



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

División de Ciencias Ambientales

**Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición  
por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor**

Tesis que presenta

**Blanca Magdalena González Silva**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS**

En la especialidad de Ciencias Ambientales

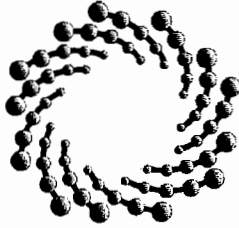
Codirectores de la tesis:

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

Asesor:

Dr. Roberto Briones Gallardo, IM-UASLP

**San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2007**



IPICYT

## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Blanca Magdalena González Silva** y aprobada el **12 de enero de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

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

---

Dr. Elías Razo Flores  
(Codirector de la tesis)

---

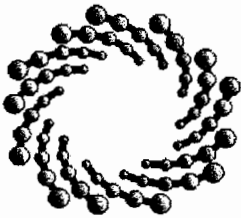
Dr. Roberto Briones Gallardo  
(Asesor de la tesis)

## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales 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 y la asesoría del Dr. Roberto Briones Gallardo.

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-189614) así como apoyo financiero para la elaboración de los experimentos, obtenido a través del proyecto CONACYT-Fondos Sectoriales (SEP-2004-C0146506).

El programa de Maestría en Ciencias Aplicadas con especialidad en Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica se encuentra inscrito dentro del Programa Institucional de Fomento al Posgrado 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 010 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 12 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 12:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Roberto Briones Gallardo</b>	<b>Secretario</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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.

**Blanca Magdalena González Silva**

sobre la Tesis intitulada:

*Determinación de Parámetros Cinéticos y de Inhibición por Sulfuro en un Reactor UASB Sulfato-Reductor*

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 14:00 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 12 días del mes enero de 2007.

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

**Dr. Marcial Bonilla M.**  
Secretario Académico



*A Ray por todo su amor y comprensión*

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi gratitud por la ayuda que he recibido de mis codirectores y asesores a lo largo de la elaboración de esta tesis. A la Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García por apoyarme y por compartir sus conocimientos conmigo. Al Dr. Roberto Briones Gallardo por estar siempre disponible para aclarar todas mis dudas. Al Dr. Elías Razo Flores por todo el apoyo brindado y al Dr. Francisco J. Cervantes Carrillo por su disponibilidad a contribuir en este trabajo de tesis.

Un agradecimiento muy especial a mi padre José Abel González Muñoz por su gran ejemplo y amor incondicional, a mi mamá Ma. del Refugio Silva Medina que siempre a estado pendiente de mi y que me ha dirigido con sus consejos, a mis hermanos Ricardo, Abel, Isaac y Mario que siempre me han otorgado su apoyo. A Raymundo Erique Torres Olguín por ser mi compañero y alentarme en los momentos difíciles.

Así como también quiero agradecer el apoyo de todos mis amigos y maestros especialmente a Karina, Marisol, Gustavo, Sandra, Denys, Raúl Paz, Sasi, Dulce Partida, Myrna Salinas y a la Dra. Sonia L. Arriaga.

# Índice

Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
Nomenclatura	xiv
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1    Justificación	10
1.2    Objetivos	10
<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>12</b>
2.1    Materiales	12
2.1.1 Reactor anaerobio UASB	12
2.1.2 Fuente de biomasa	13
2.1.3 Medios de cultivo	13
2.2    Métodos	15
2.2.1 Actividad metanogénica acetoclástica específica	15
2.2.2 Actividad sulfatorreductora	16
2.2.2.1 Actividad sulfatorreductora con diferentes concentraciones de etanol	17
2.2.3 Determinación de la cantidad de bacterias sulfatorreductoras en el lodo granular por la técnica del número más probable (NMP)	18
2.2.4 Operación del reactor UASB y determinación de los parámetros cinéticos	18
2.2.4.1 Etapa I: Determinación de los parámetros cinéticos $q_{max}$ y $K_s$ (Cinéticas de etanol)	19
2.2.4.2 Etapa II: Determinación de la constante de inhibición por sulfuro, $K_I$ (Cinéticas de sulfuro)	20
2.2.4.3 Etapa III: Determinación de la constante de inhibición aparente por hierro, $K_{I\ app}$ de $Fe^{+2}$ (Cinéticas de hierro)	21
2.2.5 Análisis	23
<b>3. Resultados</b>	<b>25</b>
3.1    Caracterización del lodo y actividades sulfatorreductoras	25
3.2    Operación del reactor UASB y determinación de parámetros cinéticos	29
3.2.1 Determinación de parámetros cinéticos en el reactor UASB operado en lote	31
3.2.1.1 Etapa I: Cinéticas con etanol	31
3.2.1.2 Etapa II: Cinéticas con sulfuro	33
3.2.1.3 Etapa III: Cinéticas con hierro	38

<b>4. Discusión</b>	45
4.1 Reactor en continuo	45
4.2 Etapa I: Cinéticas con etanol	46
4.3 Etapa II: Cinéticas con sulfuro	48
4.4 Etapa III: Cinéticas con Hierro	50
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b>	56
<b>6. Referencias bibliográficas</b>	57



## Índice de Tablas

Tabla 1.1	Contenido de metales encontrados en un drenado ácido de mina (DAM) localizado en Minatitlán, Colima (Modificada de Juárez, 2004).	1
Tabla 1.2	Efecto de sulfuro total (ST) y H <sub>2</sub> S para lodos anaerobios, en diferentes condiciones.	7
Tabla 2.1	Contenido del pulso para cada una de las cinéticas llevadas a cabo en el reactor UASB operado en lote. En cada caso el volumen del pulso se ajustaba a 140 mL con agua destilada.	14
Tabla 3.1	Tubos positivos y negativos de las tres últimas diluciones seriadas usadas para la determinación del NMP.	26
Tabla 3.2	Concentraciones de sulfuro total (ST), sulfuro no disociado (H <sub>2</sub> S), velocidad máxima de utilización de sustrato ( $q$ ), porcentaje de inhibición del sulfuro sobre la velocidad de utilización de sustrato.	36
Tabla 3.3	Concentraciones en el reactor de sulfuro antes del pulso e inicial al tiempo 0; hierro adicionado, inicial en solución, precipitado como FeS y residual final; porcentaje de remoción de hierro.	41
Tabla 3.4	Hierro inicial en solución, sulfuro no disociado teórico máximo y residual en solución y sulfuro no disociado experimental; velocidades de utilización de sustrato ( $q$ ) y velocidad máxima de utilización de sustrato en la prueba control sin hierro (0.25 g DQO/g SSV-día).	43

## Índice de figuras

Figura 1.1 El ciclo biológico del azufre (Visser, 1995).	2
Figura 1.2 Esquema de la degradación anaerobia de compuestos orgánicos en la presencia de sulfato. C2 = compuestos orgánicos de 2 carbonos (Lens <i>et al.</i> , 2000).	4
Figura 1.3 Relación entre las especies de sulfuro de hidrógeno y pH (Moosa y Harrison, 2006).	6
Figura 2.1 Representación esquemática del reactor UASB operado en flujo continuo (A) y operado en lote (B).	12
Figura 2.2 Representación esquemática del equilibrio de la fase gaseosa en las botellas con la presión atmosférica (A) y cuantificación de metano para la determinación de la actividad metanogénica específica (B).	16
Figura 2.3 Diagrama de pE contra pH para un sistema Fe-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O. Las fases sólidas son Fe(OH) <sub>3</sub> (amorfo), FeCO <sub>3</sub> (siderita), Fe(OH) <sub>2</sub> (S), y Fe (S); CT = 10 <sup>-3</sup> M. Las líneas son calculadas para Fe (II) y Fe (III) = 10 <sup>-5</sup> M (25°C) (Stumm y Morgan, 1996).	22
Figura 3.1 Perfil de la producción de sulfuro por el lodo granular con etanol (A) y lactato (B) como fuente de sustrato. El pH de ambos experimentos fue de 5.5.	27
Figura 3.2 Ajuste matemático con la ecuación tipo Monod ( $f=a \cdot x/(b+x)$ ) de las actividades sulfatorreductoras obtenidas a partir de diferentes concentraciones de etanol. Los datos experimentales (●) se ajustaron al modelo con una R <sup>2</sup> = 0.98. El valor de a = 0.79 (P < 0.01) correspondiente a la ASR máxima, y b = 4.87 (P < 0.01) equivalente a la K <sub>s</sub> .	28
Figura 3.3 Desempeño del reactor UASB operado en flujo continuo y en estado pseudo-estacionario, entre las etapas en lote. A. Porcentaje de remoción de DQO (◆) y velocidad de carga orgánica impuesta (-). B. Concentración de sulfuro total en el efluente (▲) y pH en el efluente (●).	30
Figura 3.4 Cinéticas del consumo de DQO con respecto al tiempo con etanol como sustrato (g DQO-Etanol/L): 0.26 (■), 0.37 (□), 0.55 (●), 0.59 (○), 0.69 (-), 0.72 (◇), 0.80 (◆), 0.92 (Δ), 0.96 (▲), 1.62 (*) y 2.8 (+).	31
Figura 3.5 Comportamiento del pH (A) y alcalinidad de bicarbonato (B) al inicio (Δ) y final (▲) de cada una de las cinéticas independientes con etanol.	32
Figura 3.6 Modelación matemática con la ecuación tipo Monod ( $f=a \cdot x/(b+x)$ ) de las cinéticas con etanol llevadas a cabo en el reactor UASB operado en lote. Valores experimentales (●). El valor de a = 0.25g DQO/g SSV-día (P < 0.0001) correspondiente a la q <sub>max</sub> , y b = 0.18 g DQO/L (P > 0.05) equivalente a la K <sub>s</sub> .	33
Figura 3.7 Perfiles de consumo de etanol con respecto al tiempo con sulfuro como inhibidor, para 152 mg S <sup>2-</sup> /L (A), 255 mg S <sup>2-</sup> /L (B), 384 mg S <sup>2-</sup> /L (C) y 424 mg S <sup>2-</sup> /L (D).	34

- Figura 3.8 Comportamiento del pH (A) y alcalinidad de bicarbonato (B) al inicio ( $\Delta$ ) y final ( $\blacktriangle$ ) de cada una de las cinéticas independientes de sulfuro. 35
- Figura 3.9 Reducción de la velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) con el incremento de la concentración de sulfuro no disociado ( $H_2S$ ). Las líneas punteadas indican la concentración de  $H_2S$  que provoca la reducción del 50% de la velocidad de utilización de sustrato ( $IC_{50}$ ). 37
- Figura 3.10 Perfiles de concentración de hierro ( $Fe^{2+}$ ) residual ( $\blacklozenge$ ), sulfuro total ( $\diamond$ ), DQO ( $\blacktriangle$ ), y pH ( $\Delta$ ) para las siguientes concentraciones de hierro (mM): A y B 3.51; C y D 6.26; E y F 7.65; G y H 8.12. 39
- Figura 3.11 Diagrama de potencial redox (Eh) contra pH para un sistema Fe C-S- $H_2O$ . Las fases sólidas son  $Fe(OH)_3$ , y Fe (S). La fase sólida de  $FeCO_3$  no fue significativa. 40
- Figura 3.12 Valor de  $q$  para la prueba control (0.25 g DQO/g SSV-día) y perfil de la velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) con el incremento de la concentración de hierro inicial en solución. Las líneas punteadas indican la concentración de hierro que provoca la reducción del 50% de la velocidad de utilización de sustrato máxima ( $IC_{50\ app}$ ). 43

**González Silva, Blanca Magdalena (2007). Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

**Resumen**

Las características principales de los drenajes ácidos de minas (DAM) son la alta concentración de sulfato (hasta 110 mM), metales disueltos, principalmente hierro (hasta 91 mM) y un pH entre 2-3. Para la remediación de los DAM la sulfatorreducción es una alternativa atractiva ya que involucra la producción biológica de sulfuro de hidrógeno, precipitación de los sulfuros metálicos y neutralización del agua con la alcalinidad producida por el metabolismo microbiano. El tratamiento de los DAM por sulfatorreducción requiere el adecuado conocimiento y modelación de datos cinéticos, ya que proporcionan la base para comprender el efecto que tienen los compuestos inhibitorios sobre el proceso. El sulfuro de hidrógeno no disociado ( $H_2S$ ) es la forma de sulfuro más tóxica hacia las BSR debido a que puede penetrar la membrana celular. En el mismo sentido, los metales pesados pueden ser inhibitorios o tóxicos para las bacterias sulfatorreductoras (BSR), ya que afectan su crecimiento y actividad metabólica debido a que reaccionan con grupos sulfhidrilo (-SH) y remplazan cofactores. La inhibición que el sulfuro y los metales provocan sobre los microorganismos es de tipo no competitivo, en la cual el inhibidor reduce la velocidad máxima específica de utilización de sustrato ( $q_{max}$ ), pero no altera la constante de afinidad por sustrato ( $K_s$ ). Debido a que el hierro es el metal más abundante en los DAM, su estudio es de gran importancia, por lo que es necesaria una mejor comprensión de la relación entre el hierro y la sulfatorreducción para emplear efectivamente este proceso en el tratamiento de los DAM.

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto inhibitorio del sulfuro y del hierro sobre el proceso sulfatorreductor en consorcios anaerobios, a partir de la determinación de los parámetros cinéticos:  $q_{max}$ ,  $K_s$ , constante de inhibición por sulfuro ( $K_I$ ) y constante aparente de inhibición por hierro ( $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$ ). Se utilizó un reactor UASB que se operó bajo dos regímenes alternadamente, en lote para la determinación de las cinéticas y en continuo entre cada uno de los lotes. La operación del reactor en lote se llevó a cabo en 3 etapas: en la etapa I se determinaron  $q_{max}$  y  $K_s$ ; en la etapa II se hicieron pruebas de inhibición con sulfuro para determinar la  $K_I$  y en la etapa III la adición de diferentes concentraciones de hierro permitió determinar la  $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$ .

Los resultados de la operación del reactor en continuo indicaron que el porcentaje de remoción de materia orgánica (medida como demanda química de oxígeno, DQO) aumentó desde 80 % (etapa I) hasta alcanzar más de 95% (etapa III). Los resultados de las cinéticas de etanol se ajustaron al modelo de Monod, obteniéndose una  $q_{max}$  de 0.25 g DQO/g SSV-día y una  $K_s$  de 86.2 mg/L. Los resultados de las cinéticas de sulfuro fueron ajustados por mínimos cuadrados a un modelo de inhibición no competitivo, determinándose la constante de inhibición por sulfuro  $K_I$  de sulfuro total y de  $H_2S$  con valores de 240 y 199 mg/L, respectivamente. También se determinó la concentración de sulfuro inhibitoria que causó la reducción del 50% de la  $q_{max}$ , cuyo valor estuvo entre 325 y 360 mg  $H_2S$ /L. Los resultados de las cinéticas con sulfuro indicaron que la inhibición de las BSR fue debida principalmente al sulfuro en forma de  $H_2S$ . En las cinéticas de hierro se determinó la constante de inhibición aparente que causó la reducción del 50% de la velocidad de utilización de sustrato, su valor fue de 8 mM. El ajuste del modelo de inhibición no competitivo a los resultados de las cinéticas con hierro determinó el valor de la constante de inhibición aparente por hierro que fue de 10.28 mM. La presencia del hierro en solución (3.5 a 7.6 mM) dentro del sistema, provocó la atenuación del efecto inhibitorio del sulfuro debido a la precipitación del hierro con el sulfuro biogénico al formarse sulfuro ferroso ( $FeS$ ), favoreciendo la sulfatorreducción porque permitió un aumento en las velocidades de utilización de sustrato ( $q$ ) de la mayoría de ensayos a los que se le adicionó hierro, al ser comparadas con la prueba control sin la adición de hierro. Sin embargo se observó una tendencia de disminución en los valores de  $q$ , que podría estar asociada a un efecto inhibitorio combinado del sulfuro y hierro en solución.

**González Silva, Blanca Magdalena (2007). Determination of the kinetic and inhibition parameters by sulfide in a sulfate reducing UASB reactor. M. Sc. Thesis. Institute for Scientific and Technological Research of San Luis Potosi. Mexico.**

**Abstract**

The main characteristics of the acid mine drainages (AMD) are high concentrations of sulfate (up to 110mM), dissolved metals, mainly iron (up to 91mM), and low pH (2-3). The remediation of AMD by sulfate reduction is an attractive alternative treatment because is a bioprocess based on biological hydrogen sulfide production, followed by metal sulfide precipitation and neutralization of the water by the alkalinity produced by the microbial metabolism.

The treatment of AMD by sulfate reduction requires knowledge of the kinetic data and its modeling, since they provide the basis for the understanding of the effect that the inhibitory compounds could have over the process. The undissociated hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) is generally assumed as the main toxic form of sulfide, because only neutral molecules permeate the cell membrane. In the same way, heavy metals can inhibit or be toxic for the sulfate reducing bacteria (SRB) and can cause a potentially negative impact on the growth and activity, because they may react with sulfhydryl groups (-SH) and replace cofactors. The type of inhibition that sulfide and metals cause over the microorganisms is non competitive; in which the inhibitor reduces the maximum specific rate of substrate utilization ( $q_{max}$ ), but does not alter the substrate affinity constant ( $K_s$ ).

The study of iron inhibition becomes important due to its abundance in AMD; thus, it is necessary a better understanding of the relationship between iron and sulfate reduction to effectively employ this process in the treatment of AMD.

The objective of this thesis was to investigate the inhibitory effect of sulfide and iron over the sulfate reduction process using anaerobic consortia and to determine the kinetic parameters:  $q_{max}$ ,  $K_s$ , sulfide inhibition constant ( $K_I$ ) and iron inhibition constant ( $K_{I\ app}$  of  $Fe^{+2}$ ). An UASB reactor was used for the experiments and was operated under two regimes, in batch for the determination of the kinetic parameters and in continuous between each batch. The batch operation was performed in three stages: in stage I,  $q_{max}$  and  $K_s$  were determined; in stage II, assays with sulfide were performed to determine its inhibition constant  $K_I$  and in stage III, the addition of different concentrations of iron allowed the determination of the apparent inhibition constant caused by iron ( $K_{I\ app}$  of  $Fe^{+2}$ ).

