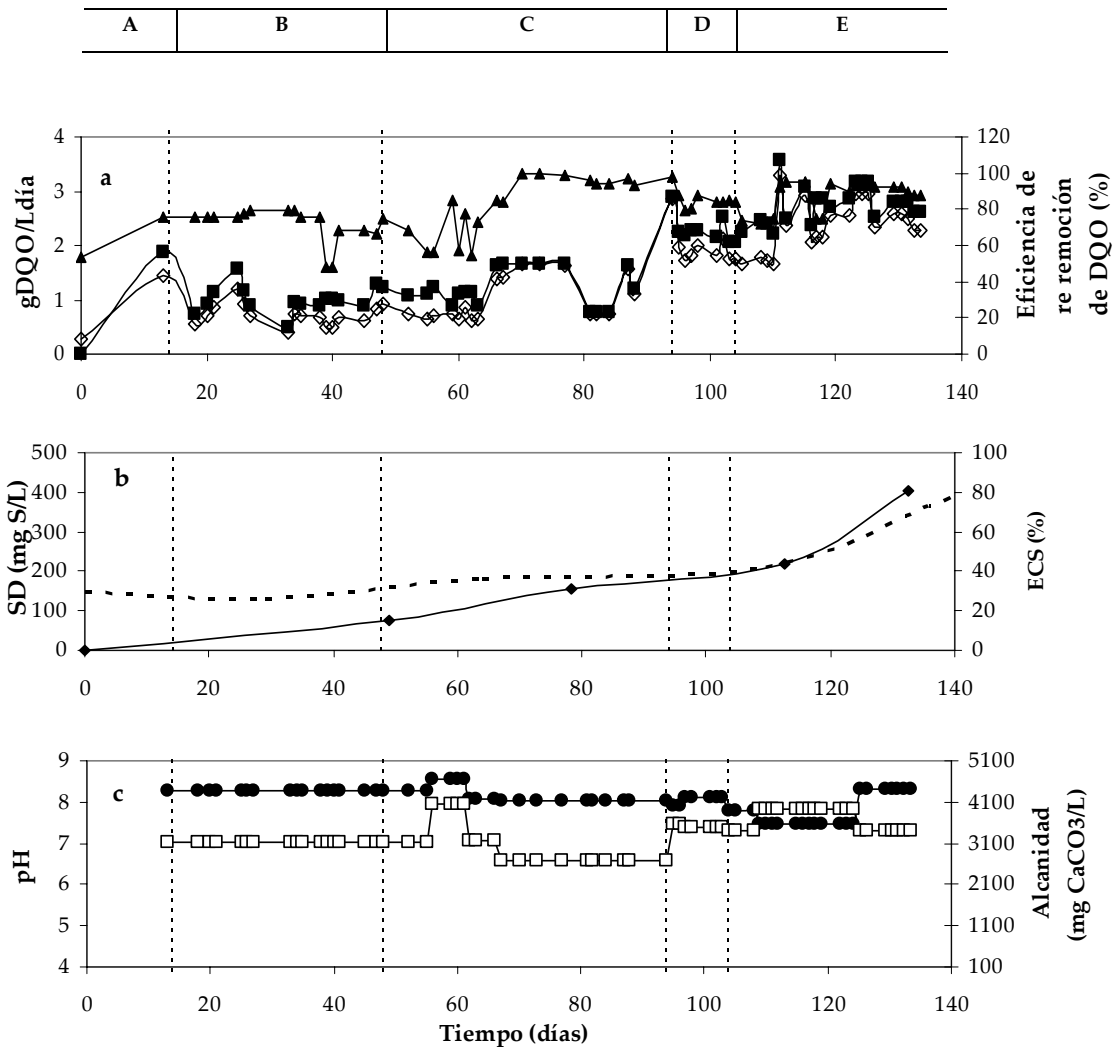


Figura 4.1. Desempeño del reactor UASB con respecto al tiempo de operación. a) Carga orgánica en el afluente (■), velocidad de remoción de DQO (◇) y eficiencia de remoción de DQO (▲); b) Producción de sulfuro disuelto (SD) (◆) y eficiencia de conversión de sulfato, ECS (--) a través del tiempo; c) Evolución del pH (●) y alcalinidad (□) en el efluente. Las letras mayúsculas indican el periodo de operación.

Como se observa en la tabla 4.2 durante los periodos B y C la participación de las BSR en la remoción de la DQO no tuvo variaciones considerables por lo que se cree que el lodo utilizado aún se encontraba en proceso de adaptación y activación.

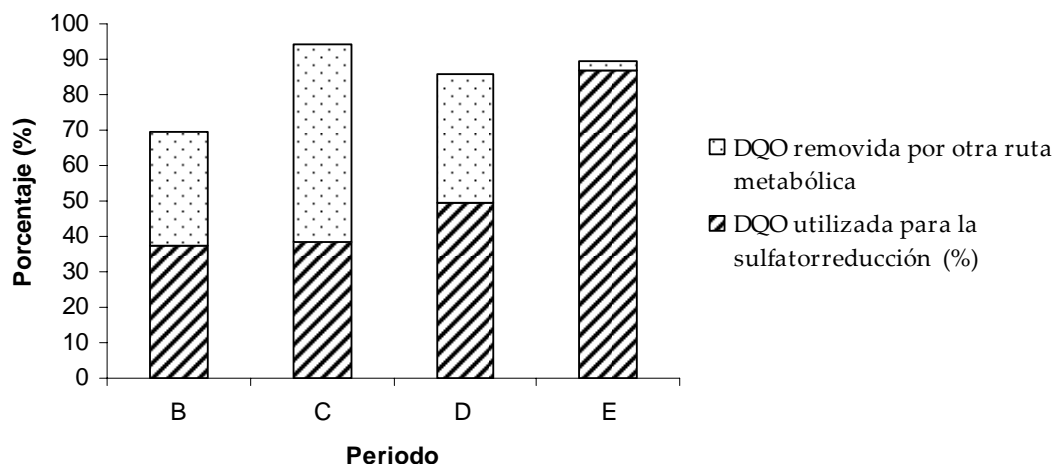


Figura 4.2. Porcentaje de DQO utilizada para la sulfatorreducción a partir de la remoción de DQO total durante los periodos B, C, D y E.

A partir del día 95 (periodo D) se aumentó la carga orgánica a 2 g DQO/L-d usando una mezcla de etanol y lactato en una relación 1:3. La adición de etanol como sustrato y el aumento de la carga orgánica provocaron una ligera disminución de la eficiencia de remoción de DQO estabilizándose alrededor de 86 % (Tabla 4.1 y Figura 4.1). En contraste, la ECS siguió aumentando y llegó a 42.4%, esto indicó que las BSR estaban utilizando casi el 50% de la DQO que se removía en el reactor (Figura 4.2). El sulfuro disuelto también aumentó a 217.6 mg/L. Esto nos indicó un aumento en la actividad sulfatorreductora del lodo granular, debido a un posible crecimiento de la biomasa y a una adaptación a las condiciones impuestas.

En el último periodo (E) se aumentó la carga orgánica a 2.5 g DQO/L-d con etanol y lactato en relación 2:3. En este periodo la eficiencia de remoción de DQO fue de 89.7% y la ECS aumentó hasta alcanzar un valor de 77% (Figura 4.1b). Adicionalmente, la actividad del lodo granular cambió a ser predominantemente sulfatorreductora ya que el 86.6% de la DQO fue consumida por las BSR (Figura

4.2). Este aumento de la ECS se debió probablemente al sustrato utilizado en la alimentación, ya que el etanol y el lactato son preferentemente utilizados por las BSR (Kalyuzhnyi *et al.*, 1997; Kaksonen *et al.*, 2003). Además pudieron haber favorecido las condiciones ambientales impuestas como fue la relación DQO/SO₄²⁻ de 0.6, los sustratos utilizados así como el tiempo de operación del reactor que fue de 135 días. Este resultado concuerda con el valor de 85% alcanzado por Kalyuzhnyi *et al.* (1997) operando un reactor UASB alimentado con etanol durante 80 días con una carga volumétrica de sulfato de 6 g/L-d y un TRH de entre 0.84 y 5 días. Visser *et al.* (1993) también alcanzaron valores mayores de 80%, en reactores UASB alimentados con una mezcla de acetato, propionato y butirato, sin embargo, estas eficiencias solo se alcanzaron bajo condiciones de exceso de DQO (relación DQO/SO₄²⁻ de 10.39 y 3.62), mientras que a una relación DQO/SO₄²⁻ de 0.6 solo se alcanzó una ECS del 20%.

El análisis comparativo de la producción de sulfuro disuelto total y la ECS durante la operación del reactor (Figura 4.1b) muestra que el aumento gradual en la concentración de sulfuros no afectó la ECS. Esto se debe probablemente a que no se alcanzaron concentraciones reportadas como inhibitorias para las BSR (Tabla 4.1). Kalyuzhnyi *et al.* (1997) reportaron concentraciones de entre 1700 - 9951 mg S/L como sulfuro total disuelto y 570 - 610 mg S/L como H₂S con un 100% de inhibición estudiado en un reactor UASB alimentado con etanol como sustrato. Las máximas concentraciones de sulfuro disuelto observadas en este trabajo fueron de 368.8 mg S²⁻/L o de 67 mg S²⁻/L de H₂S aproximadamente (calculado de acuerdo a pH = 7.75 que fue al que se operó el reactor). Estas concentraciones no causaron una inhibición aparente de las BSR, sin embargo, es posible que hayan promovido el desplazamiento de las metanógenas y el desarrollo de una biomasa de actividad predominantemente sulfatorreductora debido a una presión de selección y a las condiciones ambientales impuestas (ej. relación DQO/SO₄²⁻ de 0.6).

En los periodos A y B de operación del reactor el pH y la alcalinidad se mantuvieron constantes con valores de 8.3 y 3100 mg CaCO₃/L. En el periodo C el pH y la alcalinidad aumentaron ligeramente a partir del día 56 (Figura 4.1c) y después de 4 días disminuyeron, probablemente como consecuencia de la variación de la carga orgánica. En el periodo D se observó que la adición de etanol como sustrato afectó positivamente la alcalinidad, ya que aumentó a 3600 mg CaCO₃/L; el pH no fue afectado y se mantuvo en 8.04. En el periodo E el pH disminuyó ligeramente a 7.5, debido en parte a la disminución del pH en el afluente a 6.5, sin embargo, al final del periodo el pH regresó a 8 (Figura 4.1c). Como consecuencia del aumento de la carga orgánica a 2.5 g DQO/L-d de etanol y lactato en relación 2:3, se tuvo que adicionar una mayor cantidad de bicarbonato para ajustar el pH del medio de alimentación, lo que provocó un aumento en la alcalinidad que duró solo hasta el día 125. En resumen el comportamiento del pH en el reactor se mantuvo en valores de 8.0 (Figura 4.1c) lo cual favoreció al sistema, ya que a estos valores la concentración de sulfuro no disociado es baja, y se sabe que, en este tipo de sistemas sulfatorreductores la inhibición puede ser causada por la concentración de sulfuro disuelto no ionizado (Visser *et al.*, 1996).

4.2. Desempeño del reactor LFI

4.2.1 Arranque del reactor LFI e inmovilización de las BSR

El reactor LFI se operó durante un total de 131 días. La fase de arranque e inmovilización de las BSR tuvo una duración de 46 días, periodo en el cual la operación del reactor fue en lote. Posteriormente, el reactor operó en continuo durante 85 días. El soporte se fluidificó por recirculación del efluente y la velocidad de recirculación se estableció en base a la expansión del lecho. El seguimiento de la cantidad de microorganismos inmovilizados al soporte se hizo

mediante la medición de los SVI por litro de soporte y los resultados se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Variaciones en la concentración de biomasa adherida al soporte, porcentaje de expansión del lecho y tasa de recirculación en función de la velocidad superficial a diferentes días de operación del reactor LFI.

Tiempo de operación del reactor (días)	Velocidad superficial (m/h)	Concentración de biomasa adherida al soporte (gSVI/L _{soporte})	Expansión del lecho (%)	Tasa de recirculación (%)
14	10	1.29	10	16
33	15.2	0.8	30	24
54	12.6	0.94	20	20
82	13.9	0.7	25	22
105	13.9	0.76	25	22

En los primeros días de operación visualmente se notaron pocos cambios en el reactor con respecto al aspecto del soporte. El primer cambio observado fue el color de las partículas que cambiaron de blanco a gris. Las observaciones en el microscopio confirmaron la presencia de biomasa sobre el soporte, sin embargo, la colonización no era uniforme.

Al inicio la velocidad superficial se estableció en 10 m/h y se observó que las partículas comenzaron a pegarse entre sí debido a la baja velocidad superficial y, por consecuencia, a la baja expansión del lecho (10%). Este hecho trajo como consecuencia la formación de dos zonas en el lecho: una de color gris y otra casi blanca que indicaba que el soporte estaba libre de biopelícula visible. Esto se puede explicar debido a que existen zonas de alta turbulencia que desprenden la biopelícula del soporte, mientras que en zonas de baja turbulencia la fluidificación de las partículas es mínima por lo que se acumula mayor cantidad de biomasa (Nicolella *et al.*, 2000). Meraz *et al.* (1995) encontraron en un experimento realizado en un reactor LFI con partículas de plástico como soporte y bacterias anaerobias,

que las bajas velocidades superficiales hacen que el lecho se expanda menos, por lo que después de un tiempo de operación, el lecho presenta canales de flujo preferenciales (canalización) y se fracciona, causado por la fricción dinámica que ejercen las partículas entre ellas, debido a su forma irregular y a sus bordes ásperos. Este mismo comportamiento también fue observado durante los primeros días de operación del reactor. Sin embargo, la formación de canales se observó que se debió tanto a la baja velocidad superficial como a la fuerza de flotación del soporte lo que hizo que éste se compactara.

A los 14 días de haber arrancado al reactor LFI se encontraron 1.29 g SVI/L_{soporte}, sin embargo, es importante mencionar que la formación de la biopelícula era aún incipiente ya que la biomasa se desprendía muy fácilmente del soporte y de hecho no se requirió sonicar para desprender la biopelícula.

A los 33 días se aumentó la velocidad de recirculación a 15.2 m/h para lograr una fluidificación del lecho uniforme y, como consecuencia, se presentó una notable disminución en la concentración de biomasa en el soporte que fue de 0.8 g SVI/L_{soporte}. Esta disminución se explica por un aumento en la turbulencia y en la expansión del lecho a 30%, que trajo como consecuencia el lavado de biomasa que no estaba lo suficientemente adherida al soporte. Sin embargo, para la determinación de los SVI se sonicó la muestra para poder desprender completamente la biomasa del soporte, lo que indicaría el comienzo de la formación de una biopelícula estable.

Debido a la disminución de SVI se realizó una segunda inoculación a los 43 días de operación en lote, adicionando 12 mL de lodo granular disgregado equivalentes a 1.15 g SSV. A los 46 días se decidió comenzar la operación del reactor en continuo con un TRH de dos días, ya que se observó que aquella biomasa que se desprendía del soporte no volvía a adherirse a pesar de la

recirculación, además, el poner el reactor en continuo facilitaba el reemplazo del medio mineral.

En el día 54 de operación del reactor (ya en continuo desde el día 46) se disminuyó la velocidad superficial a 12.6 m/h, observándose nuevamente el fraccionamiento del lecho en zonas donde la fluidificación era mínima. Al cuantificar los SVI/L_{soporte} se observó una ligera recuperación de éstos al alcanzar 0.94 $gSVI/L_{\text{soporte}}$,

A los 82 días de operación del reactor la velocidad superficial se aumentó a 13.9 m/h, lo que hizo que el lecho se fluidificara uniformemente. Los SVI disminuyeron a 0.7 $gSVI/L_{\text{soporte}}$, sin embargo, cuando se desprendió la biopelícula del soporte por sonicación, se observó una fuerte adhesión de la misma al soporte, razón por la cual se hicieron una mayor cantidad de lavados al soporte. En este mismo periodo también se observó una alta producción de sustancias viscosas en el efluente que podrían ser exopolímeros. Se ha reportado que altos esfuerzos cortantes pueden inducir la secreción de estas sustancias por parte de los microorganismos, los cuales dan como resultado un balance en la estructura de la biopelícula. De hecho, durante las primeras etapas de formación de la biopelícula, se ha observado una gran producción de exopolisacáridos, los cuales promueven la adhesión celular inicial en la superficie del soporte (Liu y Tay, 2002). Estas observaciones fueron de gran importancia ya que sugirieron un proceso de adhesión de microorganismos en el soporte.

Después de 105 días de operación del reactor LFI la cantidad de SVI no varió con la velocidad superficial impuesta, lo que indicó que la biopelícula había alcanzado un estado estacionario de producción y desprendimiento de la misma.

A partir de las observaciones del lecho y de los SVI podemos inferir que varios factores hidrodinámicos determinan finalmente el grosor de la biopelícula y su estabilidad, ya que contribuyeron al desprendimiento de aquella biomasa no

adherida completamente al soporte y en la formación de una biopelícula resistente a dichas fuerzas. Meraz *et al.* (1995) encontraron que el mecanismo de inmovilización de la biomasa en el soporte y la velocidad de crecimiento de la biomasa es lento con respecto al desprendimiento de la biopelícula debido al esfuerzo cortante al cual están sujetas las partículas.

Las micrografías del soporte tomadas por MEB, que se presentan en la Figura 4.3, muestran una superficie heterogénea en el soporte, con surcos, grietas y cavidades, disponibles para la colonización (Figura 4.3a). Estas características son convenientes para la formación de la biopelícula ya que los microorganismos crecen preferentemente en los espacios intersticiales que proveen las irregularidades del soporte, lo cual los protege de las fuerzas cortantes del líquido (Fox *et al.*, 1990; García-Calderon *et al.*, 1998).

Las micrografías del soporte a los 60 días de operación del reactor (Figuras 4.3b y c) muestran una evidente población de microorganismos. En la Figura 4.3b se observa colonización, principalmente en las zonas “rugosas” o grietas del soporte, mientras que en las superficies “lisas” se observa poca adhesión de biomasa. Esto se debió probablemente a la forma irregular del soporte y a los efectos de fricción entre partículas. A los 90 días de operación (Figura 4.3d) los microorganismos cubrieron mayormente la superficie del soporte, indicando que la biopelícula se había formado. Experimentos realizados con partículas esféricas reportan la formación homogénea de biopelícula (Buffière *et al.*, 2000), lo cual contrasta con nuestro sistema, ya que las superficies irregulares del soporte permitieron una colonización inicial en dicha zona.

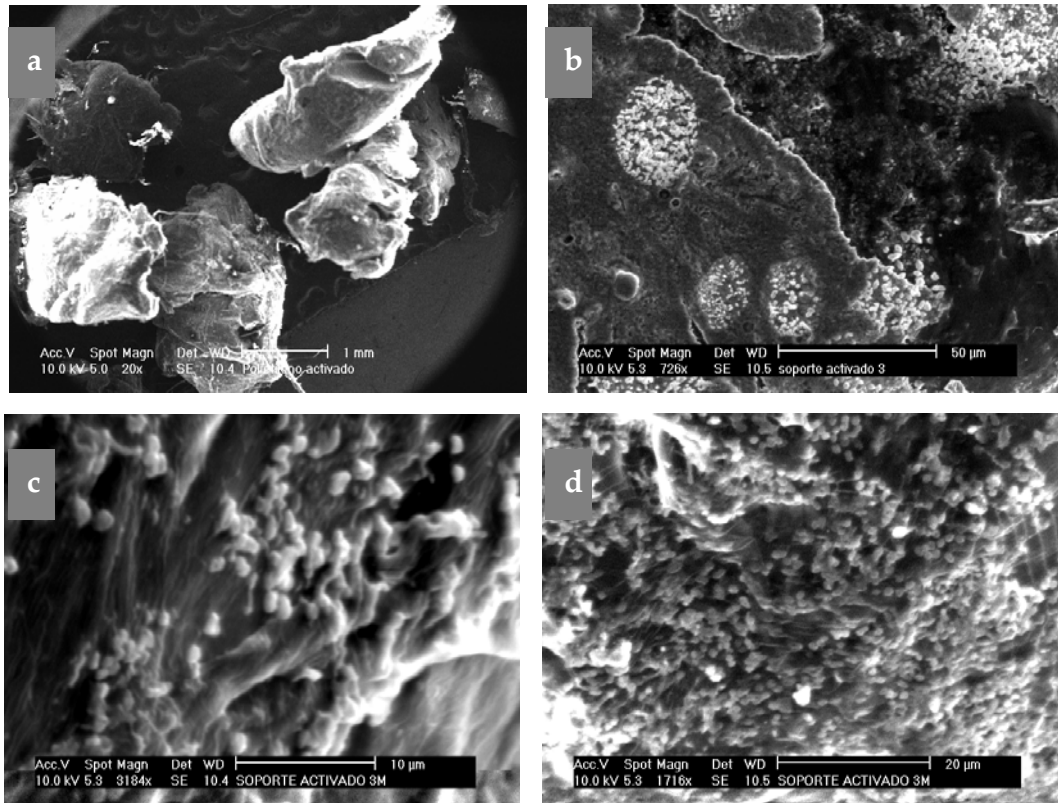


Figura 4.3. Micrografías del soporte tomadas por microscopía electrónica de barrido a diferentes tiempos de operación del reactor LFI. (a) antes de la inoculación; (b y c) a los 60 días y (d) a los 90 días.

4.2.2 Cambios en la velocidad superficial del líquido

La expansión del lecho fue obtenida por observaciones visuales, y se estableció que la velocidad mínima de fluidificación era de 13.9 m/h, lo cual producía una expansión del lecho de 25% del volumen del reactor.

La Figura 4.4 muestra la relación entre la velocidad superficial y los SVI en el soporte. Se puede observar que los SVI tienden a disminuir con el aumento de la velocidad superficial. Ohashi y Harada (1994) y Kwok *et al.* (1998) reportaron un efecto similar en estudios con biopelículas, indicando que una fuerza cortante grande, dada por altas velocidades superficiales, da como resultado una biopelícula delgada. Por otro lado, Kaksonen *et al.* (2003) concluyeron en su

estudio que los reactores FBR sulfatorreductores no pueden ser operados a altas velocidades de fluidificación debido a que esto afecta negativamente la eficiencia del proceso por el desprendimiento que tiene la biomasa del soporte.

A partir de la Figura 4.4 se podría inferir que una baja velocidad superficial daría lugar a mayor cantidad de biomasa inmobilizada en el soporte, sin embargo, las variaciones en la velocidad superficial presentan diferencias importantes: mientras que bajas velocidades superficiales promueven la inmovilización de bacterias en el soporte, se necesitan mayores velocidades superficiales para tener una mejor transferencia de masa, una biopelícula estable y, por consecuencia, tratar mayores cargas orgánicas (Castilla *et al.*, 2000).