The results of the continuous operation indicated that the removal percentage of organic matter (measured as chemical oxygen demand, COD) increased from 80 % (stage I) to more than 95 % (stage III). The results of the kinetics performed with ethanol were adjusted to a Monod model, which determined a  $q_{max}$  of 0.25 g COD/g VSS-day and a  $K_s$  of 86.2 mg/L. The results obtained in the experiments performed with sulfide as inhibitor were adjusted to a non competitive inhibition model by least squares and determined the inhibition constants  $K_I$  for total sulfide and  $H_2S$  of 240 and 199 mg/L, respectively. It was also calculated the inhibitory concentration that caused a 50% reduction on the  $q_{max}$ , determined in the assay without sulfide; and its value was 8 mM. The adjustment of the results obtained from the experiments with iron to the non competitive model yielded a value of 10.28 mM ( $K_{I\ app}$  of  $Fe^{+2}$ ). The presence of iron in solution (3.5 to 7.6 mM) caused an attenuation of the inhibitory effect of sulfide, due to the precipitation of the iron with the biogenic sulfide in the form of ferric sulfide ( $FeS$ ); this situation favored the sulfate reduction process because allowed an increase of the substrate utilization rates in the majority of the experiments to which iron was added, when compared to the control assay without the addition of iron. However, a decrease in the substrate utilization rates was also found and could be associated to a combined inhibitory effect caused by sulfide and iron in solution.

## NOMENCLATURA

<b>BSR</b>	Bacterias sulfatorreductoras
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración de sulfuro que reduce en 50% la velocidad de utilización de sustrato
<b>CI<sub>50app</sub></b>	Concentración aparente de hierro que reduce en 50% la velocidad de utilización de sustrato
<b>DAM</b>	Drenaje ácido de minas
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro de hidrógeno no disociado
<b>HS<sup>-</sup></b>	Sulfuro disociado
<b>K<sub>I app</sub></b>	Constante aparente de inhibición por hierro
<b>K<sub>I</sub></b>	Constante de inhibición por sulfuro
<b>K<sub>s</sub></b>	Constante de afinidad por sustrato
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>q</b>	Velocidad específica de utilización de sustrato (g DQO/g SSV día)
<b>q<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima específica de utilización de sustrato (g DQO/g SSV día)
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles
<b>ST</b>	Sulfuro total
<b>TRH</b>	Tiempo de retención hidráulica
<b>UASB</b>	Upflow anaerobic sludge blanket (lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente)

# 1. Introducción

Los drenajes ácidos de minas (DAM) son una fuente de contaminación importante al medio ambiente, ya que provocan un fuerte impacto al depositarse en ecosistemas terrestres y acuáticos, debido a que contienen altos niveles de metales, sulfato y pH ácido (Jong y Parry, 2006). La composición química de los DAM es altamente variable, sin embargo, las principales características encontradas en ellos son las elevadas concentraciones de hierro (hasta 91mM) y sulfato (hasta 110mM), y los bajos valores de pH (2-3) (Johnson, 2000). Además también se pueden encontrar otros metales como los que se muestran en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Contenido de metales encontrados en un drenaje ácido de mina (DAM) localizado en Minatitlán, Colima (Modificada de Juárez, 2004).

<b>Metal</b>	<b>Concentración (mM)</b>
Cd	$4.4 \times 10^{-4}$ a 1.25
Mn	0.02 a 2.70
Zn	$1.53 \times 10^{-4}$ a 0.26
Cu	$1.57 \times 10^{-4}$ a 0.088
Pb	$2.4 \times 10^{-3}$ a 0.44

La aplicación de un tratamiento efectivo con el fin de remover los principales contaminantes y neutralizar la corriente del DAM es necesaria antes de que ésta sea depositada en un cuerpo receptor. En este sentido, la sulfatorreducción es una alternativa atractiva debido a que su principal ventaja sobre la neutralización química y precipitación, se basa en la producción biológica de sulfuro de hidrógeno [Ecuación 1.1], precipitación de los sulfuros metálicos [Ecuación 1.2] y la neutralización del agua con la alcalinidad producida por el metabolismo microbiano [Ecuación 1.3] (Kaksonen *et al.*, 2003a).



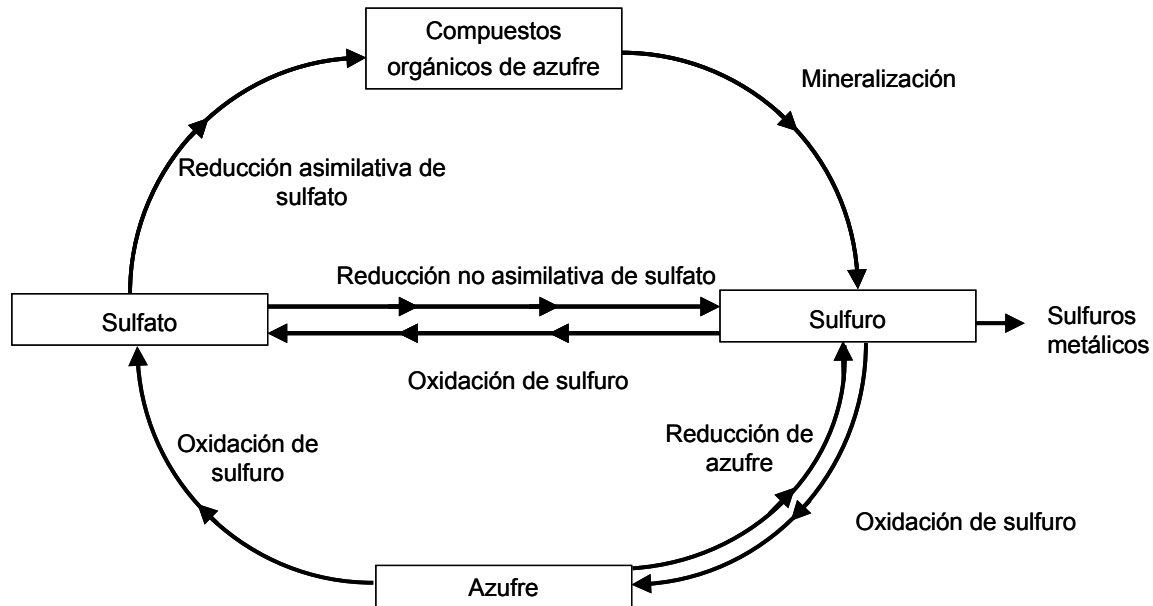
donde:  $2\text{CH}_2\text{O}$  = donador de electrones



donde:  $\text{M}^{2+}$  = ión metálico, p. ej.  $\text{Fe}^{2+}$



La sulfatorreducción forma parte del ciclo del azufre y se lleva a cabo en la parte reductiva del mismo. El ciclo biológico del azufre se muestra esquemáticamente en la Figura 1.1.



**Figura 1.1** El ciclo biológico del azufre (Visser, 1995).

Los principales pasos del ciclo biológico del azufre son: 1) Reducción asimilativa de sulfato: en este proceso el sulfato es usado como fuente de azufre para la biosíntesis de compuestos orgánicos de azufre en plantas, hongos y microorganismos; 2) Mineralización: en esta etapa la desintegración de la materia orgánica de las plantas o microorganismos provoca la formación de sulfuro. El sulfuro producido puede ser oxidado o puede precipitar con metales pesados; 3) Oxidación del sulfuro: Se lleva a cabo bajo condiciones aerobias o anóxicas en presencia de nitrato. En presencia de oxígeno o nitrato las bacterias sulfoxidantes oxidan el sulfuro hasta azufre o sulfato. Los electrones del sulfuro son usados para reducir el oxígeno o nitrato a  $H_2O$  y  $N_2$ , respectivamente. Los electrones pueden ser usados también para la reducción de  $CO_2$  bajo condiciones anaerobias y se lleva a cabo por bacterias sulfuro oxidantes fototróficas, estas bacterias usan los electrones del sulfuro para la reducción y asimilación del  $CO_2$ ; 4) Reducción no asimilativa de azufre: En esta etapa ocurre la reducción biológica de azufre elemental a sulfuro. Esta reacción se lleva a cabo



por la acción de las bacterias reductoras del azufre; 5) Reducción no asimilativa de sulfato o sulfatorreducción: La reducción biológica de sulfato a sulfuro es llevada a cabo por las bacterias sulfatorreductoras (BSR) (Visser, 1995).

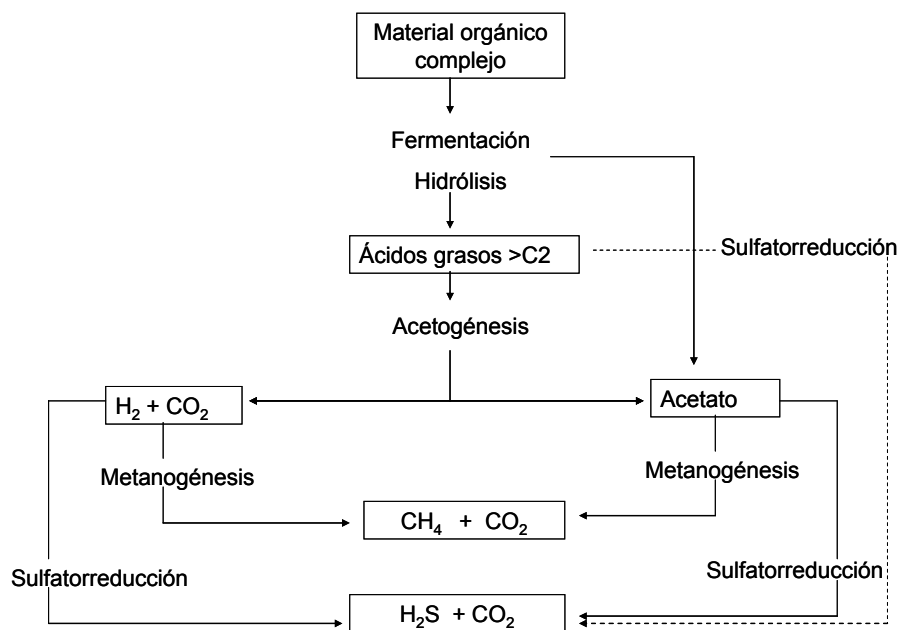
Las BSR son microorganismos anaerobios que usan sulfato como agente oxidante o aceptor de electrones. Pueden crecer heterotróficamente usando pequeñas moléculas orgánicas y autotróficamente usando hidrógeno como donador de electrones y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Las BSR son conocidas por estar presentes en consorcios complejos de microorganismos involucrados en el proceso de digestión anaerobia, usado para el tratamiento de aguas residuales (Nagpal *et al.*, 2000). Las BSR pueden ser divididas en dos grupos principales: 1) BSR oxidadoras incompletas de sustrato que generan acetato como producto final. Este grupo contiene a los géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium*. Estas BSR utilizan lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos como fuente de carbono y energía para reducir el sulfato a sulfuro. 2) BSR oxidadoras completas de sustrato a dióxido de carbono. Este grupo está compuesto por *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium*; todos estos géneros se especializan en la oxidación de ácidos grasos, especialmente acetato (Visser, 1995; Nagpal *et al.*, 2000).

Durante el tratamiento anaerobio de aguas que contienen altos niveles de sulfato, las BSR compiten con los microorganismos metanogénicos por los sustratos como hidrógeno y acetato y con las bacterias acetogénicas por sustratos intermediarios tales como ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta y alcoholes (Figura 1.2). El resultado de esta competencia es importante porque puede determinar la cantidad producida de sulfuro y metano, como productos finales del proceso de digestión anaerobia (Lens *et al.*, 2000).

La digestión anaerobia es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas como se muestra en la Figura 1.2. 1) Hidrólisis: Ocurre la desintegración de la materia orgánica compleja e insoluble. En este paso los carbohidratos, proteínas y lípidos son hidrolizados a azúcares monoméricos, aminoácidos, polioles y ácidos grasos de cadena larga. 2) Acidogénesis: se lleva a cabo la fermentación de compuestos solubles (azúcares, aminoácidos y polioles) a AGV, hidrógeno, dióxido de carbono y pequeñas cantidades de etanol y ácido láctico. 3) Acetogénesis: consiste en la conversión de AGV a acetato e hidrógeno. 4) Metanogénesis: Es la formación de metano por la descarboxilación de acetato

por microorganismos metanogénicos acetotróficos y por la hidrogenación de dióxido de carbono por microorganismos hidrogenotróficos.

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



**Figura 1.2** Esquema de la degradación anaerobia de compuestos orgánicos en presencia de sulfato. C2 = compuestos orgánicos de 2 carbonos (Lens *et al.*, 2000).

Hay dos procesos críticos que ocurren en sistemas complejos que involucran la fermentación, metanogénesis y sulfatorreducción. Uno es la competencia entre las BSR, microorganismos metanogénicos y fermentadores por el donador de electrones y otro es la inhibición de la actividad bacteriana por especies de sulfuro (Maillacheruvu y Parkin, 1996).

La sulfatorreducción ha sido estudiada en varios tipos de reactores tales como los completamente agitados, reactor de cama de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en Inglés), reactor híbrido y reactor de lecho fluidificado (FBR) (Kaksonen *et al.*, 2003b). Las aguas residuales que contienen sulfato han sido tratadas satisfactoriamente

en reactores UASB. Las características principales de los reactores UASB son la alta concentración de biomasa activa, tiempos de retención hidráulico (TRH) cortos, tiempo de retención de sólidos desacoplado al TRH y la formación de lodo granular con gran capacidad de sedimentación (Oude Elferik *et al.*, 1994).

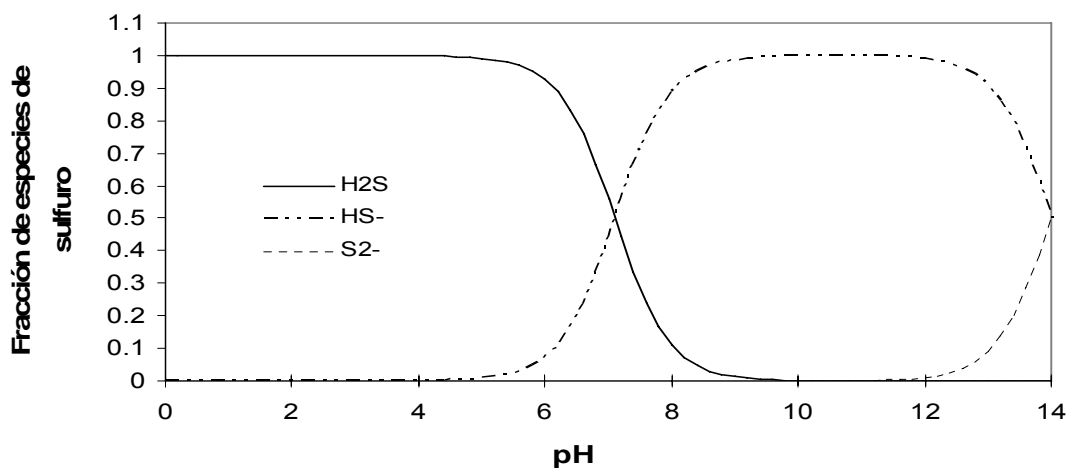
En los reactores UASB se pueden distinguir tres compartimientos: 1) cama de lodo granular, 2) zona de fluidificación y 3) separador sólido-líquido-gas. La cama de lodo está localizada en el fondo del reactor. El agua residual se bombea desde el fondo del reactor y pasa hacia arriba a través de la cama de lodo, en donde los compuestos orgánicos son biológicamente degradados y se produce biogás ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ). Debido a la producción de biogás en la cama de lodo se desarrolla una zona “fluidificada”, en la cual toma lugar la mayor degradación biológica. El biogás es separado del líquido en el separador sólido-líquido-gas. En los reactores UASB, la biomasa se retiene como agregados, llamados gránulos, formados por la auto-inmovilización natural de las bacterias, este tipo de inmovilización no emplea ningún tipo de material de soporte. La formación y estabilidad de los gránulos es esencial para la operación exitosa de este tipo de reactores (Schmidt y Ahring, 1995).

El tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato y metales pesados, tales como los DAM, aguas residuales del procesamiento de minerales y aguas residuales de tenerías (Nagpal *et al.*, 2000), puede resultar afectado por la potencial toxicidad debida a la generación de sulfuro, como producto final de la sulfatorreducción, ya que puede causar fallas en el sistema de tratamiento.

Por lo tanto, para tratar los DAM por sulfatorreducción, se requiere del adecuado conocimiento y modelación de datos cinéticos, ya que proporcionan la base para comprender el efecto que tienen los compuestos inhibitorios sobre el proceso (Moosa y Harrison, 2006). El sulfuro, como producto de la reducción de sulfato, es un agente inhibitor sobre el proceso (Utgikar *et al.*, 2001; Greben *et al.*, 2005; Maillacheruvu *et al.*, 1993). De igual forma se ha reportado que los metales pesados son agentes inhibitorios y tóxicos sobre los microorganismos anaerobios incluyendo las bacterias sulfatorreductoras (Karri *et al.*, 2006; Utgikar *et al.*, 2004).

El sulfuro de hidrógeno no disociado ( $\text{H}_2\text{S}$ ) es la forma de sulfuro más tóxica hacia las BSR debido a que es una molécula neutra que puede penetrar la membrana celular

(Okabe *et al.*, 1995; Utgikar *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2004; Greben *et al.*, 2005). El efecto tóxico o inhibitorio del sulfuro está relacionado con la especiación y concentración del sulfuro sobre el proceso sulfatorreductor. El sulfuro de hidrógeno en ausencia de metales, puede disociarse de acuerdo a las reacciones dadas en las ecuaciones 1.4 y 1.5. En el intervalo de pH de 6 a 8, el sulfuro de hidrógeno existe en forma de H<sub>2</sub>S y sulfuro disociado (HS<sup>-</sup>) tal como se muestra en la Figura 1.3. A un pH menor de 6, domina la forma de sulfuro no disociado, y en un valor de pH cercano a 12 el sulfuro en forma de HS<sup>-</sup> se disocia en S<sup>2-</sup> (Moosa y Harrison, 2006).



**Figura 1.3** Relación entre las especies de sulfuro de hidrógeno y pH (Moosa y Harrison, 2006).

Como el primer valor de pK<sub>a</sub> del sulfuro de hidrógeno es alrededor de 7, pequeñas variaciones de pH en el intervalo de 6 a 8 pueden afectar significativamente la concentración del sulfuro de hidrógeno no disociado y causar grandes cambios en el grado de inhibición (Oude Elferink *et al.*, 1994).

En general, el efecto del sulfuro sobre el crecimiento y actividad de las BSR ha sido descrito cualitativamente por muchos autores pero sólo pocos estudios reportan cuantitativamente la cinética de inhibición del sulfuro (Kaksonen *et al.*, 2004).

Los datos disponibles de la sensibilidad de las BSR a la toxicidad del sulfuro en consorcios anaerobios son pocos y muchas veces contradictorios (Tabla 1.2). Por ejemplo, Kalyuzhnyi *et al.* (1997) encontraron que existió 100% de inhibición de la actividad de reducción de sulfato del lodo granular de un reactor UASB a concentraciones de 1700-9951 mg de sulfuro total (ST)/L y de 570-610 mg de sulfuro no disociado (H<sub>2</sub>S)/L en un intervalo de pH de 7.1 a 8 y etanol como sustrato.