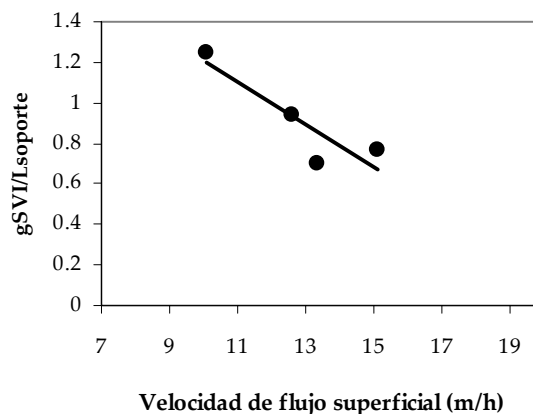


Figura 4.4. Efecto de la velocidad superficial en la adhesión de la biomasa al soporte.

La Tabla 4.3 muestra las velocidades superficiales que produjeron una fluidificación mínima para algunos soportes reportados en la literatura. La velocidad de fluidificación varía dependiendo del tipo de soporte debido a la fuerza de flotación de las partículas y probablemente, a fenómenos de superficie (ej. superficies hidrofóbicas), densidad y al tamaño de las partículas (García-Calderón *et al.*, 1998). Esto puede ser comprendido de mejor forma de acuerdo a la

teoría de pseudo-fluidificación que está basada en la suposición de que la distribución del sólido en el lecho depende de las diferencias que hay entre la densidad del sólido y la densidad total dada por la mezcla líquido-gas (Buffière y Moletta, 1999). En este estudio no se obtuvo una producción de gas apreciable, sin embargo las diferencias entre la densidad del sólido y la densidad del líquido deben ser consideradas.

Otro parámetro importante es el tamaño y el área superficial del soporte, ya que esto indica la superficie disponible para la adhesión y crecimiento de la biopelícula (Heijnen *et al.*, 1989). Algunos autores explican que las variaciones en la expansión del lecho también se deben a la acumulación de biomasa en el soporte, ya que agranda el tamaño de la partícula y por lo tanto el volumen y su densidad (Mysca y Svek, 1994). Es por eso que las velocidades mínimas de fluidificación difieren entre soportes del mismo material pero diferente tamaño, como el reportado por González-Blanco *et al.*, (2005) que presenta un soporte del mismo material que el utilizado en este estudio pero con un tamaño diferente.

4.2.3 Operación en continuo del reactor LFI

Posterior al arranque del reactor, que se operó en lote por 46 días, el reactor LFI se operó en continuo durante 84 días bajo tres diferentes condiciones operacionales. Los resultados promedio se presentan en la Tabla 4.4 mientras que el desempeño del reactor con respecto al tiempo de operación se presenta en la Figura 4.5. Los valores reportados son los obtenidos durante la operación en estado estacionario, el cual se consideró que se alcanzó después de operar el reactor al menos durante 5 TRH después de cada cambio de condiciones operacionales.

Tabla 4.3. Propiedades físicas de diferentes soportes utilizados en reactores LFI y velocidades superficiales que produjeron una fluidificación mínima de los lechos formados.

Soporte	D (mm)	ρ (kg/m ³)	U_{mf} (m/h)	Aplicación	Referencia
Esferas de poliestireno	0.8-1	330	nr	oxidación de Fe ⁻²	Nikolov y Karamanev 1987
Polietileno	0.56-0.25	267	9	Inmovilización de bacterias anaerobias	Meraz <i>et al.</i> 1995
Perlita	0.968	280	2.3	Digestión anaerobia desechos destilado de vino	García-Calderón <i>et al.</i> 1998
Corcho	0.92	nr	6.2	Estudio hidrodinámico	García-Calderón <i>et al.</i> 1998
Esferas polipropileno	3.6	nr	8.6	Estudio hidrodinámico	García-Calderón <i>et al.</i> 1998
Esferas polietileno	3.85	nr	13.2	Estudio hidrodinámico	García-Calderón <i>et al.</i> 1998
Polipropileno reciclado	4	920	225	Estudio hidrodinámico	Buffière y Moletta 1999
Polietileno baja densidad	0.4	267	1.6-10.9	Tratamiento anaerobio de aguas municipales y sintéticas	Castilla <i>et al.</i> 2000
Extendsphere®	0.175	690	5.4	Digestión anaerobia desechos destilado de vino y lácteos	Buffière <i>et al.</i> 2000; Arnaiz <i>et al.</i> 2003
Polietileno baja densidad	0.4	267	6.4	Tratamiento de compuestos azufrados	González-Blanco <i>et al.</i> 2005
Polietileno baja densidad	0.4	267	nr	Sulfatorreducción	Celis-García <i>et al.</i> 2004
Polietileno baja densidad	0.5-1	400	13.9	Sulfatorreducción	Este estudio

D: tamaño de partícula, ρ : densidad del soporte, U_{mf} : velocidad superficial que produce una fluidificación mínima, nr: no report

La operación en continuo comenzó con una carga orgánica de 0.5 g DQO/L-d utilizando etanol y lactato en el afluente con una relación 1:1 (en base a DQO). El TRH se fijó en 2 días debido a que el soporte aún estaba en proceso de colonización y se quería minimizar el lavado de biomasa del reactor.

Tabla 4.4 Desempeño del reactor LFI operado en continuo bajo condiciones de sulfatorreducción.

Periodo	A	B	C
Días a partir de la operación en continuo	47-65	66-76	77-131
Remoción de DQO (%)	64 ± 6.2	72 ± 10.9	60 ± 8.1
Conversión de sulfato (%)	3.9 ± 1.5	21.8 ± 9.7	28.1 ± 7
DQO utilizada para la sulfatorreducción (%)	6.1	30.4	47.1
Sulfuro disuelto (mg/L)	71.0 ± 14.6	78 ± 11.4	177 ± 47.4
Sulfuro no ionizado (mg/L)	12.5	13.5	74.4
Sulfuro en fase gas (mg/L)	7	7.7	32.1
Sulfuro total producido (mg/L)	90 ± 13.2	85.7 ± 11.2	210 ± 44.6
pH final	7.7 ± 0	7.8 ± 0.3	7.2 ± 0.6

Durante los primeros 18 días de operación en continuo del reactor LFI (periodo A) la eficiencia de remoción de DQO fue de 64% y la ECS de 3.9% (Tabla 4.4). Estos resultados indicaron que la fracción de DQO removida por las BSR era muy pequeña. Muy probablemente la remoción de DQO era producto de la metanogénesis, aunque no se determinó la producción de metano en el reactor.

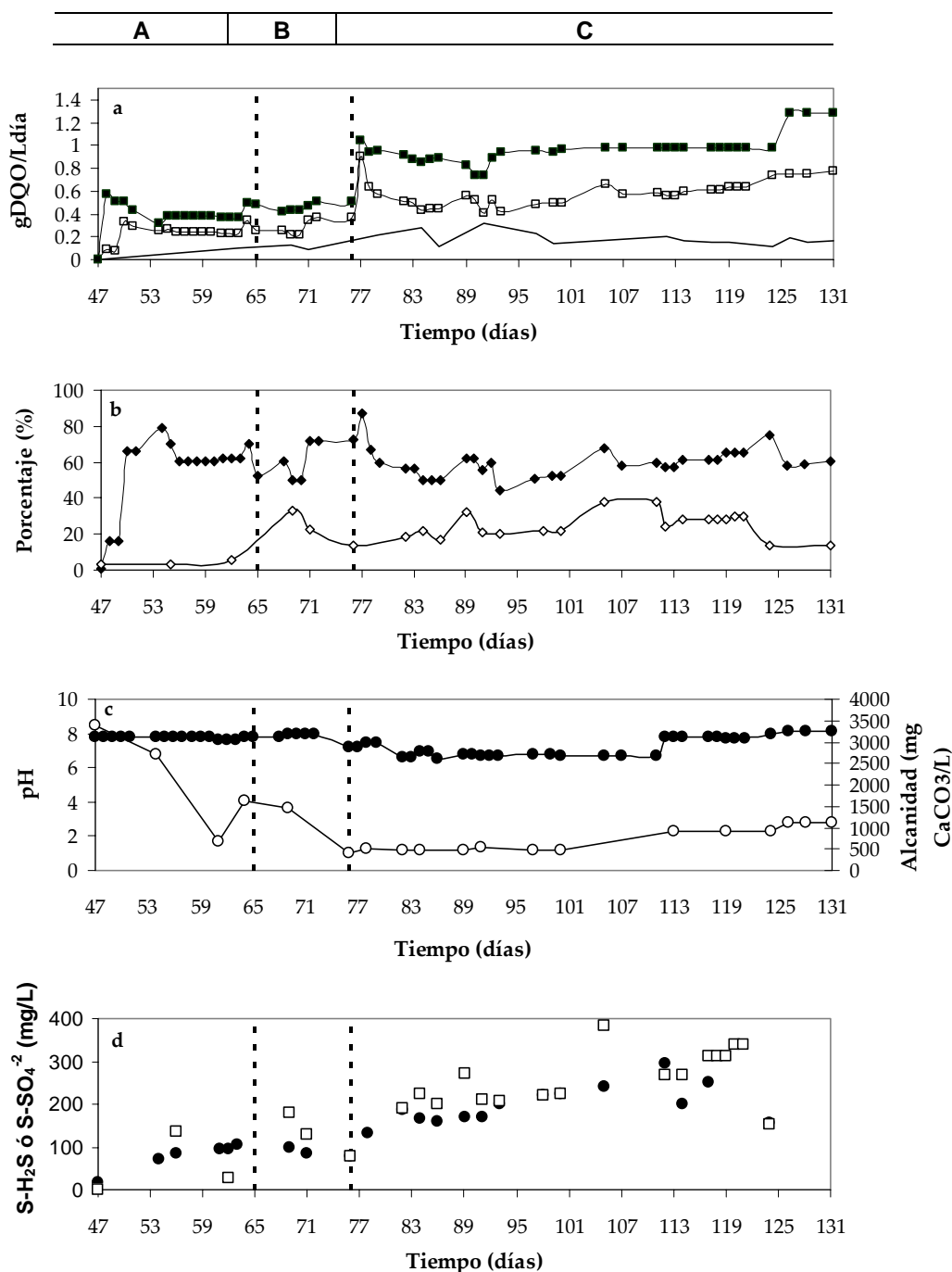


Figura 4.5. Desempeño del reactor LFI con respecto al tiempo de operación (a) Carga orgánica aplicada al reactor (■), velocidad de conversión de DQO (□) y producción de acetato (-) en el efluente; (b) Eficiencias de remoción de DQO (♦) y de conversión de sulfato (◇); (c) pH (●) y alcalinidad (○) en el efluente; (d) concentración de sulfuro total (●), sulfato convertido en el efluente (□). Las letras de la parte superior indican los periodos de operación del reactor.

En el día 66 de operación del reactor (periodo B) se utilizó solo etanol como sustrato y se mantuvo la carga en 0.5 g DQO/L-d. En los primeros días la eficiencia de remoción de DQO disminuyó ligeramente, pero en el día 71 aumentó a 71.8% y así se mantuvo hasta el final de este periodo (Figura 4.5b). La ECS tuvo un aumento y se mantuvo en 21.8% en promedio. En este periodo la participación de las BSR en la remoción de DQO aumentó notoriamente a 30.4%.

A partir del día 77 (periodo C) la carga en el afluente se duplicó a 1 g DQO/L-d aumentando la concentración de DQO en el afluente y sin modificar el TRH. Después de aumentar la carga, la eficiencia de remoción de DQO tuvo un descenso notable y se estabilizó en un valor promedio de 60% (Figura 4.5b). La ECS en este periodo fue de 28.1% lo que da como resultado un 47% de DQO utilizada para la sulfatorreducción.

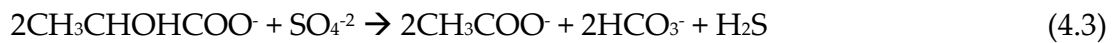
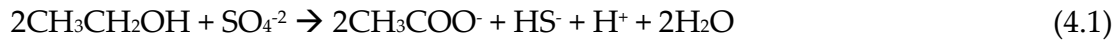
Durante este periodo la cantidad de sólidos volátiles adheridos al soporte disminuyó con respecto a los otros dos periodos de operación en continuo (de 0.94 g SVI/L_{soporte} a 0.7 g SVI/L_{soporte}), por lo que se decidió determinar la cantidad de SSV que había en el efluente, siendo ésta despreciable. Estas diferencias con respecto a lo que se lavó del soporte y los sólidos totales que salieron del reactor pueden deberse al hecho de que la biomasa lavada se acumuló en el fondo cónico del reactor y en el ecualizador. Estas observaciones sugieren que parte de la eficiencia de remoción de DQO por especies no sulfatorreductoras en este periodo fue efectuada principalmente por microorganismos no adheridos al soporte, ya que los resultados de actividad metanogénica en la biopelícula fueron casi nulos, lo que podría inferir la presencia casi exclusiva de BSR en el soporte.

Comparando los 3 periodos de operación del reactor en continuo no se observó una diferencia substancial en la eficiencia de remoción de DQO (Figura 4.5b). No obstante la eficiencia de conversión de sulfatos fue aumentando gradualmente y, por lo tanto, la participación de las BSR en la remoción de DQO.

Este aumento puede sugerir que, durante los primeros días de operación del reactor, la DQO fue utilizada por otras especies con metabolismo no sulfatorreductor, y que en el periodo C, a pesar de que la eficiencia de remoción de DQO no aumentó, hubo un enriquecimiento selectivo de las BSR en el reactor. Kaksonen *et al.* (2003) observaron un comportamiento similar en un reactor FBR alimentado con lactato, y encontraron que durante las primeras etapas de operación en continuo parte del flujo de electrones del sustrato tuvo otro destino aparte de la sulfatorreducción, propiciando el crecimiento de otros microorganismos en el sistema.

La producción de acetato fue debida a la fermentación de etanol y lactato, siendo en el periodo A y B de 0.1 g DQO/L-d y en el periodo C de 0.18 g DQO/L-d (Figura 4.5a). A partir de las reacciones de oxidación del etanol (Ecuaciones 4.1 y 4.2) y lactato (Ecuaciones 4.3 y 4.4), sabemos que dos moles de etanol o lactato producen dos moles de acetato, por lo tanto, si las BSR hubieran oxidado incompletamente dichos sustratos deberíamos observar 400 mg DQO/L-d de acetato en promedio (considerando un 60% de remoción de DQO). Esto sustenta que en la degradación del etanol y lactato pudieron haber participado otras especies metabólicas aparte de las BSR de metabolismo incompleto, como por ejemplo las metanógenas. Sin embargo, no podemos asegurar esto ya que no se hicieron determinaciones de metano durante la operación del reactor. Uno de los factores que pudo influir en la presencia de la metanogénesis fue el pH del reactor que estuvo en valores entre 7 y 8. Visser *et al.*, (1996) encontraron que a un pH de 7 los parámetros de crecimiento de las metanógenas utilizadoras de acetato tienen mayores ventajas comparadas con las BSR que consumen acetato en ensayos de actividad en lote con lodo granular utilizando acetato como único sustrato. Otra posibilidad es que la oxidación de DQO haya sido llevada a cabo por BSR de metabolismo completo, sin embargo, durante las actividades sulfatorreductoras

realizadas a la biopelícula se observó una acumulación de acetato, indicando una actividad sulfatorreductora predominantemente de metabolismo incompleto.



Al inicio de la operación del reactor en continuo el pH de entrada se estableció en valores alrededor de 6.5. El pH final se mantuvo casi constante durante el periodo A y B, siendo de 7.7 (Figura 4.5c). A partir del día 77 el pH comenzó a disminuir y se mantuvo en 6.7 a partir del día 90. Este valor de pH pudo ser provocado por el aumento de la concentración de etanol en el afluente, ya que la eficiencia de remoción de DQO se vio disminuida y por consiguiente hubo una menor generación de alcalinidad. Este pH no era adecuado para el reactor ya que estudios previos indican que el intervalo óptimo de crecimiento de las BSR está en un pH entre 7.3 y 7.6 (Visser *et al.*, 1996; O'Flaherty *et al.*, 1998; Kaksonen *et al.*, 2004), por lo que se optó por aumentar el pH de la alimentación a 7 a partir del día 112 de operación en continuo, para tratar de mejorar las eficiencias de remoción de DQO y, por lo tanto, la generación de alcalinidad.

A partir de la operación en continuo, la alcalinidad del reactor comenzó a descender durante el periodo A y B de 3500 mg CaCO₃/L a 400 mg CaCO₃/L (Figura 4.5c). En el periodo C la alcalinidad se mantuvo constante en un valor de 500 mg CaCO₃/L y, a partir del día 113 comenzó a aumentar ligeramente. Un motivo que pudo provocar la disminución de la alcalinidad durante el periodo A, fue el lavado de los microorganismos en el reactor que pudieron haber contribuido

a la generación de alcalinidad. Una razón importante para la disminución de la alcalinidad durante el periodo B fue el uso de etanol como único sustrato; la oxidación completa de lactato produce 3 moles de alcalinidad por bicarbonato por cada mol de sustrato, mientras que la oxidación de etanol produce solo 2 moles (Ecuaciones 4.1 y 4.2). Además, al observar la concentración de acetato en el reactor podemos inferir que la baja alcalinidad en el reactor se debió a la oxidación incompleta de etanol y, por consiguiente la acumulación de acetato. Esta acumulación de acetato en reactores alimentados con etanol y con velocidades altas de degradación sulfatorreductora (0.38 g DQO-acetato/g SSV-d) se ha considerado como un factor limitante del proceso (Omil *et al.*, 1997a; Lens *et al.*, 2002). Kaksonen *et al.* (2006) observaron en un reactor FBR sulfatorreductor que a TRH cortos (6.5 horas) la oxidación del etanol se vuelve incompleta por lo que la producción de alcalinidad por oxidación del acetato se ve afectada. Sin embargo, el TRH en el reactor LFI fue de 2 días, por lo que la oxidación incompleta del etanol es posible que se haya debido a otros factores, como puede ser la baja cantidad de especies utilizadoras de acetato en el reactor debido a diferencias en el crecimiento o al lavado de éstas.

Con respecto al sulfuro disuelto, este fue aumentando gradualmente en el periodo A alcanzando un valor máximo de 97.4 mg/L, pero a partir del cambio de sustrato descendió hasta llegar a 67.5 mg/L (Tabla 4.4). A partir del aumento de la carga orgánica en el periodo C el sulfuro disuelto aumentó nuevamente alcanzando un valor promedio de 177 mg/L. De la cantidad total de sulfuro producido, la fracción en fase gas fue muy pequeña siendo 7 mg/L para el primer periodo, 7.7 mg/L para el segundo periodo y 32.1 mg/L para el tercero.

En la Figura 4.5d se comparó la concentración de sulfuro total producido contra la concentración de sulfato removida durante la operación en continuo del reactor. Ambos valores son muy cercanos entre sí, lo que nos indica que la mayor

parte del sulfato removido se convirtió a sulfuro y, observando la Tabla 4.4, la mayoría de éste estuvo disuelto en el medio, siendo muy baja la concentración de sulfuro no ionizado presente en el reactor. La máxima concentración de sulfuro no ionizado (que es la forma que puede ser más tóxica para las BSR) registrada en el reactor fue de 73.4 mg/L, esta concentración está aún por debajo de la concentración inhibitoria reportada por Kaksonen *et al.* (2004), que es de 124 mg/L trabajando en un reactor FBR con biomasa sulfatorreductora inmovilizada. Esto podría indicar que las variaciones en las eficiencias de remoción de DQO y conversión de sulfato en el reactor no fueron influidas por la concentración de sulfuro no ionizado.

A partir de la información presentada en esta sección se puede inferir que la biopelícula se había formado y estabilizado en el sistema al final de la operación del reactor, debido a que ya no se presentaron variaciones considerables en los resultados obtenidos. Sin embargo, el reactor LFI presentó varios episodios de inestabilidad como se observa en los perfiles mostrados de la operación en continuo, que pudieron deberse al proceso de formación de la biopelícula y a los cambios en las velocidades superficiales aplicadas. El hecho de que la biopelícula se haya conformado totalmente al final de la operación del reactor no quiere decir que las eficiencias de remoción de DQO y la ECS hayan tenido necesariamente que aumentar, ya que es posible que la biopelícula aún tuviera una baja concentración de $S_{VI}/L_{soporte}$, capaz de soportar el aumento de las velocidades de cargas de sulfatos y de DQO.

4.3 Actividades específicas

4.3.1 Lodo granular del reactor UASB

Se realizaron pruebas de actividad metanogénica acetoclástica y actividad sulfatorreductora al inicio de operación del reactor UASB con el fin de conocer el estado que conservaba el lodo granular después de haber estado almacenado por más de un año a 4° C. La Figura 4.6 muestra la producción de metano en las botellas serológicas utilizadas para este experimento. La actividad metanogénica obtenida en este experimento fue de 0.45 g DQO-CH₄/g SSV-d, la cual esta dentro de lo reportado en la literatura, que es de alrededor de 0.4 g DQO-CH₄/g SSV-d para actividades metanogénicas acetoclásticas para lodos anaerobios utilizando AGV como sustratos (Omil *et al.* 1997b).

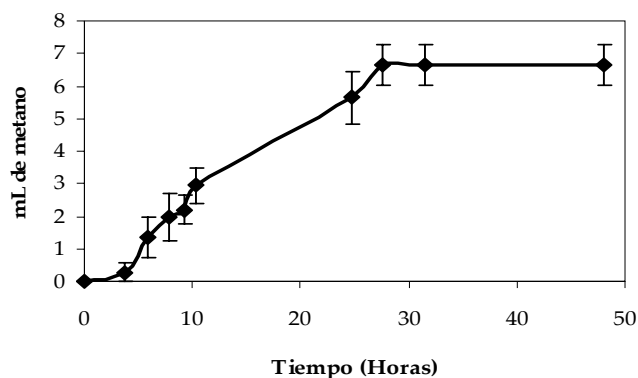


Figura 4.6. Perfil de la producción acumulativa de metano en la determinación de la actividad metanogénica con acetato como donador de electrones.

La actividad sulfatorreductora se realizó con 1 g DQO-H₂S/L de etanol como sustrato y una relación DQO/SO₄²⁻ de 0.67. El resultado de la actividad sulfatorreductora fue de 0.09 g DQO-H₂S/g SSV-d, el cual esta muy por debajo de lo reportado en la literatura para diferentes lodos granulares, ya que se reportan

valores de entre 0.45 y 2.1 g DQO-H₂S/gSSV-día utilizando AGV como sustratos (Visser *et al.*, 1993; Omil *et al.*, 1996). Este fue un resultado no esperado, ya que la procedencia del lodo granular indicaba que era un lodo que había estado tratando sulfatos. Sin embargo, pudo ser que la actividad sulfatorreductora haya sido más afectada por el periodo de almacenamiento a 4° C, comparada con la actividad metanogénica.

Al final de la operación del reactor UASB se volvieron a realizar las mismas pruebas de actividad metanogénica acetoclástica y actividad sulfatorreductora con el fin de comparar la variación en la actividad debido a las condiciones impuestas. Al analizar los perfiles de producción de metano se observó una actividad metanogénica de 0.1 g DQO-CH₄/g SSV-d, lo que indicó una disminución de la capacidad metabólica de los microorganismos metanógenos. La actividad sulfatorreductora tuvo un aumento considerable alcanzando valores de 0.45 g DQO-H₂S/g SSV-d. Durante la determinación de la actividad sulfatorreductora también se midió la concentración de acetato a la par de las mediciones de sulfuro y los resultados se presentan en la Figura 4.7. Se encontró que no hubo una acumulación de acetato considerable en las botellas, siendo la concentración máxima de acetato de 2.5 mM (0.16 g DQO/L). Posteriormente se observó que parte del acetato se consumió después de 24 horas, quedando una concentración residual de 0.07 g DQO/L, lo que sugiere la presencia de BSR que oxidan completa e incompletamente el etanol.