**Tabla 1.2** Efecto de sulfuro total (ST) y H<sub>2</sub>S para lodos anaerobios, en diferentes condiciones.

Sustrato	Biomasa	Tipo de experimento	T (°C)	pH	ST (mg/L)	H <sub>2</sub> S (mg/L)	Efecto	Referencia
Etanol	Lodo granular	Reactor UASB en lote	35	7.1-8	1700-9951	570-610	100% inhibición de actividad sulfatorreductora	Kalyuzhnyi <i>et al.</i> , 1997
Acetato	Lodo granular	Reactor en lote	30	7	521	231	50% inhibición de utilización de sustrato	Visser <i>et al.</i> , 1996
Acetato	Lodo granular	botellas serológicas	37	6.8	374	196	50% inhibición del crecimiento	O'Flaherty <i>et al.</i> , 1998
Acetato	Lodo granular	botellas serológicas	35	7	699	270	50% inhibición de actividad sulfatorreductora	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1999
Acetato	Lodo granular	botellas serológicas	30	7.2-7.4	615	171	50% inhibición de actividad de utilización de sustrato	Visser <i>et al.</i> , 1996
Acetato, propionato, butirato	Lodo granular	botellas serológicas	35	7.5	1000		50% inhibición de actividad sulfatorreductora	Celis, 2004
Etanol	Biopelícula	FBR en lote	35	7	K <sub>i</sub> <sup>etanol</sup> = 248	K <sub>i</sub> <sup>H<sub>2</sub>S</sup> = 84	Inhibición actividad de utilización de sustrato	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004
Acetato	Biopelícula	FBR en lote	35	7	K <sub>i</sub> <sup>acetato</sup> = 356	K <sub>i</sub> <sup>H<sub>2</sub>S</sup> = 124	Inhibición actividad de utilización de sustrato	Kaksonen <i>et al.</i> , 2004

FBR: reactor de lecho fluidificado

K<sub>i</sub>: Constante de inhibición

Sin embargo, Celis (2004) en condiciones similares de temperatura y pH, pero con acetato, propionato y butirato como sustratos, reportó valores de 50% de inhibición de la actividad sulfatorreductora a la concentración de 1000 mg ST/L en botellas serológicas. Por otro lado, Visser *et al.* (1996) reportan un valor de 50% de inhibición de la actividad ( $CI_{50}$ ) para las BSR utilizadoras de acetato en lodo granular a concentraciones de 615 mg ST /L (171 mg  $H_2S$  /L) a pH 7.2-7.4 en un reactor operado en lote y de 521 mg ST/L (231 mg  $H_2S$  /L) a pH 7 en botellas serológicas. Finalmente, O'Flaherty *et al.* (1998) reportan el 50% de la inhibición sobre el crecimiento de las bacterias en lodo granular anaerobio, a las concentraciones de 374 mg ST/L y 196 mg  $H_2S$ /L, pero a un valor de pH de 6.8 en botellas serológicas.

En esta revisión se puede apreciar que no existe una correlación en los resultados de inhibición y toxicidad para las BSR, debido a que los experimentos no se realizaron en los mismos reactores, ni con el mismo inóculo, así como tampoco a las mismas condiciones de pH y temperatura.

Por otro lado, se reporta que los metales pesados pueden ser inhibitorios o tóxicos para los microorganismos en general (incluyendo BSR), ya que provocan un impacto potencialmente negativo sobre su crecimiento y actividad, debido principalmente a que los metales cuentan con la capacidad de desactivar enzimas al reaccionar con grupos funcionales sulfhidrilo (-SH) y remplazan metales que son constituyentes y centros activos de enzimas tales como los cofactores Cu(II), Zn(II), Co(II), Ni(II) (Sani *et al.*, 2001).

En cuanto a la toxicidad de los metales sobre las BSR, en la literatura se encuentran discrepancias en las concentraciones inhibitorias o tóxicas, pues los experimentos se han llevado a cabo en diferentes condiciones. De las investigaciones que describen concentraciones tóxicas de metales pesados sobre las BSR se encuentra la realizada por Hao *et al.* (1994), quienes trabajaron a pH de 7.6. Dichos autores estudiaron la toxicidad de metales con soluciones unimetal en un cultivo mixto de BSR, e indicaron que en pruebas con tubos de cultivo (medios sólidos) los metales Zn, Pb, Cu, Cd, Ni y Cr(III) fueron tóxicos a las concentraciones de: 0.61, 0.38, 0.06, 0.03, 0.179 y 1.15 mM; así como también reportan que en la pruebas en lote (medios líquidos), el Zn, Pb, Cu, Cd, Ni y Cr(III) fueron tóxicos a las concentraciones de: 0.38, 0.36, 0.31, 0.17, 0.35 y 1.15 mM respectivamente. Por otro lado, Cabrera *et al.* (2005) trabajaron a un pH de  $7.5 \pm 0.5$  y

reportaron que los metales Cr(III), Cu(II), Mn(II), Ni(II) y Zn(II) fueron tóxicos a concentraciones de 0.28, 0.06, 0.18, 0.14 y 0.30 mM respectivamente, para una cepa pura de *Desulfovibrio sp.* En la literatura también se reporta el desarrollo de estudios respirométricos para determinar el efecto tóxico e inhibitorio de metales pesados sobre las BSR consumidoras de hidrógeno; los resultados mostraron que el zinc y cobre fueron inhibitorios sobre las BSR en un rango de 0.15 y 0.39 mM, mientras que el hierro, en especies férricas o ferrosas, no fue tóxico a concentraciones mayores de 7.1 mM (Tabak *et al.*, 2004). Las investigaciones que reportan el papel que juega el hierro sobre la sulfatorreducción no son muchas. Sin embargo, debido a que es uno de los elementos que se encuentra en mayor concentración dentro de los DAM, su estudio es de gran importancia, por lo que es necesaria una mejor comprensión de la relación entre el hierro y la sulfatorreducción para emplear efectivamente este proceso en su tratamiento (Kalin *et al.*, 2006).

El sulfuro biogénico producido durante el proceso de sulfatorreducción forma complejos insolubles con los metales pesados resultando una precipitación de sulfuros metálicos, por lo que la toxicidad de los metales puede ser reducida en medios que contienen sulfuro (Karri *et al.*, 2006) y a su vez la toxicidad del sulfuro puede disminuir por la precipitación del sulfuro al adicionar metales tales como el hierro (Gupta *et al.*, 1994).

En esta tesis se realizaron estudios de inhibición por sulfuro y por hierro sobre el proceso sulfatorreductor, posteriormente los resultados fueron modelados usando una cinética tipo Monod [Ecuación 1.6] (Rittmann y McCarty, 2001), y a partir de los resultados de la modelación se estudió el efecto que tienen estos compuestos sobre la actividad de las BSR.

$$rut = -\frac{q_{max}S}{K_s + S} Xa \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Donde:

rut = Velocidad de utilización de sustrato (g DQO/L-día)

$q_{max}$  = Velocidad específica máxima de utilización de sustrato (g DQO/g SSV-día)

Xa = Concentración de biomasa (g SSV/L)

$K_s$  = Constante de afinidad por sustrato (g DQO/L)

S = Concentración de sustrato (g DQO/L)

Los estudios realizados con un cultivo puro de *Desulfovibrio desulfuricans* y con un cultivo mixto anaerobio demostraron que la inhibición por sulfuro sobre las BSR puede ser reversible y de tipo no competitivo, donde el inhibidor reduce la velocidad máxima específica de utilización de sustrato ( $q_{max}$ ) pero no altera la constante de afinidad por sustrato,  $K_s$  (Okabe *et al.*, 1995; Kaksonen *et al.*, 2004; Rittmann y McCarty, 2001). De igual manera, Bailey y Ollis (1986) reportan que los metales provocan sobre los microorganismos el mismo fenómeno de inhibición no competitivo que los sulfuros.

## 1.1 Justificación

Se ha reportado que el sulfuro causa toxicidad e inhibición sobre la sulfatorreducción, por lo tanto es necesario su estudio y modelación desde un punto de vista cinético en ausencia y presencia de metales tales como el hierro. Por otro lado, el hierro es el elemento que se encuentra en mayor concentración en un DAM y su efecto, en combinación con el del sulfuro, sobre la sulfatorreducción ha sido poco investigado. La aplicación de un modelo matemático a los datos cinéticos proporcionaría los elementos suficientes para el diseño y aplicación de un tratamiento biológico basado en la sulfatorreducción para el control del impacto ambiental asociado a los DAM.

## 1.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo de investigación fue estudiar el efecto que tiene el sulfuro y el hierro sobre la cinética del proceso sulfatorreductor en consorcios anaerobios. Para lograr lo anterior, el trabajo fue dividido en tres objetivos particulares:

- 1.- Determinar la velocidad específica máxima de utilización de sustrato ( $q_{max}$ ) y la constante de afinidad por sustrato ( $K_s$ ), a partir de la aplicación de un modelo tipo Monod a las cinéticas independientes llevadas a cabo en lote y con diferentes concentraciones de etanol como fuente de sustrato.
- 2.- Determinar el efecto que tiene el sulfuro sobre la  $q_{max}$ , y conocer la constante de inhibición por sulfuro ( $K_I$ ) por medio de la aplicación de un modelo de inhibición no



competitivo a las cinéticas independientes llevadas a cabo en lote y con diferentes concentraciones de sulfuro.

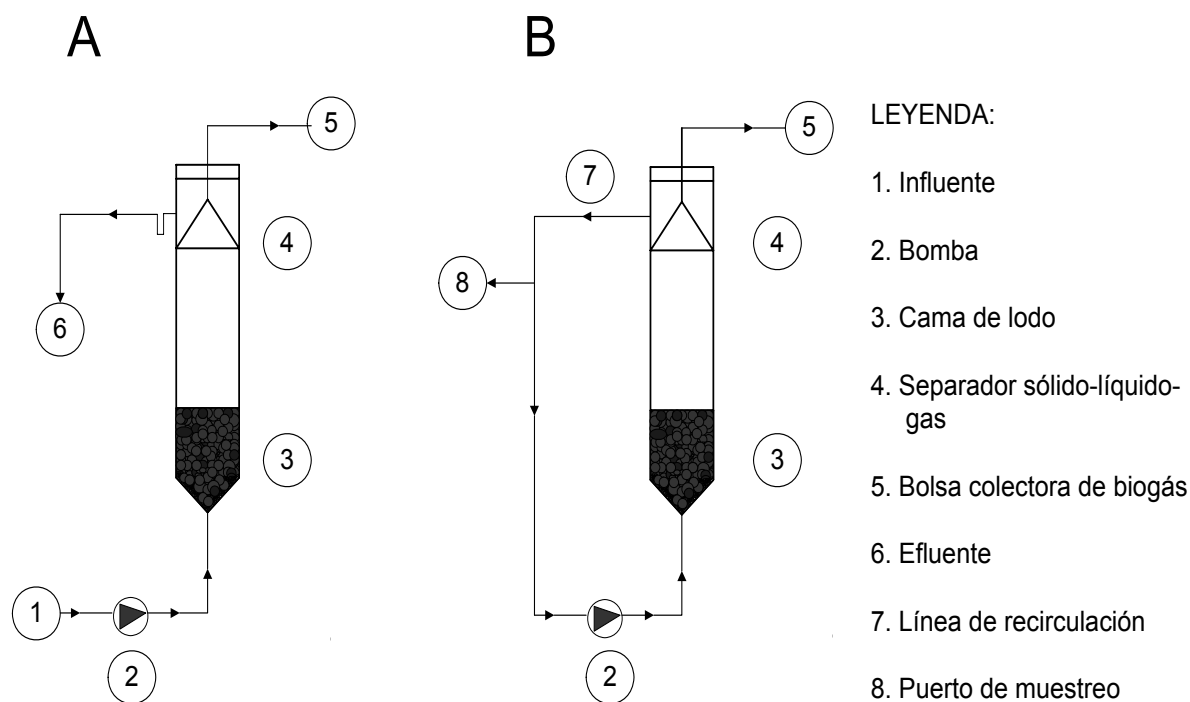
- 3.- Determinar el efecto que tiene el hierro sobre la  $q_{max}$ , y conocer la constante de inhibición aparente por hierro ( $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$ ), a partir de cinéticas independientes y aplicando un modelo de inhibición no competitivo.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Reactor anaerobio UASB

Se utilizó un reactor tipo UASB de vidrio con un diámetro interno de 5.8 cm, una longitud de 41.6 cm y un volumen de 820 mL (Figura 2.1 A).



**Figura 2.1** Representación esquemática del reactor UASB operado en flujo continuo (A) y operado en lote (B).

Este reactor se operó bajo dos diferentes regímenes: en lote para determinar los parámetros cinéticos ( $q_{max}$  y  $K_s$ ) y de inhibición por sulfuro ( $K_I$ ) y por hierro ( $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$ ); y en continuo entre cada uno de los lotes. Para alimentar el reactor o recircular el efluente se usó una bomba Masterflex modelo 7518-10. El biogás se colectaba en el separador sólido-

líquido-gas y mediante una manguera de latex pasaba del colector a una bolsa de tedlar de 300 mL de volumen.

### 2.1.2 Fuente de biomasa

La biomasa utilizada para inocular el reactor UASB fue lodo granular anaerobio sulfatorreductor proveniente de la industria papelera Eerbeek (Holanda) que estuvo almacenado a 4°C. El lodo se adaptó a sulfato por un periodo de tiempo aproximado de 103 días en otro reactor UASB de 1070 mL. Posteriormente, el reactor se inoculó con 154 g de lodo para alcanzar una concentración de 20 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV)/L en el reactor. Para caracterizar la biomasa se determinó la actividad metanogénica, la actividad sulfatorreductora, el número más probable (NMP) y los SSV.

### 2.1.3 Medios de cultivo

**Reactor UASB operado en flujo continuo.** Se alimentó con un medio basal que contenía los siguientes compuestos (g/L): extracto de levadura (0.02),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.3),  $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  (0.015),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2),  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.098),  $\text{KCl}$  (0.25) y una solución de elementos traza (0.1 mL/L) que contenía (g/L):  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.5),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.1), EDTA (0.50),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.062),  $\text{ZnCl}_2$  (0.070),  $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.036),  $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.40),  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.024),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.70),  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.020),  $\text{HCl}$  36% (1 mL) y resazurina (0.5) como indicador de condiciones redox. La fuente de carbono fue etanol (1 g DQO/L) y como fuente de sulfato se adicionó sulfato de sodio ( $\text{NaSO}_4$ ) a una relación másica DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.5 para asegurar una completa oxidación del etanol. Se usó una equivalencia teórica de 0.48 g de etanol por 1 g DQO (Ec. 2.1).

El potencial oxido-reducción (Eh) fue de -0.18V (con respecto al electrodo estándar de hidrógeno) y el pH del medio para la alimentación del reactor en flujo continuo se ajustaba a 5, ya que para la experimentación con hierro era necesario mantener el metal en solución, lo cual se logra a un pH cercano a 5 y un Eh de -0.18 V.

**Reactor UASB operado en lote.** Se adicionaba un pulso de medio de cultivo de 140 mL que variaba en su composición de acuerdo a la cinética que se desarrollaba (Tabla 2.1).

Para las cinéticas independientes con sulfuro y con hierro se usó una concentración fija de etanol correspondiente a la  $q_{max}$  (1 g DQO/L) que se obtuvo a partir de los experimentos cinéticos con etanol (ver sección 2.2.4.1).

El medio mineral era idéntico al de la operación en continuo, pero concentrado 10 veces (medio 10X) y además no se le adicionaba la solución de elementos traza para evitar interferencias por la formación de sulfuros metálicos. El pH del medio se ajustaba con HCl concentrado.

**Tabla 2.1** Contenido del pulso para cada una de las cinéticas llevadas a cabo en el reactor UASB operado en lote. En cada caso el volumen del pulso se ajustaba a 140 mL con agua destilada.

Cinética	Medio 10X (mL)	Etanol (g DQO/L)	DQO/ SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	pH	S <sup>2-</sup> (mg/L)	Fe <sup>+2</sup> (mM)
Etanol	14	0.26, 0.37, 0.55, 0.59, 0.69, 0.72, 0.80, 0.92, 0.96, 1.62, 2.8	0.5	3		
Sulfuro	14	1	0.5	3–3.5	152, 255, 344, 455	
Hierro	14	1	0.5	2.5		4.7, 7.4, 8.1, 8.5

### Actividades específicas

*Actividad metanogénica acetoclástica.* El medio mineral utilizado estuvo compuesto por (g/L): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.70), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.6), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.11), NH<sub>4</sub>Cl (0.28), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.006), extracto de levadura (0.02) y 1 mL/L de la solución de elementos traza. La fuente de sustrato fue acetato (2 g DQO/L) y el pH fue ajustado a 7 con NaHCO<sub>3</sub> ya que es un valor de pH óptimo para bacterias metanogénicas (Visser *et al.*, 1996). La equivalencia teórica que se usó para el acetato fue de 0.94 g de ácido acético por 1 g DQO (Ec. 2.1).

*Actividad sulfatorreductora.* El medio mineral se preparó idéntico al anterior, sólo que sin la adición de la solución de elementos traza y  $\text{NaHCO}_3$  para evitar la interferencia por posibles precipitaciones de carbonatos y sulfuros metálicos con el sulfuro biogénico. Se utilizó etanol como fuente de sustrato (2 g DQO/L).

### **Medio de cultivo para la determinación del número más probable (NMP)**

El medio para determinar el NMP del lodo granular fue el medio Postgate B (Goenka, 2005) modificado, que estuvo compuesto por:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.08 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/L), ácido láctico al 80% (2.4 mL/L), extracto de levadura (1 g/L), ácido ascórbico (0.1 g/L), cisteína (0.1 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 g/L), el pH se ajustó a 7 con NaOH y se adicionó agar (1.5 g/L) para tener un medio semisólido.

### **Buffer de fosfatos (PBS)**

Se utilizó una solución PBS a pH 7 para eliminar el exceso de sulfuro de la biomasa y hacer las diluciones seriadas. Se preparó como sigue: 39% en volumen de solución stock A compuesta por 15.29 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en 500 mL de agua destilada y 61% en volumen de solución stock B compuesta por 14.2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 500 mL de agua destilada (Bollag y Edelstein, 1991).

## **2.2 Métodos**

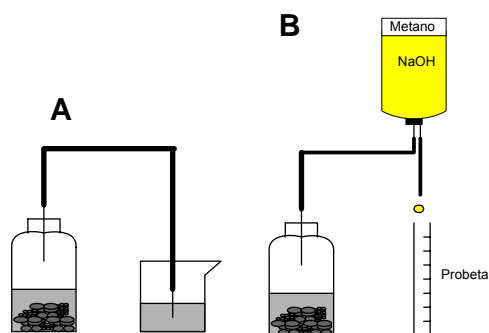
### **2.2.1 Actividad metanogénica acetoclástica específica**

Se define como la velocidad de producción de metano por el lodo, expresado como DQO, bajo condiciones óptimas y con respecto al contenido de SSV en el lodo granular (g DQO- $\text{CH}_4$ /g SSV-día).

La actividad metanogénica acetoclástica específica se llevó a cabo en botellas serológicas de 160 mL a las que se les adicionó 80 mL del medio mineral (ver sección 2.1.3) y lodo granular (del reactor UASB de 1070 mL de volumen) como inóculo a una concentración de 2 g SSV/L. La presión de la fase gas de la botella se equilibró a la presión

atmosférica eliminando el exceso de gas pinchando el tapón con una aguja conectada a una manguera y un vaso con agua (Figura 2.2 A). Las botellas se incubaron a 30°C y en agitación a 150 rpm por un periodo de 72 horas.

Después de 72 horas de incubación a cada botella se le adicionó acetato a una concentración de 2 g DQO/L, se les realizó nuevamente el equilibrio de la fase gas y las botellas se incubaron de nuevo a 30°C y 150 rpm. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y la medición de metano producido se determinó 3 veces por día durante un periodo aproximado de 10-15 días por medio de la técnica de desplazamiento con una solución de NaOH al 3% (Figura 2.2 B). Posteriormente, se calculó la velocidad de producción de metano (mL de CH<sub>4</sub>/ hora) durante el período en que el lodo estuvo activo, a partir de la pendiente obtenida al graficar los mililitros de metano acumulados contra el tiempo. Finalmente, este valor se convirtió en términos de actividad metanogénica acetoclástica específica (g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-día) a partir de los g SSV/L utilizados.



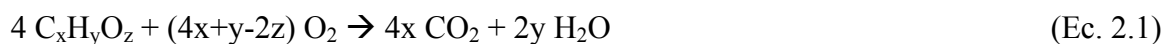
**Figura 2.2** Representación esquemática del equilibrio de la fase gaseosa en las botellas con la presión atmosférica (A) y cuantificación de metano para la determinación de la actividad metanogénica específica (B).

### 2.2.2 Actividad sulfatorreductora

La actividad sulfatorreductora se define como la capacidad de reducción de sulfato máxima alcanzada por el lodo y se determina utilizando la velocidad de producción de sulfuro o la reducción de sulfato expresada como DQO, bajo condiciones óptimas y con respecto al contenido de SSV en el lodo (g DQO H<sub>2</sub>S/g SSV-día)

Las actividades sulfatorreductoras se llevaron a cabo en botellas serológicas de 160 mL a las que se les adicionó 157 mL del medio mineral descrito anteriormente (ver sección

2.1.3), lodo granular (del reactor UASB de 1070 mL de volumen) como inóculo a una concentración de 2 g SSV/L, y sustrato (lactato o etanol) a una concentración de 2 g DQO/L. Como aceptor final de electrones se adicionó sulfato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) conservando una relación másica  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 0.66. El equivalente teórico de DQO para lactato y etanol que fue utilizado en los experimentos, se calculó de acuerdo a la Ecuación 2.1 (Tarvin y Buswell, 1934):



Las equivalencias teóricas utilizadas en los cálculos fueron las siguientes:

Ácido láctico ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ): 1.066 g DQO /g ac.láctico

Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ ): 2.08 g DQO/g etanol

La actividad sulfatorreductora se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar la concentración de sulfuro disuelto acumulado en función del tiempo y la cantidad de SSV en la botella.

Con la finalidad de conocer la velocidad de producción de sulfuro a un pH menor que el óptimo reportado para las BSR, que es alrededor de 7 (Widdel, 1988), se realizaron dos actividades sulfatorreductoras independientes con lactato como fuente de sustrato a un pH de 6.3 y 5.5 (la biomasa fue inicialmente adaptada con lactato). Este experimento fue la base para alimentar al reactor operado en flujo continuo a un pH menor al óptimo. Además, se determinó la actividad sulfatorreductora con etanol a pH 5.5. Los experimentos con diferente sustrato y pH 5.5 se compararon con la finalidad de conocer que sustrato proporcionaba una mayor velocidad de producción de sulfuro.

### **2.2.2.1 Actividad sulfatorreductora con diferentes concentraciones de etanol**

Se realizaron cinco actividades sulfatorreductoras independientes con etanol como donador de electrones a las concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 g DQO/L y a un pH de 5.5 en botellas serológicas. A partir de estos ensayos se determinaron las concentraciones de etanol que se usarían para determinar los parámetros cinéticos ( $q_{max}$  y  $K_s$ ), en los experimentos del reactor operado en lote. Las concentraciones se definieron a partir de la concentración (1 g DQO/L) reportada por Celis (2004) para la actividad sulfatorreductora.

### **2.2.3 Determinación de la cantidad de bacterias sulfatorreductoras en el lodo granular por la técnica del número más probable (NMP)**

Este método consiste en hacer diluciones seriadas en un medio de crecimiento y registrar la fracción de tubos que muestran crecimiento bacteriano (Koch, 1994). La presencia de BSR es detectada por un ennegrecimiento de los tubos causado por la formación de sulfuro ferroso (FeS) al producirse sulfuro durante la reducción no asimilativa de sulfato (Lens *et al.*, 1995).

Las diluciones seriadas se hicieron a partir de 1 mL de lodo, con el que se inoculó el reactor UASB (previamente disgregado con una jeringa), en 9 mL de buffer PBS bajo condiciones de esterilidad. Se tomaron 0.5 mL de 12 diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ) y se inocularon por triplicado en tubos que contenían 4.5 mL de medio Postgate B y que habían sido previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, se incubaron a 35°C por un período de 15-28 días durante los cuales se registró el ennegrecimiento de los tubos causado por el crecimiento de las BSR. Finalmente se llevó a cabo el conteo estadístico de las BSR presentes en el lodo usando las tablas y la fórmula para el NMP reportadas en el Standard Methods (APHA, 1998).

### **2.2.4 Operación del reactor UASB y determinación de los parámetros cinéticos**

El reactor UASB se operó bajo dos condiciones o regímenes: en lote para la determinación de las cinéticas y en continuo entre cada uno de los lotes, a continuación se describe en detalle la operación del reactor.

**Operación en continuo.** Antes y entre cada uno de los experimentos individuales en lote, el reactor UASB fue operado en continuo y en estado pseudo-estacionario con el medio mineral descrito en la sección 2.1.3. El TRH fue de 10 horas, la carga orgánica de 2.4 g DQO/L-día usando etanol como sustrato y la carga de sulfato de 4.8 g  $\text{SO}_4^{2-}$ /L-día. La operación en continuo tenía la finalidad de “lavar” el sulfuro de hidrógeno producido y acumulado durante los experimentos en lote. En el efluente se determinaron el sulfuro producido, el pH y la concentración de DQO.



**Operación en lote.** Los experimentos realizados para obtener parámetros cinéticos ( $q_{max}$ ,  $K_s$ ,  $K_I$  y  $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$ ) fueron conducidos en el reactor UASB haciendo un circuito cerrado al cortar la alimentación y recircular el líquido a un flujo de recirculación de 44 mL/min, equivalente a una velocidad ascensional de 1 m/h (Figura 2.1 B). La experimentación se llevó a cabo en 3 etapas: en la etapa I se determinaron la velocidad máxima de utilización de sustrato,  $q_{max}$  y la constante de afinidad por sustrato  $K_s$ , estas fueron las cinéticas de etanol; en la etapa II se hicieron pruebas de inhibición con sulfuro para determinar la constante de inhibición,  $K_I$  (cinéticas de sulfuro); en la etapa III la adición de diferentes concentraciones de hierro permitió determinar la constante de inhibición aparente por hierro  $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$  (cinéticas de hierro). Para cada etapa se llevaron a cabo cinéticas independientes mediante la adición de un pulso de 140 mL de medio de cultivo (ver sección 2.1.3), por la parte superior del reactor quitando la campana de separación gas-sólido-líquido. Posteriormente, el pulso se mezclaba dentro del reactor al operar la bomba a máxima velocidad (aproximadamente 130 mL/min) durante 5 minutos. El pH del pulso para todas las cinéticas fue entre 2.5 y 3.5 con el objetivo de disminuir el pH dentro del reactor y mantener el hierro en forma soluble al llevar a cabo las cinéticas con hierro. Se tomaron muestras a través de la válvula de muestreo localizada en la línea de recirculación (Figura 2.1 B) a intervalos de tiempo entre 1 y 1.5 horas para la determinación de DQO, sulfuro y hierro disuelto (cinéticas de hierro) hasta que el consumo de DQO fue igual o mayor a 80% de la DQO de alimentación o se mantenía estable por 2 horas. La cuantificación de la alcalinidad y pH fue realizada al inicio y al final de cada experimento en lote.

#### **2.2.4.1 Etapa I: Determinación de los parámetros cinéticos $q_{max}$ y $K_s$ (Cinéticas de etanol)**

La primera etapa tuvo por objetivo la obtención de las velocidades de consumo de etanol ( $q$ ) a diferentes concentraciones y los valores de  $q_{max}$  y  $K_s$ , se obtuvieron del ajuste de los parámetros a la cinética Monod. Para llevar a cabo los experimentos, se utilizó un pulso de medio de cultivo (ver Tabla 2.1) de 140 mL de volumen con una concentración de sustrato que era variable para cada cinética. Las concentraciones de etanol como fuente de sustrato fueron fijadas a partir de los resultados obtenidos en los experimentos con botellas

serológicas descritos en la sección 2.2.2.1. Se llevaron a cabo 11 lotes correspondientes a las 11 concentraciones de etanol evaluadas y mostradas en la Tabla 2.1. El pH del pulso para cada lote fue ajustado a 3 con HCl concentrado y las variables a medir durante las cinéticas fueron DQO y sulfuro disuelto. La alcalinidad y el pH fueron cuantificados al principio y final de cada cinética.

#### **2.2.4.2 Etapa II: Determinación de la constante de inhibición por sulfuro, $K_I$ (Cinéticas de sulfuro)**

Los experimentos en lote para determinar la  $K_I$  se llevaron a cabo con un pulso de 140 mL de volumen y 1 g DQO etanol/L como sustrato. Las concentraciones de sulfuro experimentadas se fijaron en base a las referencias dadas en la Tabla 1.2 y se muestran en la Tabla 2.1. Para obtener la concentración de sulfuro, evaluada en cada lote, se cuantificó la concentración de sulfuro en el reactor antes de adicionar el pulso y se calculó la concentración de sulfuro ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) necesaria para obtener la concentración deseada en el reactor. El pulso se preparaba adicionando el medio 10X, el  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , el etanol y agua hasta un volumen de 140 mL, posteriormente se acidificaba hasta un pH entre 3.0-3.5. Sin embargo, cuando se cuantificó por primera vez la concentración de sulfuro contenida en el pulso por el método yodométrico se encontró que había un faltante con respecto al que en teoría se debería tener. Fue entonces cuando se observó que después de ajustar el pH había un faltante de aproximadamente 40% de sulfuro, que seguramente pasaba a la fase gas. Por lo tanto se agregaba un 40% más de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  al calculado teóricamente para llegar a la concentración deseada. De esta forma cuando se cuantificaba por yodometría el ST se obtenía la concentración exacta adicionada al reactor. Las variables a medir durante las cinéticas fueron DQO y sulfuro disuelto. La alcalinidad y el pH fueron cuantificados al principio y final de cada cinética. Las cinéticas se dieron por concluidas hasta que la DQO consumida era igual o mayor a 80% de la DQO alimentada o se mantenía en un valor estable por 2 horas.

Finalmente, las velocidades de consumo de sustrato ( $q$ ) obtenidas en cada lote y para cada especie de sulfuro (ST y  $\text{H}_2\text{S}$ ) se ajustaron al modelo de inhibición no competitivo [Ecuación 3.4] por mínimos cuadrados reportado por Kaksonen *et al.* (2004), con lo que se obtuvo la constante de inhibición por sulfuro,  $K_I$  para cada especie de sulfuro.

### 2.2.4.3 Etapa III: Determinación de la constante de inhibición aparente por hierro, $K_{I\text{ app}}$ de $\text{Fe}^{+2}$ (Cinéticas de hierro)

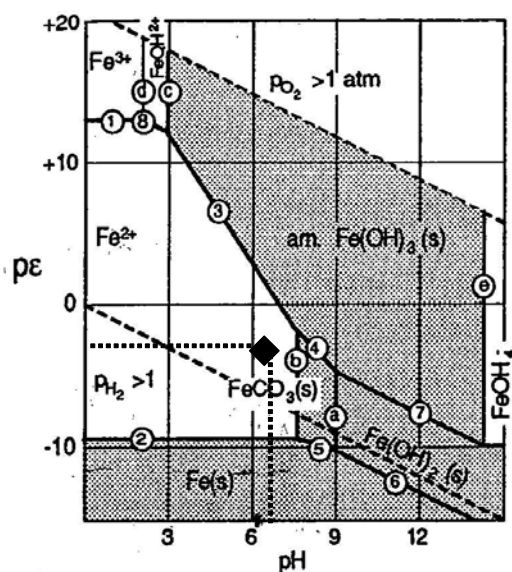
La tercera parte de la experimentación estuvo enfocada a la determinación de la constante de inhibición por hierro,  $K_I$  de  $\text{Fe}^{+2}$ . Para saber si existían las condiciones para mantener el hierro en solución, se determinó el potencial de óxido-reducción (Eh) del medio contenido dentro del reactor con un electrodo de platino ( $E_{\text{platino}} = 377.4 \text{ mV}$ ), la lectura obtenida se reportó con respecto al potencial de hidrógeno ( $E_{\text{hidrógeno}} = -180 \text{ mV}$ ). Finalmente dicho potencial se convirtió en potencial estándar ( $pE = 16.9 (E_{\text{hidrógeno}})$ ), su valor fue de -3Volts (V). Una condición para llevar a cabo las cinéticas en presencia de hierro era que este se mantuviera en solución y solamente se precipitara con el sulfuro biogénico en forma de FeS. Dado que el pH promedio máximo alcanzado en las cinéticas de sulfuro y etanol fue de 6.4 y que el pE del sistema tuvo un valor de -3V se encontró que bajo estas condiciones el ion ferroso sería la especie predominante (rombo relleno) como se observa en el diagrama de pE vs pH para el sistema Fe-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (Figura 2.3), donde las fases sólidas son: Fe(OH)<sub>3</sub> (amorfo), FeCO<sub>3</sub> (siderita), Fe(OH)<sub>2</sub> (S), y Fe(S); CT (carbono total) = 10<sup>-3</sup> M (Stumm y Morgan, 1996). Según el diagrama habría probabilidad de precipitación como hidróxido (Fe(OH)<sub>2</sub>) si el pH aumentara a más de 8 ó de precipitación como carbonato (FeCO<sub>3</sub>) si el pH fuera mayor que 7.5 (aproximadamente). Por otro lado, como referencia se tiene que la constante de precipitación (Kps) del Fe(OH)<sub>2</sub> es de 7.4 y como FeCO<sub>3</sub> es igual a 10.7 (Stumm y Morgan, 1996).

Para determinar la concentración de hierro que se adicionaría en el pulso (Tabla 2.1), se consideró la concentración de sulfuro que había en el reactor en estado pseudo-estacionario justo antes de adicionar el pulso y, en base a ella, se definió la concentración de hierro que se podría precipitar con dicho sulfuro a partir de la relación estequiométrica que se muestra en la Ecuación 2.2 reportada por Kalin *et al.* (2005).



Posteriormente, se calculó una concentración de hierro adicional para que hubiera hierro en solución para cada cinética. El hierro se adicionó en forma de FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. Se evaluaron las siguientes concentraciones de hierro: 4.74, 7.45, 8.15 y 8.51 mM. Estas concentraciones se basaron en los estudios respirométricos reportados por Tabak *et al.* (2004) quienes indican

que las BSR utilizadoras de hidrógeno no fueron inhibidas a concentraciones mayores a 7.16 mM de hierro en especies férricas o ferrosas. Por lo tanto, al no conocer la sensibilidad del lodo utilizado como inóculo, se procedió a realizar la primera cinética a una concentración menor de 7.16 mM.



**Figura 2.3** Diagrama de pE contra pH para un sistema Fe-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O. Las fases sólidas son Fe(OH)<sub>3</sub> (amorfo), FeCO<sub>3</sub> (siderita), Fe(OH)<sub>2</sub> (S), y Fe(S); CT = 10<sup>-3</sup>M. Las líneas son calculadas para Fe(II) y Fe(III) = 10<sup>-5</sup> M (25°C) (Stumm y Morgan, 1996).

Las variables a medir durante las cinéticas fueron DQO, pH, hierro y sulfuro disuelto a intervalos de tiempo entre 1 y 1.5 horas hasta que la DQO consumida era igual o mayor a 80% de la DQO alimentada o se mantenía estable por 2 horas.

Posteriormente las velocidades de consumo de sustrato ( $q$ ) se ajustaron a un modelo de inhibición no competitivo [Ecuación 3.4] por mínimos cuadrados reportado por Kaksonen *et al.* (2004) obteniendo finalmente la constante aparente de inhibición por hierro,  $K_{I\text{ app}}$  de Fe<sup>+2</sup>.

### 2.2.5 Análisis

La DQO se determinó por el método de reflujo cerrado utilizando 2 mL de muestra previamente centrifugada en una microcentrífuga (Tomy Kogyo HF-120) a 6400 rpm. El método consiste en oxidar la muestra con dicromato de potasio en condiciones ácidas utilizando ácido sulfúrico y sulfato de plata como catalizador a 160°C por 2 horas en tubos de vidrio cerrados. La concentración de DQO se determinó en un espectrofotómetro marca Thermo spectronic modelo Aqua Mate a una longitud de onda de 600 nm y con la curva estándar correspondiente entre 50 y 1000 mg DQO/L usando glucosa como estándar. El sulfuro existente en la muestra se eliminó antes de la determinación de la DQO burbujeando la muestra (6 mL) con aire por 5 minutos. La determinación de la DQO se realizó para cada muestra por duplicado.

El sulfuro total en la determinación de los parámetros cinéticos se analizó por el método yodométrico, que se basa en la capacidad de oxidación que tiene el yodo como agente oxidante débil frente al sulfuro que es un agente reductor fuerte en condiciones ácidas (Ecuación 2.3). La cuantificación se llevó a cabo por una titulación del yodo remanente empleando una solución estándar 0.025N de tiosulfato de sodio. Este método es confiable para concentraciones mayores de 1 mg/L (APHA, 1998).