En la Figura 4.8 se muestran los resultados de las actividades realizadas al inicio y al final de la operación del reactor UASB. Se observa claramente que al final de la operación la actividad del lodo granular fue casi completamente sulfatorreductora.

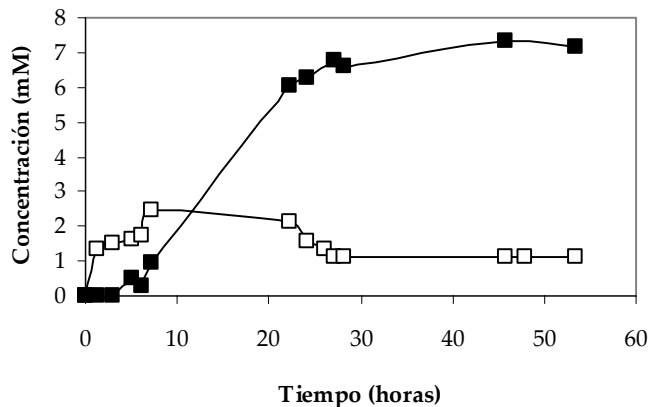


Figura 4.7. Perfil de producción de H₂S (■) y de acetato (□) a través del tiempo durante los experimentos en lote para la determinación de la actividad sulfatorreductora utilizando lodo granular obtenido del reactor UASB al final del periodo de operación.

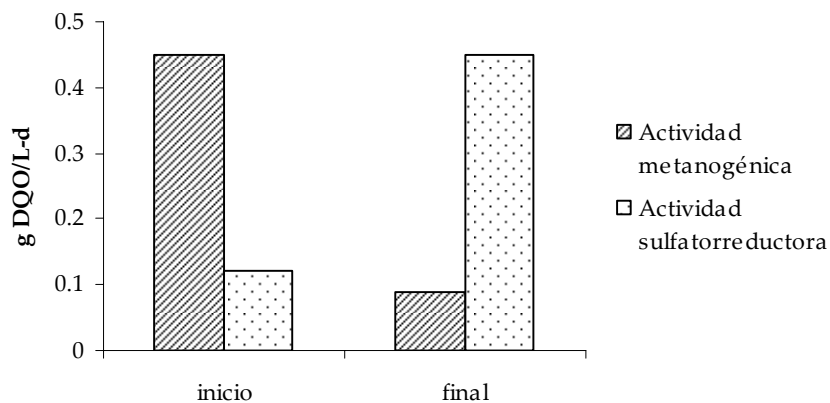


Figura 4.8. Actividades metanogénica acetoclástica y sulfatorreductora del lodo granular al inicio y al final de la operación del reactor UASB.

El cambio en los valores de las actividades metanogénicas y sulfatorreductoras al inicio y al final de operación del reactor esta relacionado con las condiciones de operación del reactor así como con los sustratos utilizados en el reactor, ya que se sabe que el lactato enriquece selectivamente la población de BSR en el reactor (Kaksonen *et al.* 2003; Widdel 1988), además el etanol también es un

sustrato utilizado eficientemente por las BSR (Kalyuzhnyi *et al.*, 1997). En el mismo sentido, la relación DQO/SO₄²⁻ de 0.67 favorece cinéticamente a las BSR (Rinzema y Lettinga, 1988). Otro factor importante fue el tipo de lodo inoculado, ya que dicho lodo había sido utilizado para tratar efluentes ricos en sulfatos de una industria papelera, lo que promovió que fuera más corto el tiempo que se requirió para que las BSR predominaran en el lodo granular.

Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que se requirieron alrededor de 135 días para que el lodo granular alcanzara una actividad sulfatorreductora considerable. Omil *et al.* (1997b) requirieron más de 250 días de operación de un reactor UASB para que el lodo granular (almacenado a 4° C durante más de un año) tuviera una actividad casi completamente sulfatorreductora (0.5 - 0.79 g DQO/gSSV-d), utilizando AGV como sustratos. Sin embargo, dicho lodo provenía de un reactor UASB que trataba efluentes generados de la producción de aceite comestible, por lo que es probable que el lodo granular tuviera una mayor población de metanógenas al inicio del experimento.

4.3.2 Biopelícula inmovilizada del reactor LFI

Se realizaron pruebas de actividad sulfatorreductora específica a la biopelícula soportada del reactor LFI a lo largo de la operación, tanto en la operación en lote como en continuo. Se eligieron como sustratos etanol, lactato y acetato; el etanol y lactato fueron los sustratos con los que se operó el reactor, y el acetato por ser un paso limitante en el proceso de la sulfatorreducción (Omil *et al.*, 1996).

También se realizaron pruebas de actividad metanogénica acetoclástica, sin embargo, esta fue nula al determinarla a los 14 y 33 días de operación del reactor, lo cual podría indicar que los microorganismos metanógenos acetoclásticos no se inmovilizaron en la biopelícula. Una explicación de la predominancia de las BSR en reactores con biopelícula son las diferencias en las propiedades de

inmovilización de BSR y las metanógenas (Visser *et al.*, 1996; Celis-García *et al.*, 2004). Adicionalmente, la relación DQO/SO₄²⁻ de 0.6 así como el origen del inoculo, el cual presentó baja actividad metanogénica, pudieron ser las causas de la nula actividad metanogénica acetoclástica.

Para la determinación de la actividad sulfatorreductora se hicieron mediciones del sulfuro disuelto y acetato a través del tiempo en cada uno de los ensayos con distinto sustrato. En la Figura 4.9 y Tabla 4.5 se muestran los resultados de una de las actividades con etanol como sustrato realizadas a los 33 días de operación del reactor.

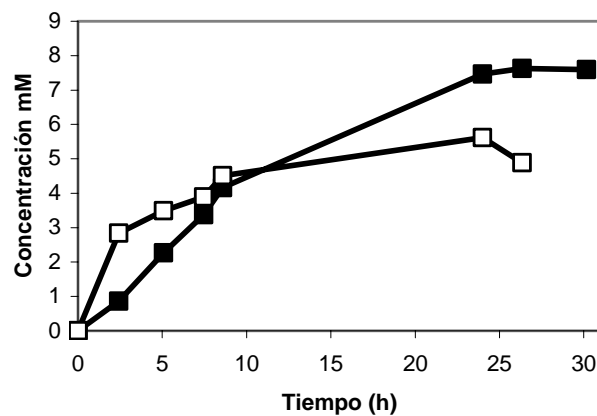


Figura 4.9. Perfil de la producción de H₂S (■) y de acetato (□) para determinar la actividad sulfatorreductora en la biopelícula a los 33 días de operación del reactor LFI usando etanol como sustrato.

La Tabla 4.5 ejemplifica el balance que se hizo para cada uno de los ensayos de actividad sulfatorreductora con diferentes sustratos a diferentes tiempos de operación del reactor. A partir de las ecuaciones 4.5 y 4.6 sabemos que 3 moles de sulfuro debieron ser producidos por 2 moles de etanol así que, a partir de ese dato, podemos saber cuanto acetato hubiera sido producido a partir de la reacción incompleta del etanol. En el ejemplo mostrado, el acetato teórico coincidió casi

completamente con el acetato observado al final del ensayo, por lo que se infirió que la producción de sulfuro provino de una reacción incompleta de oxidación del etanol.

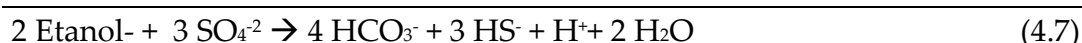
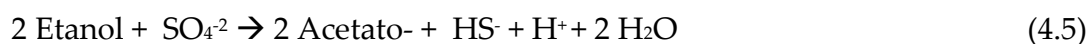


Tabla 4.5. Balance de materia de la actividad sulfatorreductora a partir de las mediciones de sulfuro disuelto y acetato, realizadas a la biopelícula del reactor LFI, la muestra se tomó a los 33 días de operación del reactor utilizando etanol como sustrato.

Tiempo (h)	H ₂ S exp (mM)	Etanol rx completa (mM)	Acetato teórico (mM)	Acetato exp (mM)
0	0	0	0	0
2.42	0.86	0.58	0.58	2.85
5.08	2.26	1.51	1.51	3.49
7.45	3.37	2.25	2.25	3.89
8.58	4.17	2.78	2.78	4.5
24	7.46	4.97	4.97	5.61
26.33	7.63	5.08	5.08	4.89

mM: milimolar; exp: experimental; rx: reacción

Este tipo de balance se realizó también para los días 14, 33, 52, 82 y 105 de operación del reactor LFI. La Figura 4.10 muestra la producción de sulfuro disuelto con etanol, lactato y acetato como sustratos, a diferentes tiempos de operación del reactor LFI. En todas las pruebas de actividad sulfatorreductora que se realizaron

con etanol y lactato como sustratos los resultados obtenidos de la producción de acetato fueron similares.

Como podemos observar en la Figura 4.10 la velocidad de producción de sulfuro disuelto con etanol como sustrato fue aumentando gradualmente en cada una de las determinaciones realizadas, hasta que alcanzó su máximo (13.5 mg H₂S/L-d) en las actividades realizadas los días 82 y 105 donde permaneció constante. La mayor producción de sulfuro durante todos los experimentos realizados fue con etanol como sustrato, alcanzando una concentración de 293 mg H₂S/L con la muestra extraída del reactor LFI en el día de operación 82.

La velocidad de producción de sulfuro disuelto con lactato aumentó notablemente del experimento realizado el día 14 (4.3 mg H₂S/L-d) al del día 33 (18 mg H₂S/L-d), sin embargo en el experimento del día 82 ésta disminuyó (6.8 mg H₂S/L-d), posiblemente debido a la eliminación de lactato como sustrato de alimentación al reactor en el día 64.