La cuantificación del sulfuro disuelto en las actividades específicas fue realizada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 480 nm (UV visible marca Thermo Spectronic modelo Aquamate) por el método colorimétrico descrito por Cord Ruwisch (1985).

La alcalinidad como bicarbonato se determinó a partir de una titulación con HCl 0.1 N hasta llegar a un pH de 5.8, reportándose la alcalinidad como CaCO<sub>3</sub> según el método estándar (APHA, 1998).

El pH de las muestras se determinó con un potenciómetro Thermo Orión modelo 720 A y con un electrodo marca Orión modelo 8256.

Los SSV, sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos fijos en el lodo granular se determinaron por el método gravimétrico descrito en el método estándar (APHA, 1998).

La determinación del hierro total en solución se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer modelo Analyst 400. La muestra de hierro fue filtrada por una membrana con tamaño de poro de  $0.2\mu\text{m}$ , almacenada a un pH de 4 y diluida con agua desionizada que tenía un pH de 2.5. Se utilizó un estándar de hierro Marca Fisher Chemical de 1000 ppm y una curva de calibración de 1 a 6 ppm. La calibración se realizó con un ajuste no lineal pasando por cero, el análisis de la muestra se realizó por triplicado y con una lámpara lumina de cátodo hueco monoespecífica para hierro marca Perkin Elmer. La determinación se llevó acabo a una longitud de onda de 248.33 nm, un slit de 1.8-135 nm, aire como oxidante a un flujo de 10 L/min y acetileno como combustible a un flujo de 2.5 L/min.

La medición del potencial oxido-reducción (Eh) del medio que tenía el reactor UASB se determinó con un potenciómetro marca Termo Orion modelo 420 A<sup>+</sup> equipado con un electrodo combinado de platino con electrodo de referencia de Ag/AgCl, y cuyo potencial con respecto al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) es de 197 mV.

### **3. Resultados**

Los resultados se dividieron en dos partes: en la primera se incluyen aquellos obtenidos en la caracterización del lodo y las actividades sulfatorreductoras específicas que fueron utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos; en la segunda parte, se muestran los resultados obtenidos en la operación en continuo del reactor UASB y la determinación de los parámetros cinéticos (operación en lote).

#### **3.1 Caracterización del lodo y actividades sulfatorreductoras**

El lodo granular anaerobio utilizado como fuente de biomasa tuvo una relación de SSV de 0.10 g por cada gramo de lodo, es decir 10% de SSV. Con este valor de SSV se determinó la concentración de biomasa que se inoculó en las botellas serológicas para la determinación de las actividades específicas y al reactor UASB para su operación. Al final de toda la experimentación del reactor UASB, se determinó que existían 15.5 g SSV/L debido a que el lodo tenía 0.06g de SSV/g lodo, es decir 6 % de sólidos suspendidos volátiles, posiblemente la diferencia en el contenido de SSV se debió a un lavado de la biomasa durante las cinéticas en lote.

La determinación del NMP tuvo por objetivo la cuantificación de las BSR existentes inicialmente en el lodo granular, para lo cual se hicieron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$ . La presencia de las BSR fue detectada por el ennegrecimiento de los tubos causado por la formación de sulfuro ferroso (FeS) al producirse sulfuro durante la reducción no asimilativa de sulfato (Lens *et al.*, 1995). El análisis del NMP se llevó a cabo a partir del conteo de tubos positivos (ennegrecimiento) y negativos (sin ennegrecimiento) de las tres últimas diluciones seriadas en las que se observaron tubos positivos (Tabla 3.1). Para la estimación del NMP solamente se tomaron en cuenta los tubos que fueron positivos, quedando la combinación 2-1-1.

**Tabla 3.1** Tubos positivos y negativos de las tres últimas diluciones seriadas usadas para la determinación del NMP.

<b>Dilución</b>	<b>No. De tubos positivos</b>	<b>No. De tubos negativos</b>
$1 \times 10^{-10}$	2	1
$1 \times 10^{-11}$	1	2
$1 \times 10^{-12}$	1	2

Posteriormente con la Ecuación 3.1 y la Tabla 9221.IV reportada en el método estándar (APHA, 1998) se determinó que en el lodo granular había  $9 \times 10^9$  NMP de BSR/gSSV. La densidad aparente del lodo fue de 1g lodo/mL y el contenido de SSV/g lodo fue de 0.1g.

$$NMP(Tabla) \cdot \frac{10}{Vol.NMP} = NMP / 100mL \quad (Ec.3.1)$$

Donde:

NMP (Tabla) = Valor obtenido a partir de la combinación de tubos positivos y la tabla 9221.IV del Standard Methods.

Vol. NMP = Volumen más grande evaluado en las diluciones seriadas para la determinación del NMP.

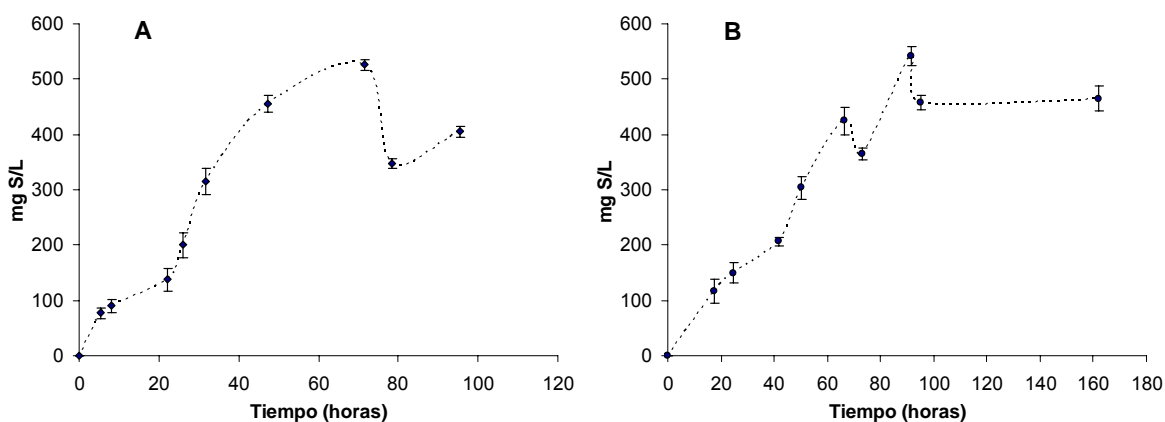
La determinación de la actividad metanogénica acetoclástica tuvo por objetivo conocer la capacidad que tenía el lodo para producir metano a partir de acetato. El resultado de dicha determinación indicó que el lodo granular tenía una actividad metanogénica acetoclástica de 0.15 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-día. Schmidt y Ahring (1995) reportan actividades metanogénicas acetoclásticas con valores desde 0.09 a 5.5 g DQO-CH<sub>4</sub>/g SSV-día para varios tipos de lodos que crecieron con diferente sustrato a 30°C. Por lo tanto, la actividad metanogénica acetoclástica determinada para este trabajo se encuentra dentro del orden de magnitud de los valores de actividad metanogénica reportados.

Se determinaron dos actividades sulfatorreductoras independientes con lactato, como fuente de sustrato a una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67 y a dos valores de pH (6.3 y 5.5). Considerando que, por un lado el lodo granular utilizado para inocular el reactor UASB estuvo adaptado a lactato y por otro, que el pH necesario en el sistema para mantener al hierro en solución, tendría que ser menor a 7 para evitar precipitaciones en



forma de hidróxido o carbonato. Es por ello que el objetivo de realizar las actividades a un pH de 6.3 y 5.5 fue conocer si la biomasa era inhibida a pH más bajo que el óptimo reportado para las BSR que es alrededor de 7 (Widdel, 1988). Cuando la determinación de la actividad sulfatorreductora (ASR) se llevó a cabo a un pH de 6.3 la actividad fue de 0.10 g DQO- H<sub>2</sub>S/g SSV-día y cuando se llevó a cabo a un pH de 5.5 fue de 0.12 g DQO- H<sub>2</sub>S/g SSV-día. La desviación estándar de estas actividades fue de 0.01, lo cual indicó que los valores estaban dentro del error experimental y que el pH no disminuía la actividad.

Tomando en cuenta que la ASR a pH de 5.5 con lactato como donador de electrones no fue tan diferente a la obtenida a un pH 6.3, se llevó a cabo otra prueba de actividad a pH 5.5 y una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67, pero usando etanol como sustrato, con la finalidad seleccionar el sustrato con el que se obtuviera una ASR mayor. El resultado de esta prueba fue de 0.23 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-día, de tal forma que con etanol como sustrato se obtuvo una mayor actividad que con lactato a pH 5.5. Los perfiles de producción de sulfuro en la determinación de las ASR con etanol y lactato se muestran en la Figura 3.1. El cálculo de las ASR de determinó a partir de la fase exponencial de las graficas.



**Figura 3.1** Perfil de la producción de sulfuro por el lodo granular con etanol (A) y lactato (B) como fuente de sustrato. El pH de ambos experimentos fue de 5.5.

La ASR obtenida con etanol como sustrato a pH de 5.5 es comparable con la reportada por Visser *et al.* (1993) para lodo granular de 0.18 g DQO/g SSV-día determinada con acetato, propionato y butirato como fuente de carbono y a pH de 7.0.

Una vez establecido el etanol como sustrato se llevaron a cabo 5 experimentos de ASR a concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 g DQO-etanol/L, a pH 5.5 y una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67, con la finalidad de determinar la concentración de sustrato a la cual el

sistema comenzaba a tener una saturación. Una vez obtenidos los valores de ASR se les aplicó un ajuste matemático de tipo saturación basado en la ecuación de Monod [Ecuación 3.2].

$$f = \frac{a \cdot x}{b + x} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

Donde:

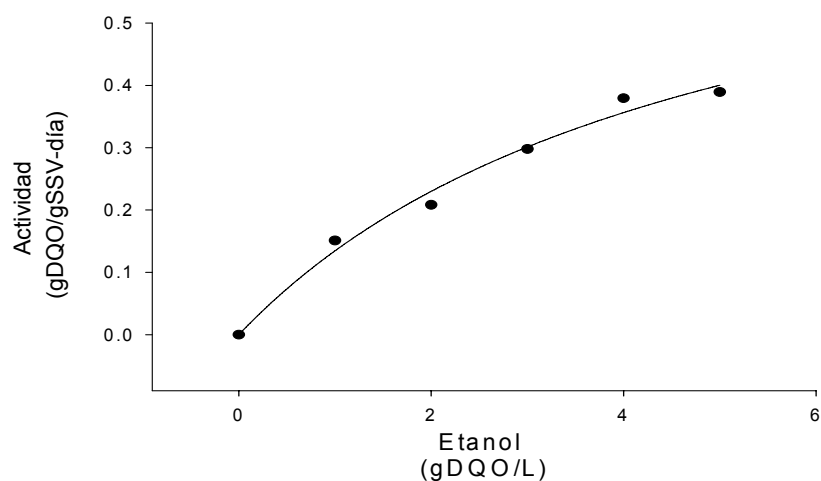
f = Actividad sulfatorreductora (g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-día)

a = Actividad sulfatorreductora máxima (g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-día)

x = Concentración de sustrato (g DQO/L)

b = K<sub>s</sub> = Constante de afinidad por sustrato, equivalente a la concentración de sustrato dada a la mitad de la actividad sulfatorreductora máxima (g DQO/L)

A partir del ajuste se determinó que el valor de actividad sulfatorreductora máxima fue de 0.79 g DQO-H<sub>2</sub>S/g SSV-día y que el valor de K<sub>s</sub> fue de 4.874 g DQO/L (Figura 3.2).



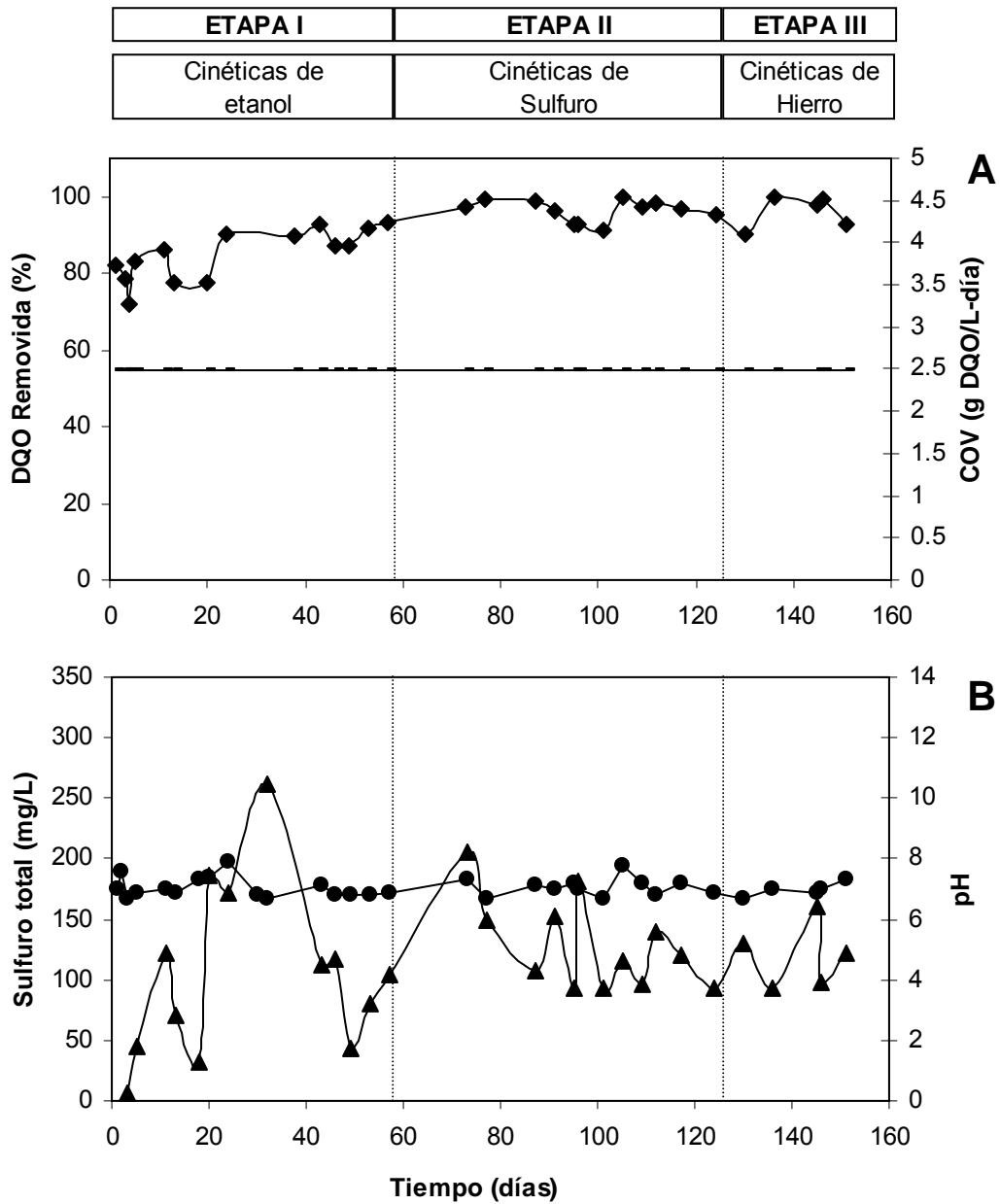
**Figura 3.2** Ajuste matemático con la ecuación tipo Monod ( $f=a \cdot x/(b+x)$ ) de las actividades sulfatorreductoras obtenidas a partir de diferentes concentraciones de etanol. Los datos experimentales (•) se ajustaron al modelo con una  $R^2 = 0.98$ . El valor de  $a = 0.79$  ( $P < 0.01$ ) correspondiente a la ASR máxima, y  $b = 4.87$  ( $P < 0.01$ ) equivalente a la  $K_s$ .

### 3.2 Operación del reactor UASB y determinación de parámetros cinéticos

El reactor UASB se operó bajo dos regímenes alternadamente, en lote para la determinación de las cinéticas y en continuo entre cada uno de los lotes. La operación del reactor en lote se llevó a cabo en 3 etapas: en la etapa I se determinaron la velocidad máxima de utilización de sustrato,  $q_{max}$ , y la constante de afinidad por sustrato,  $K_s$  (cinéticas con etanol); en la etapa II se hicieron pruebas de inhibición con sulfuro para determinar la constante de inhibición,  $K_I$  (cinéticas con sulfuro) y en la etapa III la adición de diferentes concentraciones de hierro permitió determinar la constante de inhibición aparente por hierro,  $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$  (cinéticas con hierro). Antes y entre los experimentos individuales llevados a cabo en lote, el reactor UASB fue operado en flujo continuo como se describió en la sección 2.2.4 a una carga orgánica volumétrica (COV) constante de 2.4 g DQO/L-día con el objetivo de mantener la biomasa en estado pseudo-estacionario para los experimentos en lote. Los resultados indicaron que la remoción de DQO fue aumentada desde 80% hasta más de 95% de la etapa I a la etapa III durante la operación en continuo (Figura 3.3 A).

Por otro lado, la concentración de sulfuro total producido fue oscilatoria para todas las etapas de operación del reactor, aunque al final de la operación de la etapa II y en la etapa III se pudo observar que las oscilaciones no eran tan pronunciadas como en la etapa I. Lo anterior pudo deberse a que en la etapa I la concentración de DQO fue variable para cada lote; sin embargo, para la etapa II y III la concentración de DQO fue estable en cada lote realizado.

El pH promedio del efluente fue de 7, observándose un pH estable para todas las etapas (Figura 3.3 B). El monitoreo del reactor en continuo indicó que el sistema no sufrió disturbios entre lote y lote, lo cual mostró que la biomasa tuvo un comportamiento estable durante toda la operación del reactor UASB.

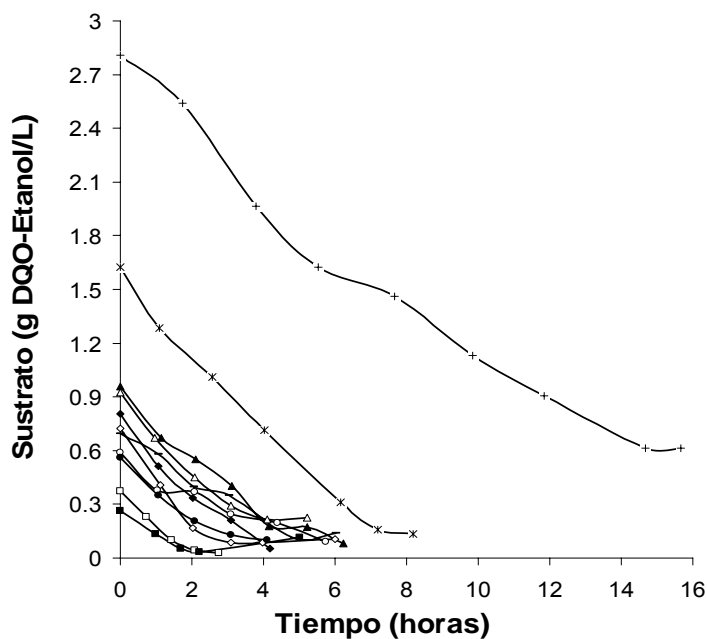


**Figura 3.3** Desempeño del reactor UASB operado en flujo continuo y en estado pseudo-estacionario, entre las etapas en lote. A. Porcentaje de remoción de DQO (◆) y velocidad de carga orgánica volumétrica (COV) impuesta (-). B. Concentración de sulfuro total en el efluente (▲) y pH en el efluente (●).

### 3.2.1 Determinación de parámetros cinéticos en el reactor UASB operado en lote

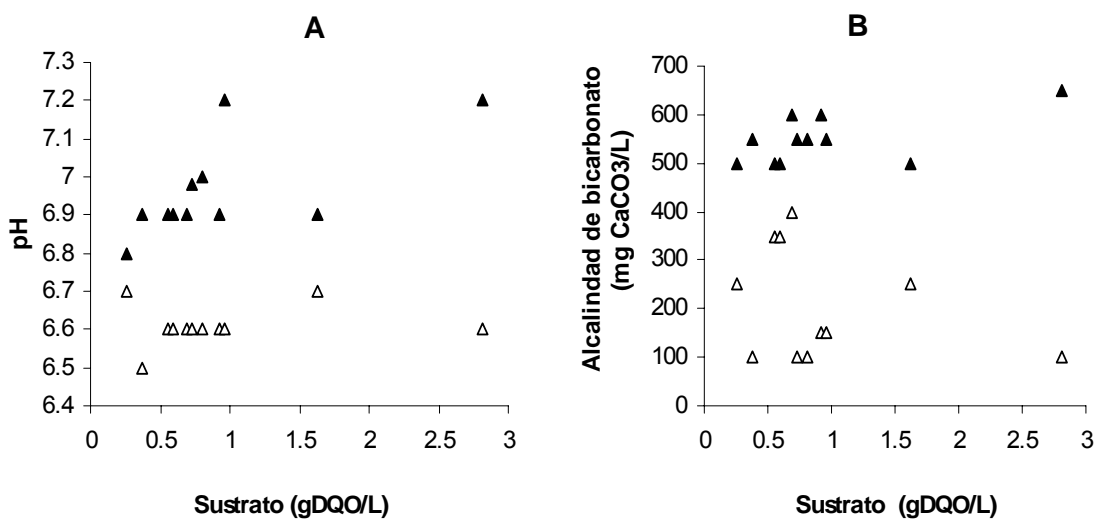
#### 3.2.1.1 Etapa I: Cinéticas con etanol

Para conocer las constantes cinéticas de velocidad máxima de utilización de sustrato ( $q_{max}$ ) y de afinidad por sustrato ( $K_s$ ), fue necesario realizar cinéticas independientes con etanol a las siguientes concentraciones: 0.26, 0.37, 0.55, 0.59, 0.69, 0.72, 0.8, 0.92, 0.96, 1.6, 2.8 g DQO-etanol/L, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.4.1. Para cada una de las cinéticas, se generó una gráfica del perfil de consumo de DQO con respecto al tiempo como se observa en la Figura 3.4. Cabe destacar que, la mayoría de las cinéticas tuvieron un tiempo de duración entre 3 y 6 horas. Sin embargo, para la cinética de 2.8 g DQO-etanol/L se observó un tiempo de duración más prolongado (15 horas), esto pudo deberse a que, con dicha concentración de sustrato el sistema alcanzó una fase estacionaria donde la velocidad de consumo no dependía de la concentración y por tanto, el consumo de DQO no superó el 90-95% que se obtuvo a concentraciones menores de etanol.



**Figura 3.4** Cinéticas del consumo de DQO con respecto al tiempo con etanol como sustrato (g DQO-etanol/L): 0.26 (■), 0.37 (□), 0.55 (●), 0.59 (○), 0.69 (-), 0.72 (◇), 0.80 (◆), 0.92 (△), 0.96 (▲), 1.62 (\*) y 2.8 (+).

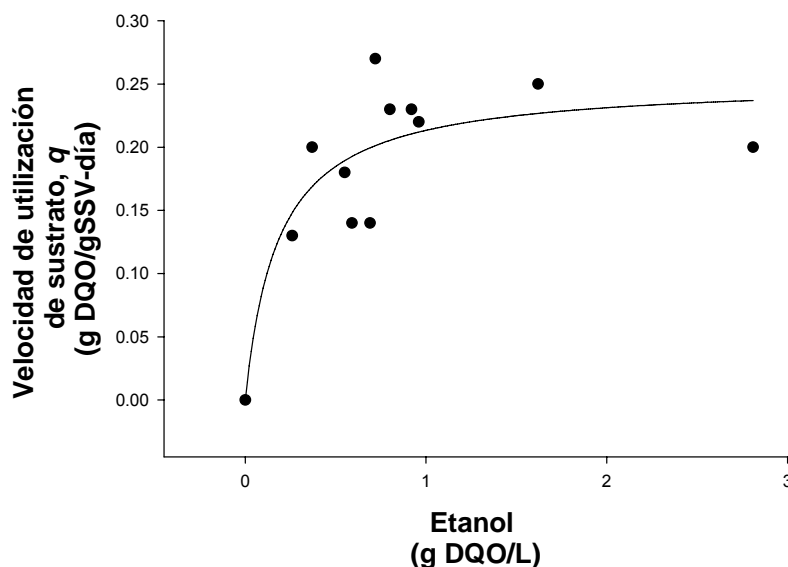
En estos experimentos también se determinó el pH y la alcalinidad al inicio y al final de cada cinética. El valor de pH al que se iniciaban los lotes fue en promedio de  $6.6 \pm 0.05$  y el valor final fue de  $6.9 \pm 0.12$  (Figura 3.5 A). En el caso de la alcalinidad, al inicio de cada lote fue en promedio de  $200 \pm 117$  mg CaCO<sub>3</sub>/L debido a que no se tenían valores estables; sin embargo, al final de cada lote la alcalinidad fue más estable ya que tuvo un valor promedio de  $550 \pm 50$  mg CaCO<sub>3</sub>/L (Figura 3.5 B).



**Figura 3.5** Comportamiento del pH (A) y alcalinidad de bicarbonato (B) al inicio ( $\Delta$ ) y final ( $\blacktriangle$ ) de cada una de las cinéticas independientes con etanol.

A partir de los perfiles de consumo de DQO se calculó la velocidad de consumo de sustrato ( $q$ ), determinando la pendiente de la gráfica y dividiéndola entre los SSV contenidos en el reactor. De las velocidades obtenidas se pudo observar que a concentraciones de etanol entre 0.7 y 1.62 g DQO/L la  $q$  fue en promedio de  $0.24 \pm 0.02$  g DQO/g SSV-día y cuando la concentración de sustrato fue de 2.81 g DQO/L, el valor de  $q$  disminuyó a 0.20 g DQO/g SSV-día. Mientras que a concentraciones de etanol entre 0.26 y 0.7g DQO/L la  $q$  promedio fue de  $0.17 \pm 0.05$ .

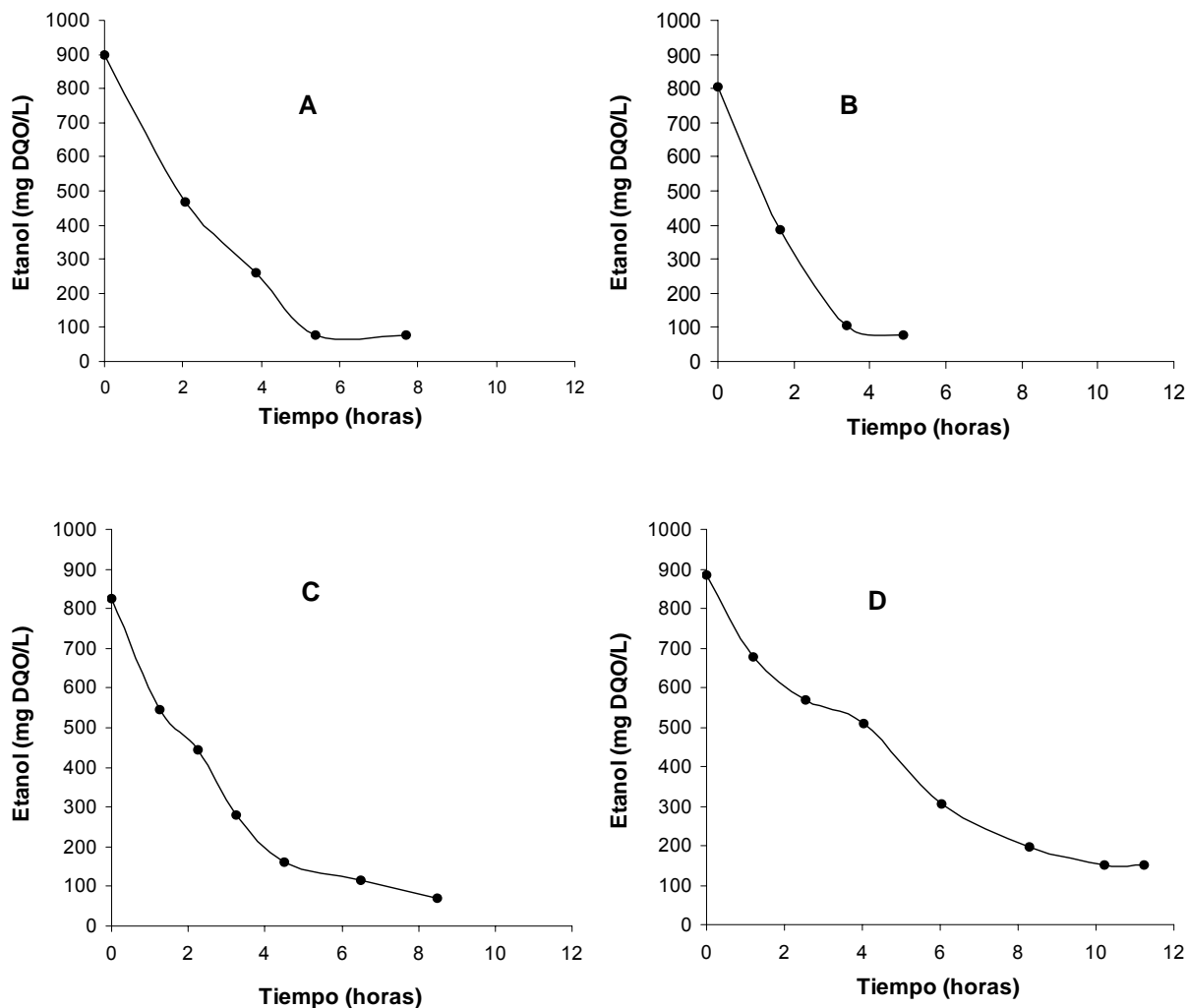
Los datos de  $q$  se ajustaron al mismo modelo matemático que se usó en las pruebas de actividad [Ecuación 3.2] y se obtuvo un ajuste con una  $R^2$  de 0.74 (Figura 3.6). Con dicho ajuste se encontró para  $q_{max}$  un valor de 0.25 g DQO/g SSV-día y para  $K_s$  de 0.18 g DQO/L equivalente a 86.2 mg/L de etanol.



**Figura 3.6** Modelación matemática con la ecuación tipo Monod ( $f=a \cdot x/(b+x)$ ) de las cinéticas con etanol llevadas a cabo en el reactor UASB operado en lote. Valores experimentales (●). El valor de  $a = 0.25$  g DQO/g SSV-día ( $P < 0.0001$ ) correspondiente a la  $q_{max}$ , y  $b = 0.18$  g DQO/L ( $P > 0.05$ ) equivalente a la  $K_s$ .

### 3.2.1.2 Etapa II: Cinéticas con sulfuro

Para obtener las constantes de inhibición por sulfuro ( $K_I$ ) para sulfuro total y sulfuro no disociado, se realizaron cinéticas independientes usando sulfuro como agente inhibidor a las siguientes concentraciones: 152, 255, 384, y 424 mg  $S^{2-}$ /L. Los perfiles de consumo de DQO para cada una de las concentraciones se muestran en la Figura 3.7, donde se puede observar que los perfiles de las Figuras 3.7 A, B y C son muy similares en cuanto al tiempo de duración (4-6 horas). Sin embargo, en la Figura 3.7 D se observa que el perfil de consumo de DQO fue mucho más prolongado que en las anteriores, debido a que a la concentración de 424 mg  $S^{2-}$ /L existió una disminución en la velocidad de utilización de sustrato, provocando que el consumo de DQO se prolongara a un tiempo mayor de 9 horas.

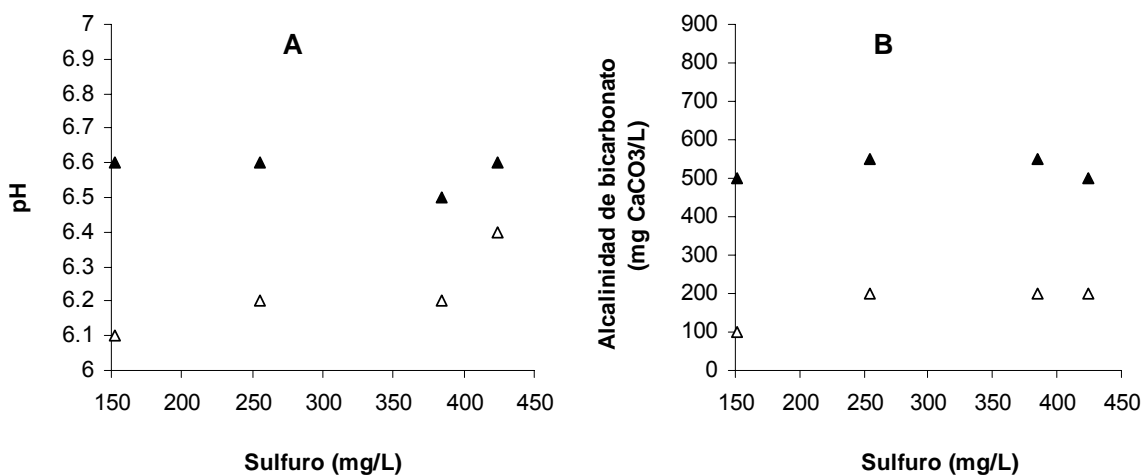


**Figura 3.7** Perfiles de consumo de etanol con respecto al tiempo con sulfuro como inhibidor, para 152 mg S<sup>2-</sup>/L (A), 255 mg S<sup>2-</sup>/L (B), 384 mg S<sup>2-</sup>/L (C) y 424 mg S<sup>2-</sup>/L (D).

En estos experimentos también se determinó el pH y la alcalinidad al inicio y al final de cada lote (Figura 3.8). El valor del pH al que iniciaron todos los lotes fue en promedio  $6.2 \pm 0.05$  y el valor final fue de  $6.5 \pm 0.12$ . En el caso de la alcalinidad al inicio de cada lote se tenían valores de  $175 \pm 50$  mg CaCO<sub>3</sub>/L en promedio y al final de los experimentos la alcalinidad promedio aumentó a  $525 \pm 28.8$  mg CaCO<sub>3</sub>/L, conservando valores de alcalinidad más estables que al inicio de cada lote. La comparación de los resultados de pH y alcalinidad al inicio y al final de estos experimentos con respecto a los obtenidos en las cinéticas con etanol indicaron que, el valor del pH disminuyó para los



experimentos con sulfuro, que al inicio fue de  $6.6 \pm 0.05$  a  $6.2 \pm 0.05$  y al final de  $6.9 \pm 0.12$  a  $6.6 \pm 0.12$  para las cinéticas de etanol y sulfuro respectivamente. Sin embargo, la alcalinidad promedio al final de ambas cinéticas tuvo valores similares de  $525 \pm 28.8$  y  $550 \pm 50$  mg CaCO<sub>3</sub>/L para cinéticas de sulfuro y etanol respectivamente.



**Figura 3.8** Comportamiento del pH (A) y alcalinidad de bicarbonato (B) al inicio (Δ) y final (▲) de cada una de las cinéticas independientes de sulfuro.

A partir de los perfiles de consumo de DQO se calculó la velocidad de consumo de sustrato ( $q$ ) al determinar la pendiente con la fase exponencial de la gráfica y dividirla entre los SSV contenidos en el reactor. Además, para cada cinética evaluada, se determinó la concentración de sulfuro no disociado (H<sub>2</sub>S) aplicando la ecuación de Van't Hoff [Ecuación 3.3] en donde  $pK_{a1}$  es igual a  $-\log K_{a1}$  y tiene un valor de 6.97 (Kaksonen *et al.*, 2004) y ST representa la concentración de sulfuro total.

$$H_2S = \frac{ST}{1 + 10^{(pH - pK_{a1})}} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

El pH que se consideró para hacer los cálculos fue el pH promedio entre el inicio y el final de cada cinética. La determinación del sulfuro no disociado es un cálculo importante ya que es la forma de sulfuro reportada como la más inhibitoria para bacterias sulfatorreductoras (Okabe *et al.*, 1994; Utgikar *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2004; Greben

*et al.*, 2005). Por lo tanto, su determinación contribuye a conocer que parte del sulfuro total corresponde a esta especie y permite separar el efecto inhibitorio de ambas especies (ST y H<sub>2</sub>S) a partir de sus constantes de inhibición ( $K_I$ ).

En la Tabla 3.2 se muestran los valores de sulfuro total, velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) y el porcentaje de inhibición que causan las concentraciones de sulfuro sobre la velocidad de utilización de sustrato. Se observó que a concentraciones de sulfuro total menores o iguales a 328 mg/L el porcentaje de inhibición de la velocidad de utilización de sustrato fue de 20-24%, pero a una concentración de 424 mg ST/L el porcentaje de inhibición aumentó a 60%.

Las velocidades de utilización de sustrato disminuyeron de 0.25 g DQO /g SSV-día, que es el valor de la prueba control sin sulfuro (obtenida de las cinéticas con etanol), hasta 0.1 g DQO /g SSV-día para el ensayo en el que la concentración de ST fue de 424 mg/L.

**Tabla 3.2** Concentraciones de sulfuro total (ST), sulfuro no disociado (H<sub>2</sub>S), velocidad máxima de utilización de sustrato ( $q$ ), porcentaje de inhibición del sulfuro sobre la velocidad de utilización de sustrato.