La velocidad de producción de sulfuro disuelto con acetato fue aumentando gradualmente de 0.4 a 3.2 mg H₂S/L-d, sin embargo, esta siempre fue mucho mas baja que con los otros dos sustratos. Los experimentos llevados a cabo con acetato no produjeron una cantidad considerable de sulfuro en comparación con los otros dos sustratos utilizados. Una posible razón de la baja conversión del acetato por sulfatorreducción observada podría deberse a la baja capacidad de adhesión que se ha observado de las BSR utilizadoras de acetato en los reactores de biopelículas (Harada *et al.*, 1994), por lo que posiblemente estas fueron lavadas del reactor. Omil *et al.* (1997a) encontraron que altas velocidades de flujo ascendente en un reactor UASB dan lugar a un lavado selectivo de algunas BSR ya que encontraron una alta degradación de acetato por sulfatorreducción al determinar la actividad en el lodo que se lavó del reactor. Otra explicación que se puede dar a la baja utilización de acetato en los experimentos es que bajo condiciones de altas

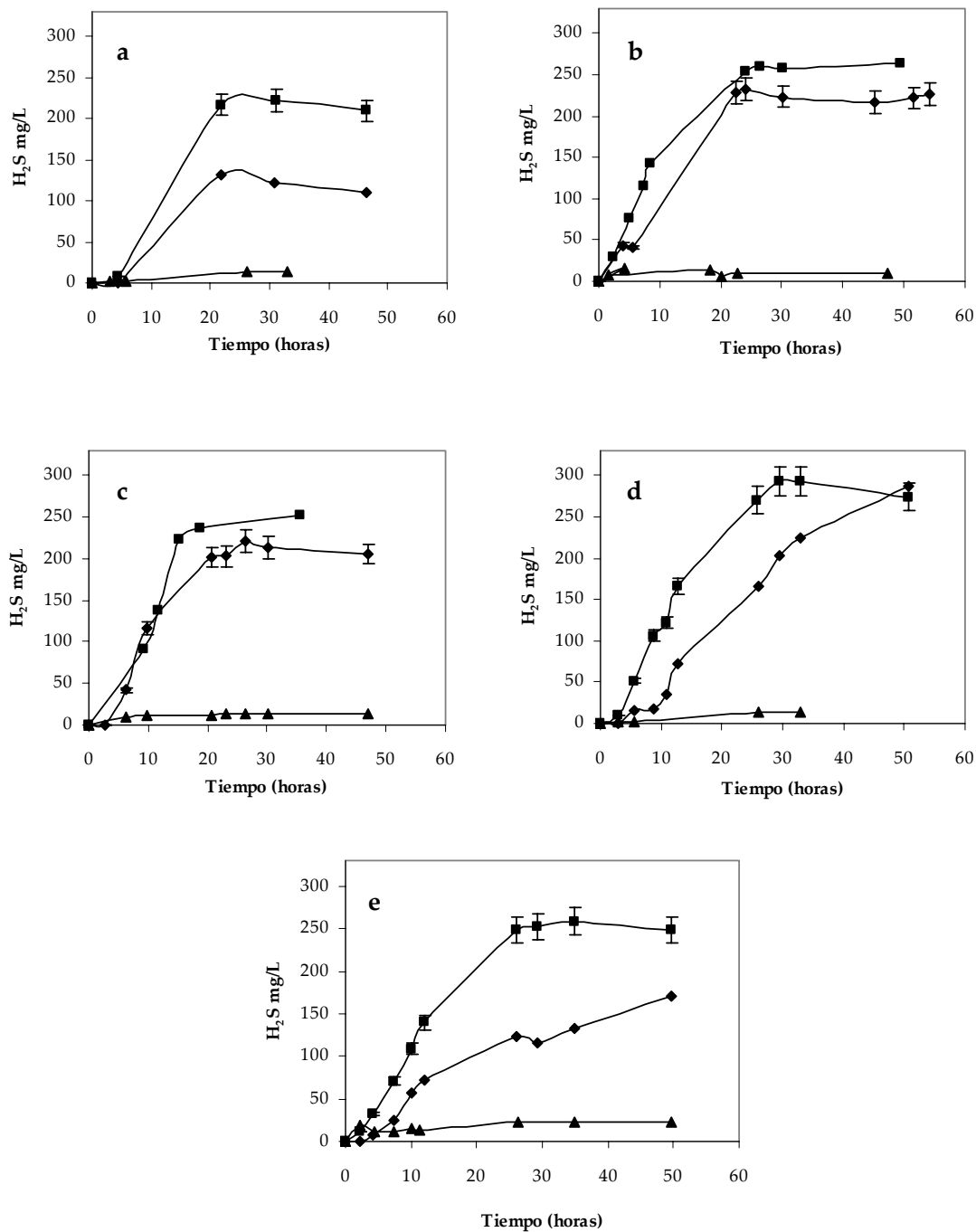


Figura 4.10. Perfiles de producción de sulfuro disuelto para la biomasa adherida con diferentes sustratos. Etanol (■), lactato (♦) y acetato (▲) a los 15 (a), 33 (b), 54 (c), 82 (d) y 105 días (e) de operación del reactor LFI.

concentraciones de diferentes sustratos, el acetato es poco utilizado (Schauder *et al.*, 1986). Por ejemplo, *Desulfotomaculum acetoxidans* que fue descrito inicialmente como BSR utilizadora de acetato, tiene una naturaleza muy versátil y es capaz de utilizar acetato, butirato, otros ácidos grasos volátiles y alcoholes. Se debe de considerar que las BSR utilizadoras de acetato, tales como *D. acetoxidans*, utilizan sustratos por los que tienen mayor afinidad tales como butirato en lugar de acetato cuando existe otro sustrato además del acetato en los reactores (Harada *et al.*, 1994).

Las velocidades de producción de sulfuro disuelto y la concentración de biomasa adherida al soporte en cada prueba de actividad son mostradas en la Figura 4.11. Es interesante observar nuevamente que la cantidad de biomasa adherida se fue reduciendo durante la operación del reactor hasta llegar a mantenerse aproximadamente constante después del día 82, sin embargo, la velocidad de producción de sulfuro no disminuyó para el caso del etanol e incluso aumentó para el acetato. Estos resultados en conjunto podrían sugerir una selección entre especies microbianas a lo largo de la operación del reactor y una presión de selección en la biomasa adherida al soporte, lo cual se ve reflejado en la disminución de la cantidad de biomasa adherida al soporte, pero que no se observa en la velocidad de producción de sulfuro. Celis-García *et al.* (2004) observaron resultados similares en ensayos de actividad sulfatorreductora en botellas serológicas con propionato con sustrato, esto debido a una mejor capacidad de inmovilización por parte de las BSR en un soporte plástico.

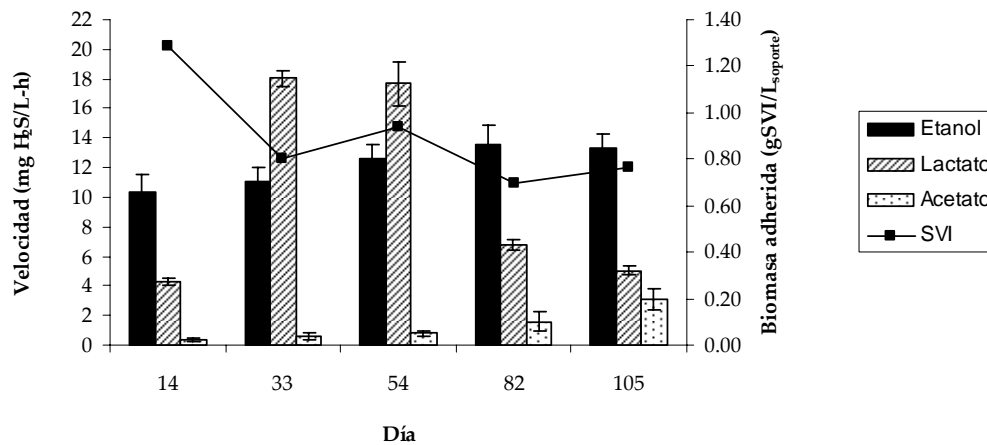


Figura 4.11. Velocidades de producción de sulfuro para la biopelícula inmovilizada utilizando etanol, lactato y acetato como sustrato y biomasa adherida en gSVI/L_{soporte} cuantificados a diferentes días de operación del reactor LFI.

Los valores de actividad sulfatorreductora para los tres sustratos fueron muy altos (Figura 4.12). Con etanol como sustrato se obtuvo una actividad de 5 g DQO-H₂S/g SSV-d en el día 14, que aumentó a 11.7 g DQO-H₂S/g SSV-d en el día 54 y se mantuvo casi constante en las mediciones subsiguientes. Con lactato como sustrato se obtuvo una actividad máxima en el día 33 que fue de 15.3 g DQO-H₂S/g SSV-d, luego disminuyó a 9.8 g DQO-H₂S/g SSV-d y en la medición del día 54 y al final fue de 4.5 g DQO-H₂S/g SSV-d en el día 105. En el caso de acetato como sustrato la actividad en el día 14 fue de 0.2 g DQO-H₂S/g SSV-d y aumentó considerablemente hasta 2.8 g DQO-H₂S/g SSV-d en el día 105.

Los valores de actividad sulfatorreductora obtenidos son mayores a los valores reportados por otros autores para biopelículas de reactores LFI, los cuales varían entre 0.8 y 4.76 g DQO/g SSV-d (Celis-García 2004; González-Blanco *et al.* 2005).

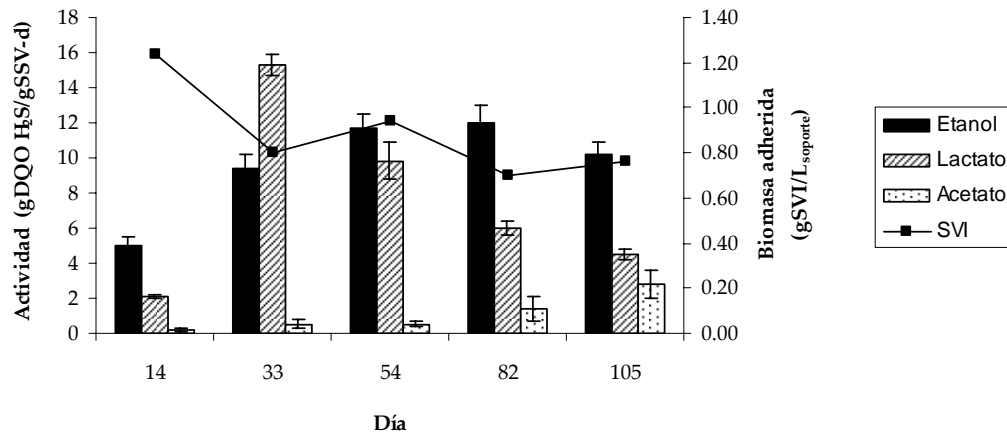


Figura 4.12. Evolución de las actividades sulfatorreductoras de la biopelícula inmovilizada utilizando etanol, lactato y acetato como sustrato y biomasa adherida en gSVI/L_{soporte} cuantificados a diferentes días de operación del reactor.

Los altos valores de actividad sulfatorreductora son el reflejo de la pequeña cantidad de sólidos volátiles inmovilizados en el soporte, pues éstos al ser divididos en la expresión de actividad específica generan un valor muy alto. Por ejemplo, las velocidades de producción de sulfuro para lactato en los días 33 y 54 fueron de 18 y 17.7 mg H₂S/L-h y los valores de sólidos volátiles inmovilizados para estos mismos días fueron 0.8 y 0.94 gSVI/L_{soporte}, respectivamente. Por lo tanto, al calcular la actividad, que es la velocidad de producción de sulfuro entre los SVI, se obtiene un valor de 15.32 para el día 33 y de 9.85 g DQO/gSSV-d para el día 54.

Los valores de actividad sugieren que el reactor puede llegar a tener un buen manejo de la carga orgánica con relativamente poca biomasa adherida, debido a que ésta es particularmente sulfatorreductora. Una explicación a estos valores altos de actividad es que las fuerzas hidrodinámicas que provocaron el desprendimiento de la biopelícula pudieron haber tenido un beneficio en la difusión del sustrato y en la selección ecológica (Liu y Tay, 2002). Estos resultados coinciden con otros previos que establecen que la biomasa inmovilizada en un

soporte de plástico tiene una alta capacidad de degradación de carga orgánica (Meraz *et al.*, 1996; Castilla *et al.*, 2000).

4.4 Comparación del desempeño de los reactores UASB y LFI

La comparación del desempeño del reactor LFI con respecto al UASB se hizo a partir de la operación en continuo, ya que se trató de imponer las mismas condiciones para ambos reactores.

Al analizar los datos obtenidos de los dos reactores, se puede observar que para el reactor UASB, se necesitaron más de 100 días de operación para que la producción de sulfuro disuelto total aumentara de 46 mg/L a 200 mg/L, mientras que para el reactor LFI se requirieron solo 60 días de operación en continuo para alcanzar dicho valor (Figura 4.13). Sin embargo, es importante mencionar que la carga orgánica del reactor UASB, cuando alcanzó una concentración de sulfuro disuelto total de 200 mg/L, era de 2 g DQO/L-d, mientras que la del reactor LFI era de 1 g DQO/L-d con la misma relación DQO/SO_4^{2-} de 0.6, lo que podría indicar una mayor actividad sulfatorreductora específica en el reactor LFI en comparación con el reactor UASB. Esta hipótesis también puede ser corroborada con la cantidad de DQO utilizada para la sulfatorreducción a los 60 días de operación en continuo de ambos reactores, ya que para el reactor UASB fue de 38.3% (Tabla 4.1), mientras que para el reactor LFI fue de 47.1% (Tabla 4.4).