Sulfuro total (mg ST/L)	Sulfuro no disociado (mg H <sub>2</sub> S/L)	$q_{max}$ (g DQO /g SSV-día)	% de inhibición
0	0	0.25	0
152	135	0.19	24
255	212	0.20	20
328	283	0.19	24
424	339	0.10	60

Posteriormente, las concentraciones de sulfuro (ST y H<sub>2</sub>S) y las velocidades de utilización de sustrato  $q$  determinados para cada cinética (Tabla 3.2) se ajustaron por mínimos cuadrados a la ecuación de inhibición no competitiva [Ecuación 3.4] reportada por Kaksonen *et al.* (2004).

$$q = \frac{q_{max} \cdot S}{(K_s + S) \left( 1 + \frac{I}{K_I} \right)} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

Donde:

$q$  = Velocidad de utilización de sustrato (g DQO/g SSV-día)

$q_{max}$  = Velocidad máxima de utilización de sustrato (g DQO/g SSV-día)

S = Concentración de sustrato dado a la  $q_{max}$  (g DQO/L)

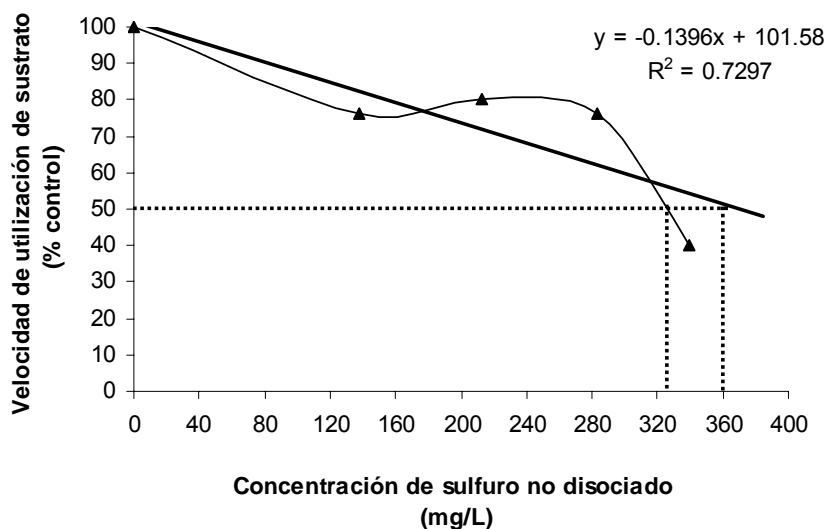
$K_s$  = Constante de afinidad por sustrato (g DQO/L)

I = Concentración del inhibidor (mg/L)

$K_I$  = Constante de inhibición (mg/L)

El ajuste matemático determinó el valor de la constante de inhibición por sulfuro para cada especie ( $H_2S$  y ST). Para el sulfuro total la  $K_I$  fue de 240 mg/L y para el sulfuro no disociado fue de 199 mg/L, lo cual indica que el 83% del sulfuro presente en el sistema estaba en forma no disociada ( $H_2S$ ) ya que el pH al que se realizaron los experimentos fue menor a 7.

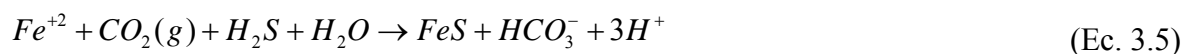
La inhibición por  $H_2S$  también se puede describir mediante el valor de la concentración inhibitoria ( $IC_{50}$ ) que causa la reducción del 50% de la velocidad de utilización de sustrato máxima en la prueba sin sulfuro o control ( $q_{max}$ ). En la Figura 3.9 se puede observar que uniendo los puntos se obtiene un valor de  $IC_{50}$  de 325 mg  $H_2S$ /L y haciendo una regresión lineal se encuentra un valor de 360 mg  $H_2S$ /L, pues a estas concentraciones fue donde la velocidad de utilización de sustrato se redujo a la mitad con respecto a la  $q_{max}$  obtenida en la prueba sin sulfuro.



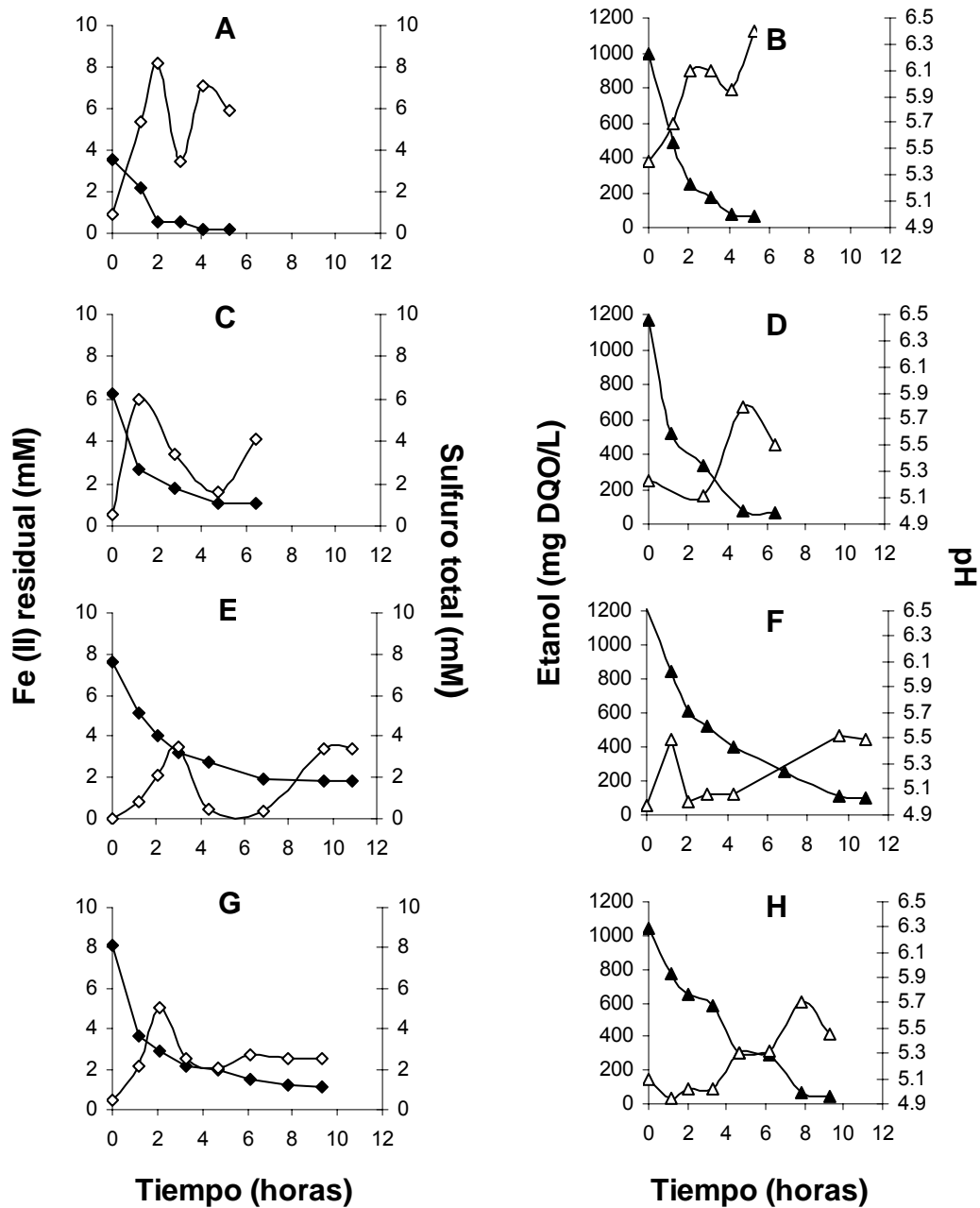
**Figura 3.9** Reducción de la velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) con el incremento de la concentración de sulfuro no disociado ( $H_2S$ ). Las líneas punteadas indican la concentración de  $H_2S$  que provoca la reducción del 50% de la velocidad de utilización de sustrato ( $IC_{50}$ ).

### 3.2.1.3 Etapa III: Cinéticas con hierro

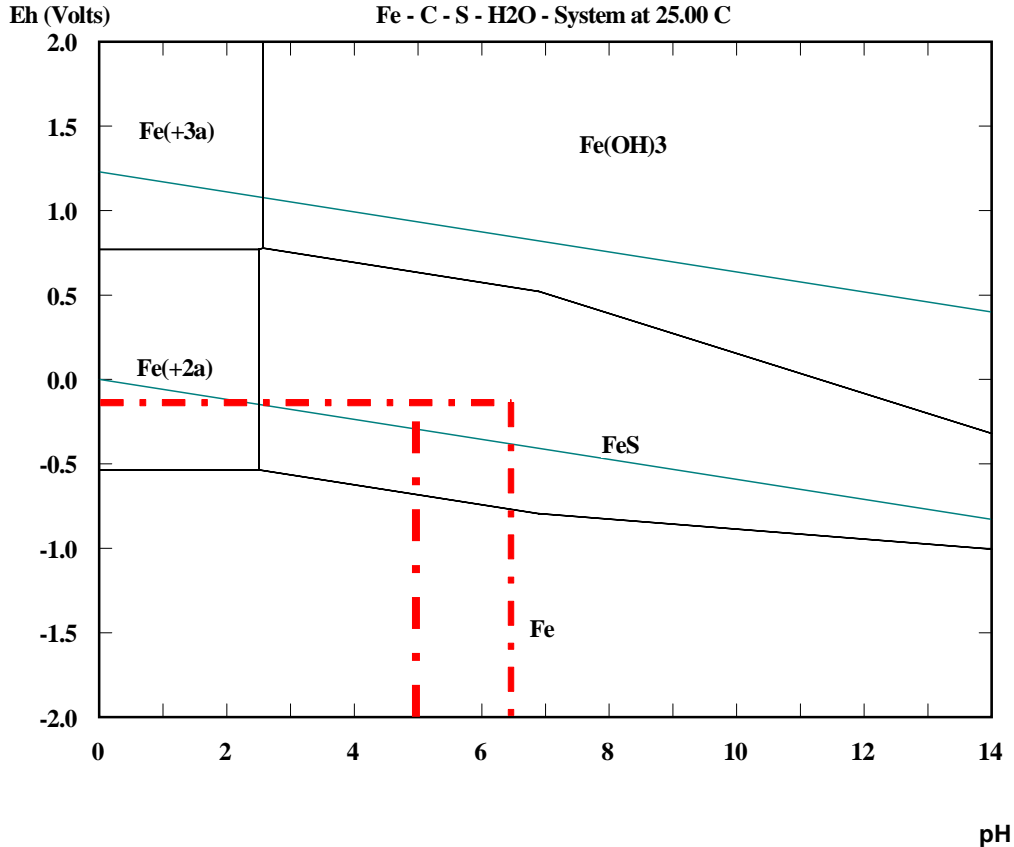
Para determinar la constante de inhibición aparente por hierro ( $K_{I\ app}$  de  $Fe^{+2}$ ), se evaluaron cinco concentraciones de hierro ( $Fe^{+2}$ ) disueltas, adicionadas en un pulso en forma de  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ : 4.7, 7.4, 8.1, 8.5 mM. Una parte del hierro adicionado en el pulso se precipitó con el sulfuro existente en el reactor, por lo que las concentraciones de hierro residual inicial fueron de 3.5, 6.2, 7.6 y 8.1 mM (Tabla 3.3). El pH del reactor fue aproximadamente 5 después de agregar el pulso que contenía el hierro y los nutrientes a un pH de 2.5, de esta forma el hierro se mantuvo en solución como  $Fe^{2+}$  (ver sección 2.13). Los perfiles de consumo de sustrato, hierro residual, pH y producción de sulfuro total se muestran para cada una de las concentraciones de hierro evaluadas en la Figura 3.10. Se puede observar que cuando el hierro adicionado fue de 3.5mM se obtuvieron los valores de pH y sulfuro total más altos, que fueron 6.4 y  $8.14 \times 10^{-3}$  M, respectivamente. Además, a partir del pH de cada uno de los puntos de las cinéticas y la relación molar entre los protones y el  $HCO_3^-$  de la Ecuación 3.5, se pudo conocer la concentración de carbono máxima que se encontraría en el sistema, y que representa las especies de carbono ( $CO_2$  y  $HCO_3^-$ ) que eventualmente podrían precipitar el hierro como  $FeCO_3$ , dicha concentración fue de  $3.82 \times 10^{-6}$  M de C.



Posteriormente, con las concentraciones de hierro adicionado al reactor ( $8.5 \times 10^{-3}$  M), sulfuro total producido ( $8.1 \times 10^{-3}$  M) y carbono calculado ( $3.8 \times 10^{-6}$  M) se generó un diagrama de Pourbaix que se muestra en la Figura 3.11.



**Figura 3.10** Perfiles de concentración de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) residual ( $\blacklozenge$ ), sulfuro total ( $\diamond$ ), DQO ( $\blacktriangle$ ), y pH ( $\triangle$ ) para las siguientes concentraciones de hierro (mM): A y B 3.51; C y D 6.26; E y F 7.65; G y H 8.12.



**Figura 3.11** Diagrama de potencial redox (Eh) contra pH para un sistema Fe C-S-H<sub>2</sub>O. Las fases sólidas son Fe(OH)<sub>3</sub>, y Fe(S). La fase sólida de FeCO<sub>3</sub> no fue significativa.

Las líneas punteadas gruesas que se observan en la Figura 3.11 indicaron que, bajo las condiciones de pH mínimo y máximo alcanzado (4.9 y 6.4), y potencial redox de -0.18V en el sistema, se pudo trabajar en una zona donde el hierro (Fe<sup>+2</sup>) adicionado al reactor solamente se precipitó con sulfuro en forma de FeS, ya que según el diagrama la concentración de carbono no fue significativa para formar especies con el hierro. Es por esto que en el diagrama de Pourbaix no se observa la especie FeCO<sub>3</sub>. De igual forma, el hierro no pudo haber precipitado como Fe(OH)<sub>3</sub>, ya que el potencial redox tendría que ser cercano a 0.8. La formación de FeS es la especie precipitada más favorable, ya que en el tratamiento biológico de efluentes con metales disueltos los sulfuros metálicos son los productos más deseables, debido a su facilidad de eliminarlos del sistema por presentar baja solubilidad (Kaksonen *et al.*, 2003a).

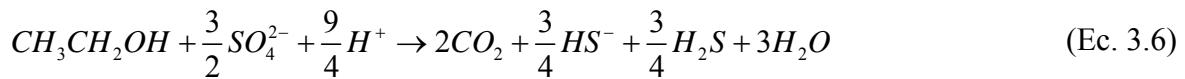
Para conocer la concentración de hierro que se precipitó como FeS en el tiempo cero de cada una de las cinéticas, se determinó la diferencia entre el hierro disuelto adicionado en el pulso y el hierro inicial en solución después de 5 minutos de recircular el líquido dentro del reactor (tiempo mínimo para mezclar el contenido del pulso en el reactor, determinado con azul de metileno como trazador). Con esos datos, se construyó la Tabla 3.3 que proporciona también información de la concentración de sulfuro existente en el reactor antes de la adición del pulso, así como del sulfuro y hierro residual después de la adición del pulso (tiempo cero), para cada una de las cinéticas realizadas. También se muestra el hierro residual final y el porcentaje de remoción de hierro como FeS.

**Tabla 3.3** Concentraciones en el reactor de sulfuro antes del pulso e inicial al tiempo 0; hierro adicionado, inicial en solución, precipitado como FeS y residual final; porcentaje de remoción de hierro.

Sulfuro en el reactor (mM)	Sulfuro inicial en tiempo 0 (mM)	Hierro adicionado en el pulso (mM)	Hierro inicial en solución (mM)	Hierro precipitado como FeS inicial (mM)	Hierro residual final (mM)	Porcentaje de remoción (%) de Fe
3.8	0.8	4.0	3.5	1.2	0.1	96
7.7	0.5	7.4	6.2	1.1	1.0	85
2.9	0	8.1	7.6	0.4	1.8	78
3.8	0.5	8.5	8.1	0.3	1.0	87.21

A partir de los perfiles de consumo de DQO (Figura 3.10), se calculó la velocidad de consumo de sustrato ( $q$ ), al determinar la pendiente de la parte exponencial de la gráfica y dividirla entre los SSV contenidos en el reactor. Para las concentraciones de hierro inicial en solución de 3.1, 5.5, 6.6 y 7.0 mmol los valores de  $q$  determinados fueron de 0.44, 0.40, 0.35 y 0.19 g DQO/g SSV-día respectivamente (Tabla 3.4).

Por otro lado, se determinó un balance de DQO consumido sólo por sulfatorreducción, con la producción de sulfuro que fue estimada teóricamente, a partir de los perfiles de sulfuro total, de sulfuro en equilibrio con la fase gas calculado por la ley de Henry y del sulfuro necesario para precipitar el hierro residual. Para calcular dicho balance también se utilizó la Ecuación 3.6.



La equivalencia teórica que se utilizó para convertir el etanol a DQO fue de 0.48 g de etanol por gramo de DQO (Ecuación 3.7).



El perfil de DQO calculado en base al sulfuro teórico, indicó que, durante las primeras horas transcurridas (2 ó 3), la pendiente fue muy similar a la del perfil de DQO experimental, por lo que se asumió que, en ese intervalo de tiempo, la mayor parte de la DQO fue utilizada por el proceso de sulfatorreducción.

Por otro lado, para tratar de encontrar una correlación en la disminución de los valores de la velocidad de utilización de sustrato para cada una de las cinéticas experimentadas (Tabla 3.4), se efectuó un balance de sulfuro teórico máximo producido para cada cinética, tomando en consideración que todo el sulfato adicionado estequiométricamente ( $DQO/SO_4^{2-} = 0.66 \rightarrow 1.5 \text{ g } SO_4^{2-}$ ) se empleó para oxidar 1 g DQO/L, y fue reducido a sulfuro. Los resultados del balance indicaron que en todas las cinéticas se producirían 15.78 mM de sulfuro total más la concentración de sulfuro inicial en el tiempo cero. Para el cálculo se tomó en consideración solamente la parte de sulfuro no disociado (debido a que más del 90% del sulfuro presente en las cinéticas estaba en forma de  $H_2S$ ) a partir del pH final de cada una de las cinéticas. Así como también, se calculó la concentración de  $H_2S$  teórico residual en solución, considerando que todo el hierro inicial en solución, fue precipitado con el  $H_2S$  teórico máximo en solución (Tabla 3.4).