Tomando en cuenta solo lo anterior podría decirse que el desempeño del reactor LFI como reactor sulfatorreductor es mejor que el desempeño del reactor UASB. Sin embargo, en el reactor LFI el cambio de la carga orgánica a etanol como sustrato único de alimentación tuvo efectos negativos provocando la disminución de la ECS de 32.7% al inicio del periodo B, a 13.4% al final de dicho periodo y la alcalinidad que disminuyó de 1625 a 400 mg $CaCO_3/L$ (Figura 4.5). Mientras que

para el reactor UASB, al tener primordialmente lactato como sustrato, no presentó disminuciones considerables ni en las eficiencias de remoción de DQO y conversión de sulfato ni en la alcalinidad.

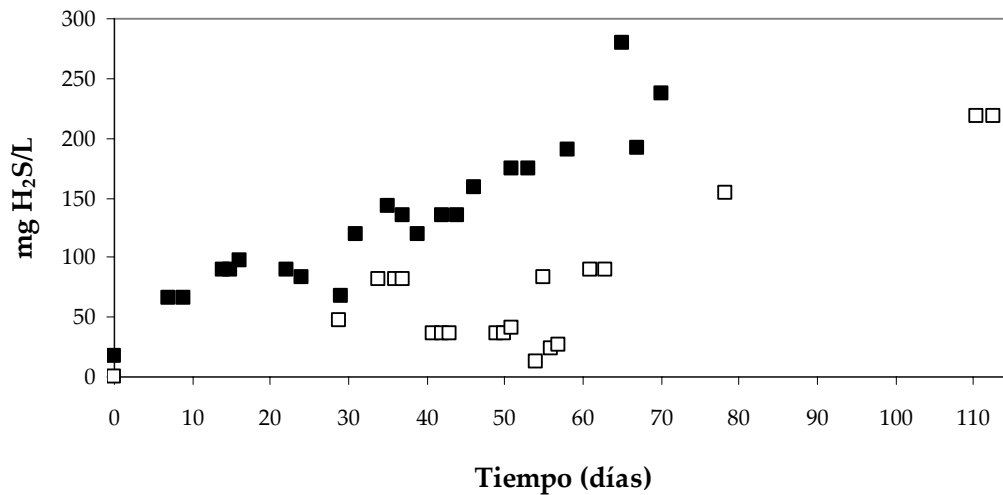


Figura 4.13. Aumento de la concentración de sulfuro disuelto total en el reactor UASB (□) y LFI (■) con respecto al tiempo de operación en continuo.

En términos generales, el reactor UASB no fue afectado negativamente ante los aumentos en las velocidades de carga y mostró ser más eficiente al remover DQO y sulfato que el reactor LFI. Se sabe que cuando se cuantifica la actividad específica anaerobia a partir de sustratos complejos (etanol y lactato) se evalúa también la participación de las bacterias acetogénicas, acidogénicas y hasta fermentativas, dependiendo de la complejidad del sustrato, por lo que se podría pensar que las remociones obtenidas en el reactor UASB tuvieron una mayor participación de otras bacterias diferentes a las BSR que en el reactor LFI. Sin embargo, tanto en el reactor LFI como en el UASB no se pudo alcanzar un proceso 100% sulfatorreductor. Kaksonen *et al.* (2003b) observaron que el cambio gradual de sustrato de etanol a lactato en 50 días no afectó significativamente el

funcionamiento de un reactor FBR sulfatorreductor a un TRH de 16 horas. Por lo que se podría pensar que el cambio de sustrato en este estudio, fue muy rápido, lo cual afectó el funcionamiento del reactor LFI.

Las actividades sulfatorreductoras realizadas con etanol para ambos reactores difieren en la velocidad de producción de sulfuro tal como se muestra en la Figura 4.14. Se puede observar una velocidad de producción de sulfuro más alta en la biopelícula del reactor LFI en comparación con el lodo granular del reactor UASB. Esto indicaría una mayor capacidad de producción de sulfuro y, además una actividad particularmente sulfatorreductora en el reactor LFI y, por parte del reactor UASB problemas de difusión entre el sustrato y la biomasa.

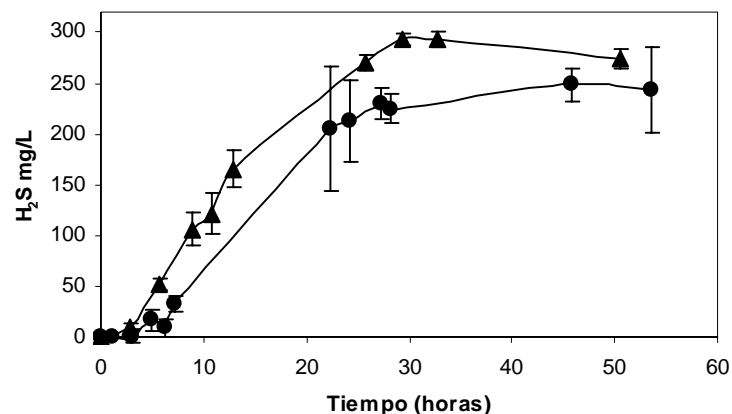


Figura 4.14. Perfiles de producción de sulfuro para el lodo granular (●) y para la biopelícula (▲) con etanol como sustrato, a las mismas condiciones de concentración de DQO inicial, pH y relación DQO/SO₄²⁻.

A pesar de tener valores más altos de actividad sulfatorreductora en la biopelícula del reactor LFI que en el UASB, esto no se ve reflejado en valores más altos de las eficiencias de remoción de DQO ni de conversión de sulfatos, debido posiblemente a la pequeña cantidad de biomasa adherida al soporte en el reactor LFI. Celis-García (2004) encontró en un estudio comparando un reactor LFI y un

UASB, ambos sulfatorreductores, que el reactor LFI no fue afectado negativamente ante los aumentos en las velocidades de carga y demostró ser más eficiente al remover DQO y sulfato que el reactor UASB. Explica que este comportamiento puede deberse a que la velocidad superficial aplicada al reactor LFI disminuyó la limitación de transferencia de masa en la superficie de la biopelícula (Guiot *et al.*, 1992), dando como resultado una mejor penetración del sustrato en la biopelícula y propiciando la proliferación de los microorganismos en la parte más cercana al soporte y tal vez permitiendo que se formara con más densidad de BSR. Sin embargo, el tiempo de operación de dicho reactor fue más largo (mas de 365 días), además utilizó AGV y lactato como sustratos, por lo que esto pudo propiciar una biopelícula mas densa y mejor adherida al soporte.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir de las mediciones de biomasa adherida al soporte en el reactor LFI se concluyó que el reactor había terminado la etapa de colonización alrededor de los días 82 y 105 de operación, ya que al ser medida la concentración de SVI del reactor en esos días no se presentaron variaciones considerables. La disminución de la cantidad de SVI se debió probablemente al esfuerzo cortante al cual estuvo sometida la biopelícula del reactor. El aumento de la biopelícula se debió a un crecimiento bacteriano en el soporte que vio reflejado en el aumento de la actividad sulfatorreductora. Sin embargo, puede ser que la biopelícula no aumente más su grosor debido a efectos de fricción entre partículas (Buffière y Moletta, 1999), pero se podrían dar uniones más fuertes que impidan el lavado de la biomasa.

Al comparar las velocidades de fluidificación mínimas de los soportes utilizados en reactores LFI se observó que son menores a las aplicadas en este estudio debido a fenómenos de superficie (superficies hidrofóbicas), baja densidad específica y tamaño de la partícula (García-Calderón et al., 1998). Sin embargo, se debe hacer más investigación en estos reactores para aclarar estos efectos; por ejemplo, acerca de la expansión del lecho y la cantidad de soporte que debe ser utilizado en el reactor, ya que en este caso, la cantidad de soporte utilizado ocupó el 25% del volumen total, pero otros autores reportan un 40% (Buffière *et al.*, 2000; Arnaiz *et al.*, 2005). Estas condiciones también varían la velocidad de fluidificación en el reactor. Los estudios muestran que se puede llevar a cabo exitosamente la sulfatorreducción en este reactor a una velocidad superficial de 13.9 m/h.

La operación en continuo del reactor LFI se caracterizó por ser inestable. Esto se debió probablemente a que al momento de comenzar la operación en continuo, aun se encontraba en la etapa de colonización del soporte. También se

debió al cambio de sustrato durante su operación, ya que fue en ese momento donde se observó un descenso considerable en las eficiencias de remoción de DQO y de conversión de sulfato. Además, las variaciones en la velocidad superficial implicaron variaciones en el esfuerzo cortante aplicado a la biopelícula. Por lo que, en el último periodo de operación en continuo la estrategia fue mantener las condiciones operacionales para que el reactor se estabilizara.

La actividad sulfatorreductora en el reactor LFI fue bastante alta en comparación con otras actividades reportadas y con respecto a la actividad metanogénica acetoclástica que fue nula desde el principio. Lo cual sugiere una presión de selección de la biomasa adherida que provocó que los microorganismos que crecieron en dicho soporte fueran preferentemente sulfatorreductores y, como consecuencia que la actividad aumentara.

Los valores bajos de actividad sulfatorreductora con acetato al inicio de la operación del reactor LFI podrían indicar una colonización preferencial del soporte por parte de las BSR capaces de oxidar incompletamente el etanol y lactato. Esto puede deberse a que las BSR que consumen acetato tienen tiempos de duplicación menores a los que tienen aquellas de metabolismo incompleto. Además es probable que las BSR utilizadoras de acetato tengan menor capacidad de adhesión al soporte. Estas observaciones han sido ya documentadas por otros autores y mencionadas en este estudio. Sin embargo, durante toda la operación del reactor LFI se observó un aumento gradual de dichas actividades con acetato que sugieren un crecimiento de las BSR utilizadoras de acetato en la biopelícula. La diferencia entre el bajo acetato consumido durante las pruebas de actividad sulfatorreductora y el acetato consumido en el reactor podría deberse a que las metanógenas pudieron estar favorecidas en el reactor debido a las diferencias en las constantes de afinidad por el sustrato que son 32.8 mg acetato/L para las metanógenas y 9.3 mg acetato/L para las BSR (Rittman y McCarty, 2001).

Los resultados obtenidos en la operación del reactor LFI mostraron que es un reactor adecuado para la sulfatorreducción, debido a que tiene una gran capacidad de selección entre especies microbianas, reflejado en la casi nula actividad metanogénica desde los primeros días de operación del reactor. Esta capacidad de selección se debe a las condiciones ambientales impuestas de TRH, velocidad descendente, carga orgánica, pH y tipo de inóculo entre otros (Liu y Tay, 2002).

Los resultados obtenidos al operar los reactores UASB y LFI bajo condiciones de sulfatorreducción mostraron diferencias notorias en las eficiencias de remoción de DQO y conversión de sulfato, debido probablemente al sustrato utilizado y a la cantidad de biomasa presente en forma de lodo granular para el reactor UASB y de biopelícula para el reactor LFI.

Con respecto a la biomasa, el reactor UASB mostró mayores eficiencias de remoción de DQO y de conversión de sulfato, debido a una mayor cantidad de biomasa presente en el reactor, sin embargo, al observar los valores de actividad en dicho reactor, se observó que fueron menores a las del reactor LFI, lo que sugiere la presencia de una biomasa con metabolismo predominantemente sulfatorreductor en el reactor LFI, indicando que se podría alcanzar mayores eficiencias cuando se de un mayor crecimiento de la biomasa en el reactor.

Uno de los objetivos principales de este estudio fue el acondicionar el sistema de tal modo que hubiera una buena actividad sulfatorreductora que generara sulfuros para que en un futuro fueran utilizados para precipitar metales. Sin embargo, se requieren hacer mayores estudios hidrodinámicos para completar este acercamiento. Además, aun falta incrementar el crecimiento de las poblaciones microbianas en la biopelícula y es probable que eso solo se alcance con el tiempo y las condiciones ambientales favorables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20ª edición. New York.
- Alcaraz, J.A. (2004). Biolixiviación de minerales sulfuro-ferrosos en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. Tesis doctoral, Área de biotecnología, Universidad de Colima. Colima, México.
- Arnaiz, C., Buffière, P., Elmaleh, S., Lebrato, J. y Moletta, R. (2003). Anaerobic digestion of dairy wastewater by inverse fluidization: the inverse fluidized bed and the inverse turbulent bed reactor. *Environ. Technol.* 24, 1431-1443.
- Arnaiz, C., Elmaleh, S., Lebrato, J. y Moletta, R. (2005). Start up of an anaerobic inverse turbulent bed reactor fed with wine distillery wastewater using pre-colonised bioparticles, *Wat. Sci. Tech.* 51(1), 153-158.
- Atkinson, B. (1981). Biological fluidized bed treatment of water and wastewater, P. F. Cooper and B. Atkinson, Eds., Ellis Horwood, Chichester, Reino Unido. p.p. 22.
- Beristain, C.R. (2004). *Eliminación anóxica de carbono, nitrógeno y azufre por medio de un reactor de lecho fluidificado Inverso*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, DF.
- Buffière, P., Bergeon, J. P. y Moletta, R. (2000). The inverse turbulent bed: a novel bioreactor for anaerobic treatment. *Wat. Res.* 34, 673-677.
- Buffière, P., Fonade, C. y Moletta, R. (1995). Continuous operation of a fluidized bed bioreactor for anaerobic digestion: residence time influence on degradation kinetics. *Biotechnol. Lett.* 17(8), 833-888.
- Buffière, P. y Moletta, R. (1999). Some hydrodynamic characteristics of inverse three phase fluidized-bed reactors. *Chem. Eng. Sci.* 54, 1233-1242.
- Castilla, P., Meraz, M., Monroy, O. y Noyola, A. (2000). Anaerobic treatment of low concentration waste water in an inverse fluidized bed reactor. *Wat. Sci. Tech.* 41(4-5), 245-251.
- 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.
- Celis-García, M. L. B., Ramírez, F., Revah, S., Razo-Flores, E. y Monroy O. (2004). Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: Influence of microbial immobilization type. *Environ. Technol.* 25, 1265-1275.
- Characklis, U. G., (1990). Biofilm process. En: Characklis, W. G., Marshall, K. C. (Eds.), *Biofilms*. Wiley, New York, p.p. 195-231.

- Christensen, B., Laake, M. y Lien, T. (1996). Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria: Results from a bench scale experiment. *Water Res.* 30, 1617-1624.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiol Methods.* 4, 33-36.
- Fox, P., Cuidan, M. y Bandy, J. (1990). A comparison of media types in acetate fed expanded-bed anaerobic reactors. *Water Res.* 24, 827-835.
- García-Calderon, D., Buffière, P., Moletta R. y Elmaleh, S. (1998). Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in down-flow fluidized bed, *Wat. Res.* 32 (12), 3593-3600.
- González-Blanco, Celis-García, L. B., Monroy, O. y Meraz, M. (2004), Inmovilización de un consorcio bacteriano en soporte plástico para la eliminación de compuestos azufrados. En: Proceedings VIII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia, 2-5 de octubre, Punta del Este, Uruguay.
- González, G., Ramírez, F. y Monroy, O. (1992). Development of biofilms in anaerobic reactor. *Biotechnol. Lett.* 14(2), 149-154.
- Harada, H., Uemura, S. y Momonoi, K., (1994). Interaction between sulfate reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Wat. Res.* 28, 355-367.
- Heijnen, J., Mulder, A., Enger, W. y Hoeks F. (1989). Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *Chem. Eng. J.* 41, B37-B50.
- Hilton, M.G. y Archer, D.B. (1988). Anaerobic digestion of a sulfate-rich molasses wastewater: inhibition of hydrogen sulfide production. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 885-888.
- Hulshoff Pol, L.W., van Lier, J.B. y Veenstra, S. (1995). Assignments: implementation full-scale UASB reactor. Memorias: *International course on anaerobic waste water treatment.* Julio 17-28. Wageningen Agricultural University-IHE Delft. Wageningen, Holanda.
- Isa Z, Grusenmeyer S, y Verstraete W. (1986). Sulphate reduction relative to methane production in high rate anaerobic digestion: technical aspects. *Appl Environ Microbiol.* 51, 572-579.
- Johnson, D. B. (2000). Biological removal of sulfurous compounds from inorganic wastewaters. En: Environmental technologies to treat sulfur pollution: principles and engineering (Lens, P. and Hulshoff Pol, L., eds.). International Association on Water Quality, London, p.p. 175-206.

- Kaksonen, A.H., Franzmann, P.D., Puhakka, J.A. (2004). Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity in ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 86, (3), 332-430.
- Kaksonen, H., Riekkola-Vanhanen, M.-L. y Puhakka, J. (2003). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Res.* 37, 255-266.
- Kalyuzhnyi, S., Fragoso, C. y Rodríguez, J. (1997). Biological Sulfate Reduction in a UASB Reactor Fed with Ethanol as the Electron Donor. *Microbiol.* 66, 5, 562-567.
- Kwok, W. K., Picioreanu, C., Ong, S. L., van Loosdrecht, M.C. M., Ng, W. J. y Heijnen, J. J. (1998). Influence of biomass production and detachment force on biofilms structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 400-7.
- Lens, P., Omil, F., Lema, J.M. y Hulshoff, P. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: Environmental Technologies to treat sulfur Pollution, Lens et Hulshoff Pol, IWA Publishing, London, 7, p.p. 153-173.
- Lens, P., Vallero, M., Esposito G. y Zandvoort, M. (2002). Perspectives of sulfate reducing bioreactors in enviromental biotechnology. *Rev Environ. Sci. Biotechnol.* 1, 311-325.
- Lens, P., Visser, A., Janssen, L.W., Hulshoff Pol, L. y Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate rich wastewater. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 28, 41-88.
- Lettinga, G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3-28.
- Lettinga, G., Roersma, R. y Grin, R. (1983). Anaerobic treatment of raw domestic sewage at ambient temperatures using a granular bed UASB reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1701-23.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., Zeeuw W. y Klapwijk, A. (1980). Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological waste water treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699-734.
- Liu, Y. y Tay, J.H., (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Wat. Res.* 36, 1653-1665.
- Maillacheruvu, K.Y. y Parkin G.F. (1996). Kinetics of growth, substrate utilization and sílfide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utilizers in anaerobic systems. *Wat. Env. Res.* 68, 1099-1106.
- Meraz, M., Monroy, O., Noyola, A. y Ilangovan, K. (1995). Studies on the dynamics of immobilization of anaerobic bacteria on plastic support. *Wat. Sci. Tech.* 32(8), 243-250.

- Metcalf y Eddy. (2003). *Wastewater Engineering, treatment y reuse*. Cuarta edición, McGraw Hill Inc., Nueva York.
- Mysca, J., y Svek, J. (1994). The distributive properties of a fluidized bed with biomass. *Wat. Res.* 28, 1653-1658.
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M. y Heijnen, J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J Biotechnol.* 80, 1-33.
- Nikolov, L. y Karamanev, D. (1987). Experimental study of the inverse fluidized bed biofilm reactor. *Canadian J Chem. Eng.* p.p. 65.
- Nordstrom, D. K. y Alpers, C. N. (1999), Geochemistry of acid mine waters. En: Plumlee, G.S., Logsdon, M.J. (eds), *The environmental geochemistry of mineral deposits*, Reviews in Economic Geology, SEG, Littleton, CO. E.E. U.U. A.A. 6, 133-156.
- O'Flaherty, V., Mahony, T., O'Kennedy, R. y Colleran, E. (1998). Effect of pH on growth kinetics and sulfide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulfate-reducing bacteria. *Process. Biochem.* 33(5), 555-569.
- Ohashi, A. y Harada, H. (1994). Adhesion strength of biofilm developed in an attached-growth reactor. *Wat. Sci. Tech.* 29, 1-10.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff, P. L. y Lettinga, G. (1996). Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochemistry.* 31(7), 699-710.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L. y Lettinga, G. (1997a). Characterization of biomass from a sulfidogenic, volatile fatty acid-degrading granular sludge reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 229-236.
- Omil, F., Visser, A., Hulshoff Pol, L. y Lettinga, G. (1997b). Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido en sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares. *Revista Afinidad*, Tomo LIV, 471.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. y Stams A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 119-136.
- Pamo, L., Aduvire, O. y Baretino, D. (2002), Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual y perspectivas de futuro. *Boletín Geológico y Minero.* 113, 3-21.
- Rintala, J. y Lettinga, G. (1992). Effects of temperature elevation from 37 to 55°C on anaerobic treatment of sulfate rich acidified wastewaters. *Environ. Technol.* 43, 249-258.
- Rinzema, A. y Lettinga, G. (1988). Anaerobic treatment of sulphate -containing wastewater. En: *Biotreatment Systems*. (D.L. Wise,Ed.) CRC Press, Boca Ratón, 3, 65 -109.
- Rittman B. E. y McCarty, P. L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw Hill Inc, New York.

- Schauder, R., Eikmanns, B., Thauer, R. K., Widdel, F. y Fuchs, F. (1986). Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.* 145, 162-172.
- Shieh, W. K. y Keenan, J. D. (1986). Fluidized bed biofilm reactor for wastewater treatment. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 33, 131-169.
- Shimodaira, C., y Yushina, Y. (1983) Biological wastewater treatment with down-flow fluidized bed reactor. En: Proc. of the 3rd Pacific Chemical Engineering Congress, Seoul, p.p. 237-242.
- Schmidt J.E. y Ahring B.K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 229-246.
- Tabak, H. (2003). Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals. En: The 19th Annual International Conference on Contaminated Soils, Sediments and Water, 20-23 octubre, University of Massachusetts, Amherst, E.E.U.U.A.A.
- Visser, A., Beekma, I., Van der Zee, F., Stams, A. J. M. y Lettinga, G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Applied. Microbiol. Biotechnol.* 40, 549-556.
- Visser, A., Hulshoff Pol, L., y Lettinga, G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci. and Technol.* 33 (3), 99 -110.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur reducing bacteria. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (ed. A.J.B. Zehnder). 469-586, John Wiley and Sons, New York.
- Yamaguchi, T., Harada, H., Hisano, T., Yamazaki, S., Tseng, I-Cheng. (1999). Process behavior of UASB reactor treating a wastewater containing high strength sulfate. *Wat. Res.* 33, 3182-3190.
- Yoda, M., Kitagawa, M. y Miyaji, Y. (1987). Long term competition between sulfate-reducing and methane producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Wat. Res.* 21, 1547-1556.
- Zehnder, A.J.B., Ingvorsen, K. and Marti, T. (1982) Microbiology of methane bacteria. En: *Anaerobic Digestion 1981* (Hughes, D.E., Stafford, D.A., Wheatley, B.I., Baader, W., Lettinga, G., Nyns, E.J., Verstraete, W. and Wentworth, R.L., Eds.), pp. 45-68. Elsevier Biomedical, New York.