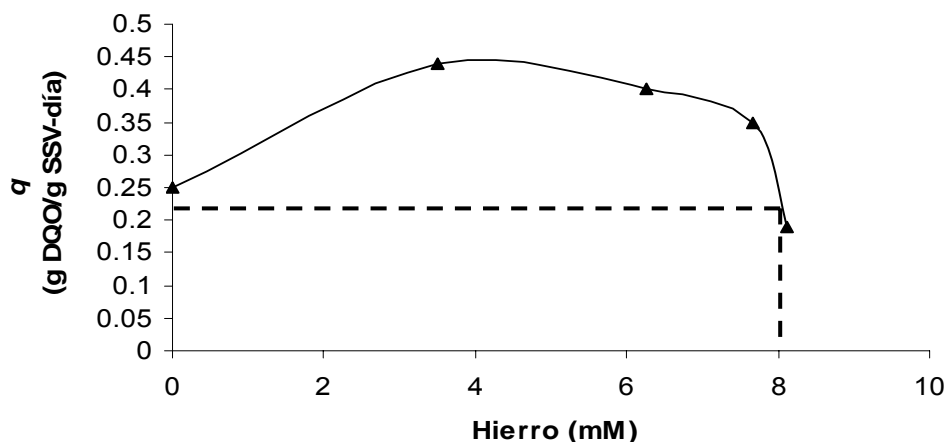
**Tabla 3.4** Hierro inicial en solución, sulfuro no disociado teórico máximo y residual en solución y sulfuro no disociado experimental; velocidades de utilización de sustrato ( $q$ ) y velocidad máxima de utilización de sustrato en la prueba control sin hierro (0.25 g DQO/g SSV-día).

Hierro inicial en solución (mmol)	Sulfuro no disociado teórico máximo en solución (mmol) ‡	Sulfuro no disociado teórico residual en solución (mmol) *	Sulfuro no disociado experimental residual en solución (mmol)	$q$ (g DQO/g SSV-día)
0	0	0	0	0.25
3.1	13.9	10.8	4.1	0.44
5.5	14.0	8.5	5.1	0.40
6.6	13.2	6.6	2.8	0.35
7.0	13.7	6.7	2.1	0.19

‡: Considerando que todo el sulfato se reduce a sulfuro.

\*: Considerando que todo el hierro inicial en solución, se precipita con el sulfuro teórico máximo en solución.

Posteriormente, con las concentraciones de hierro inicial en solución y los valores de  $q$  que fueron determinados a partir de los perfiles de DQO experimental (Tablas 3.3 y 3.4 respectivamente), se determinó el valor de la concentración inhibitoria aparente del hierro ( $CI_{50\text{ app}}$ ), que causa la reducción del 50% de la velocidad de utilización de sustrato máxima obtenida a la concentración mínima de hierro inicial en solución (3.5mM). En la Figura 3.12 se indica el valor de  $CI_{50\text{ app}}$  que fue de 8 mM. El valor de  $q$  de 0.25 g DQO/g SSV-día corresponde a la prueba control sin la adición de hierro.



**Figura 3.12** Valor de  $q$  para la prueba control (0.25 g DQO/g SSV-día) y perfil de la velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) con el incremento de la concentración de hierro inicial en solución. Las líneas punteadas indican la concentración de hierro que provoca la reducción del 50% de la velocidad de utilización de sustrato máxima ( $IC_{50\text{ app}}$ ).

Finalmente, se determinó una constante de inhibición aparente por hierro,  $K_{I\ app}$ , a partir de las concentraciones de hierro residual en solución y las velocidades de utilización de sustrato (Tablas 3.3 y 3.4) ajustadas por mínimos cuadrados a la Ecuación 3.4. El valor de la constante de inhibición aparente por hierro fue de 10.28 mM.

## 4. Discusión

### 4.1 Reactor en continuo

El reactor UASB fue operado en continuo y en estado pseudo-estacionario por un periodo de 151 días. En la Figura 3.3 se puede observar que el reactor tuvo un comportamiento estable, por lo que se puede concluir que los experimentos que se realizaron en lote no afectaron la eficiencia de remoción de DQO, pues en la primera etapa ésta fue de 80% y en las etapas II y III se alcanzó, en promedio, 95% de eficiencia. Lo anterior indicó una adaptación favorable del lodo granular al etanol como fuente de carbono. Este comportamiento estable en la remoción de DQO pudo deberse también a que la carga orgánica volumétrica se mantuvo con un valor constante de 2.4 g DQO/L-día en las tres etapas de experimentación. De tal forma que, el reactor UASB resultó ser robusto a los disturbios en su operación, ya que la realización de las pruebas en lote no afectaron su desempeño en continuo.

Durante toda la operación del reactor en continuo, el afluente fue alimentado a un pH de 5 y el seguimiento del pH promedio en el efluente proporcionó un valor de 7, este aumento se debió a la producción de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  durante la oxidación sulfidogénica del etanol como donador de electrones.

Con respecto al seguimiento del sulfuro total en el efluente se observó que durante las tres etapas de experimentación la concentración de sulfuro total fue oscilatoria (Figura 3.3 B). Patrones de oscilación de sulfuro en el efluente también fueron reportados en un reactor híbrido anaerobio a escala laboratorio operado con una mezcla de propionato: butirato: etanol (1:1:1) a pH de 8. Dichas oscilaciones se debían a que las BSR eran reversiblemente inhibidas a ciertas concentraciones de sulfuro producido en el reactor, principalmente en forma de  $\text{H}_2\text{S}$ , afectando la eficiencia de remoción de DQO (O'Flaherty y Colleran, 1999). Los patrones de oscilación de sulfuro fueron similares a los reportados por Vavilin *et al.* (1994) quienes usan un modelo de digestión anaerobia para estudiar fenómenos de inhibición en consorcios anaerobios; dichos autores indicaron que la inhibición por sulfuro estaba correlacionada con la oscilación en el pH. En este estudio no es posible atribuir las oscilaciones de sulfuro a su efecto inhibitorio sobre las BSR, como lo

indicaron los autores mencionados, debido a que el comportamiento de la remoción de la DQO alcanzó eficiencias del 95%.

Por lo tanto, es posible que las oscilaciones observadas estén relacionadas, por un lado, a las variaciones de la concentración de etanol, sulfuro y hierro que se utilizaron para cada etapa. Por otro lado, también podrían estar asociadas con las pequeñas variaciones en el pH (Figura 3.3B), debido principalmente a que como el primer valor del  $pK_a$  del sulfuro de hidrógeno es alrededor de 7, pequeñas variaciones en el intervalo de pH de 6-8 pueden afectar significativamente la concentración del sulfuro en forma no disociada,  $H_2S$  (Visser, 1995). Asimismo, debido a que el equilibrio entre  $H_2S$  en solución y el  $H_2S$  en la fase gas es gobernado por la Ley de Henry, el  $H_2S$  que se escapa a fase gas por el biogás producido, puede disminuir significativamente la concentración de  $H_2S$  en la fase líquida (Lens *et al.*, 1998).

## 4.2 Etapa I: Cinéticas con etanol

Los resultados de las cinéticas con etanol a diferentes concentraciones (Figura 3.4), llevadas a cabo en la primera etapa de experimentación del reactor UASB operado en lote, indicaron que conforme se fue aumentando la concentración de etanol se obtuvo una velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) cada vez mayor, puesto que el valor de la pendiente obtenida al graficar el consumo de DQO contra tiempo fue en aumento hasta obtener valores de  $q$  en promedio de  $0.24 \pm 0.02$  g DQO/g SSV-día. Sin embargo, a la concentración de 2.8 g DQO/L se observó que el sistema había alcanzado una fase estacionaria, donde la velocidad ya no dependía de la concentración de sustrato (Figura 3.4). No se evaluaron concentraciones más altas de etanol porque los resultados obtenidos en botellas serológicas indicaron que a las concentraciones mayores a 3 g DQO-etanol/L ya se estaba trabajando en la fase estacionaria (Figura. 3.2).

El ajuste matemático tipo Monod para todos los valores de  $q$  obtenidos a diferentes concentraciones de etanol (Figura 3.6), determinó que el valor de  $q_{max}$  fue de 0.25 g DQO/g SSV-día y el valor de la constante de afinidad,  $K_s$ , fue de 0.18 g DQO/L equivalente a 86.2 mg/L de etanol. Por otro lado, Nagpal *et al.* (2000) utilizaron etanol como sustrato para un cultivo sulfatorreductor enriquecido en lote y en botellas serológicas determinando un valor de  $K_s$  con etanol de 200 mg/L; al comparar su valor con el de 86.2 mg/L de etanol obtenido

en este trabajo, se observa una mayor afinidad al etanol, esto puede ser debido a que los autores tenían un cultivo de BSR solamente y en el presente trabajo se tenía un consorcio en donde no solo las BSR podían consumir el etanol y, por lo tanto, al estar en competencia, la  $K_s$  disminuye. Por su parte, O'Flaherty *et al.* (1998) encontraron una  $K_s$  de 30 mg/L para las BSR de un lodo granular adaptado a sulfato y etanol como sustrato, la comparación de las  $K_s$  indicó que el lodo granular del trabajo de O'Flaherty tuvo más afinidad al etanol que las BSR que se encontraban en el lodo granular utilizado como inoculo para el presente trabajo y las BSR reportadas por Nagpal *et al.* (2000).

Es necesario decir que es posible ajustar los datos experimentales a otro tipo de modelos matemáticos en donde se incluyan los fenómenos de transporte, debido a que en el lodo granular hay dos características importantes, las fisicoquímicas (tamaño del lodo granular y el coeficiente de difusión efectivo) y las biológicas (velocidad de utilización de sustrato máxima) (Omil *et al.*, 1998). Los resultados de este trabajo se ajustaron al modelo de Monod que es para sistemas homogéneos, aún cuando el presente trabajo fue realizado en un sistema heterogéneo. Sin embargo, el ajuste matemático utilizado para determinar  $q_{max}$  y  $K_s$  a partir de la ecuación de Monod es válido, pues generalmente este es el modelo más utilizado para describir el comportamiento de los microorganismos bajo condiciones anaerobias. Ejemplo de ello es el trabajo realizado por González-Gil *et al.* (2001), que estudiaron la cinética y fenómenos de transporte en lodo granular usando el modelo de Monod, y encontraron que las limitaciones en el transporte de masa externo no son importantes bajo las condiciones normalmente encontradas en reactores anaerobios operados a velocidades ascensionales de 1 m/h. Por otro lado, Nagpal *et al.* (2000) desarrollaron un modelo de estudio basado en la ecuación de Monod, debido a que consideraron el crecimiento de BSR en etanol y simulaban variaciones de pH asociadas a las reacciones de formación de producto. Asimismo, Omil *et al.* (1998) estudiaron la competencia a largo plazo entre bacterias sulfatorreductoras y microorganismos metanogénicos afines al acetato, durante un tratamiento de AGV en un reactor UASB inoculado con lodo granular. Dichos autores usaron los parámetros cinéticos de Monod para investigar los resultados de la competencia, encontrando que las BSR predominarían sobre las metanogénicas después de 200 días con AGV y después de 400 días con acetato como sustrato.

### 4.3 Etapa II: Cinéticas con sulfuro

El objetivo de esta etapa fue cuantificar el efecto inhibitorio del sulfuro sobre la velocidad máxima de utilización de sustrato ( $q_{max}$ ). En la Tabla 3.2, se puede observar que el valor de  $q_{max}$  se va reduciendo en función del aumento en la concentración de sulfuro, indicando que a 424 mg ST/L y 339 mg H<sub>2</sub>S/L se provoca una inhibición del 60% sobre la  $q_{max}$ . En la literatura se reporta que la toxicidad del sulfuro es dependiente del equilibrio químico y éste a su vez del pH que tiene el medio, ya que el sulfuro no disociado (H<sub>2</sub>S) es conocido como la forma de sulfuro más tóxica debido a que puede pasar de la membrana celular lipídica al citoplasma (Okabe *et al.*, 1994; Utgikar *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2004; Greben *et al.*, 2005).

En este estudio el pH promedio inicial y final de todas las cinéticas estuvo en 6.2 y 6.5, respectivamente (Figura 3.9). En estos valores de pH la fracción de sulfuro no disociado es de 85%. Por lo tanto, se puede decir que la actividad bacteriana fue afectada negativamente debido a la presencia de H<sub>2</sub>S, lo que se reflejó en la reducción de la  $q_{max}$ . Los valores de  $K_I$  para ST y H<sub>2</sub>S de este trabajo fueron de 240 y 199 mgS<sup>2</sup>/L respectivamente, estas concentraciones no son muy diferentes debido principalmente a que 85% del sulfuro total que se cuantificó era H<sub>2</sub>S.

Por otro lado, los valores obtenidos de  $K_I$  de ST y H<sub>2</sub>S en un reactor de lecho fluidificado, con una biopelícula y etanol como sustrato fueron de 248 y 84 mg S<sup>2</sup>/L (Kaksonen *et al.* 2004). En el presente trabajo se determinó una  $K_I$  de ST con un valor de 240 mg S<sup>2</sup>/L, la cual es comparable con la obtenida por Kaksonen. Sin embargo, no fueron comparables los valores de las  $K_I$  de H<sub>2</sub>S de ambos trabajos, debido al efecto que tiene el pH sobre el equilibrio del sulfuro de hidrógeno no disociado. En el presente trabajo, el pH fue entre 6.2 - 6.5, en donde la forma de sulfuro no disociado corresponde al 85% y, por otro lado, el pH utilizado por Kaksonen fue de 6.9-7.3 en donde el sulfuro no disociado corresponde al 50-55% del sulfuro total.

En la literatura se reporta que el efecto tóxico del sulfuro depende de las especies bacterianas presentes (O'Flaherty *et al.*, 1998, Maillacheruvu y Parkin, 1996), así como de la forma de la biomasa y del pH, ya que a pH mayor a 7 la inhibición por sulfuro en lodo

granular es causada por la concentración de ST y en lodo suspendido la toxicidad es determinada por la concentración de H<sub>2</sub>S (Visser *et al.*, 1996).

El valor de la constante de inhibición para sulfuro total de 240 mg S<sup>2-</sup>/L concuerda con la investigación realizada por Okabe *et al.* (1995), para un cultivo en lote de *Desulfovibrio desulfuricans* y lactato como donador de electrones, quienes obtuvieron una  $K_I$  ST de 251 mg S<sup>2-</sup>/L sobre la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ). Estas coincidencias en los valores de  $K_I$  ST pueden estar relacionados con el hecho de que las BSR del género *Desulfovibrio sp* están presentes con gran frecuencia en la composición microbiana de gránulos encontrados en reactores anaerobios (Schmidt y Ahring, 1995) y, por lo tanto, es posible que dentro del lodo granular utilizado como inóculo para este trabajo haya existido una población considerable de dichas BSR.

Por otro lado, Visser *et al.* (1996) reportan el efecto tóxico del sulfuro en lodo granular a un intervalo de pH de 7 a 9, en donde observan que las BSR fueron inhibidas por la concentración de ST. Sin embargo, en esta investigación se trabajó en un intervalo de pH más bajo (6.2-6.5) que el reportado por Visser y se observó que el efecto inhibitorio fue causado por el sulfuro en forma de H<sub>2</sub>S, lo cual puede indicar la gran importancia que tiene el pH sobre las especies de sulfuro, ya que en el pH reportado por Visser, la mayor parte del sulfuro total está compuesto por sulfuro disociado (HS<sup>-</sup>) que es la especie de sulfuro a la que las BSR son más tolerantes (Greben *et al.*, 2005).

O'Flaherty *et al.* (1998) indican que ambas especies de sulfuro (H<sub>2</sub>S y ST) pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos debido a que éstos pueden tener dos umbrales de inhibición, uno para H<sub>2</sub>S y otro para ST. También describen que la inhibición del sulfuro hacia los microorganismos metanogénicos, sintróficos y BSR estuvo relacionada con la concentración de H<sub>2</sub>S a valores de pH entre 6.8–7.2 y con la concentración de sulfuro total a valores de pH mayores a 7.2, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo, pues a un pH menor a 7.2 (6.4) se encontró que la forma más inhibitoria era el H<sub>2</sub>S ( $K_I = 199$  mg S<sup>2-</sup>/L) y que fue la especie predominante e inhibitoria para las BSR.

Finalmente, la inhibición del sulfuro no disociado también fue reportada en términos de la  $CI_{50}$  para la velocidad de utilización de sustrato. En la literatura las  $CI_{50}$  de H<sub>2</sub>S reportadas para el crecimiento de BSR en distintos tipos de lodos a pH 6.8 y etanol

como sustrato fueron de 270 a 303 mg H<sub>2</sub>S/L (O'Flaherty *et al.*, 1998). Por otro lado, Visser *et al.* (1996) reportan un valor para la  $CI_{50}$  de 171 mg H<sub>2</sub>S/L para la actividad de utilización de sustrato con lodo granular y acetato a un intervalo de pH 7.2-7.4. En el presente trabajo, la  $CI_{50}$  para la velocidad de utilización de sustrato con etanol y pH 6.2-6.5 tuvo un valor mayor al reportado por los autores anteriormente mencionados, 325-360 mg H<sub>2</sub>S/L (Figura 3.9), lo cual puede indicar que las BSR del lodo granular utilizado como inóculo en éste trabajo fueron más tolerantes a concentraciones mayores de H<sub>2</sub>S.

#### **4.4 Etapa III: Cinéticas con Hierro**

Los perfiles observados en esta etapa son el resultado de varios procesos que ocurren simultáneamente dentro del sistema. Por un lado, se tiene el consumo de DQO por los microorganismos sulfatorreductores, la producción de sulfuro y su equilibrio líquido-gas y, por otro, se tiene la precipitación del hierro (Fe<sup>+2</sup>) con el sulfuro biogénico.

Las cinéticas de hierro llevadas a cabo en el reactor UASB operado en lote generaron resultados que son apropiados para determinar la constante de inhibición aparente por hierro, ( $K_{I\ app}$  de Fe<sup>+2</sup>), que fue el objetivo de esta etapa, así como también fueron adecuados para relacionar el efecto que tiene el hierro sobre las BSR.

Después de realizar una revisión de las reacciones químicas que se llevan a cabo en sistemas de tratamiento para la neutralización de DAM, ya sean alternativos (biorreactores, humedales) y convencionales (neutralización y precipitación química) se encontró que es necesaria una mejor comprensión de la relación entre el hierro y las BSR para el empleo efectivo de este proceso (Kalin *et al.*, 2006).

En la literatura no se encontraron muchos trabajos concernientes al efecto que el hierro tiene sobre el proceso sulfatorreductor. Tabak *et al.* (2004) realizaron estudios respirométricos con BSR hidrogenotróficas para cuantificar la toxicidad e inhibición de metales pesados (Zn, Cu, Fe) a partir de la medición cuantitativa del consumo de hidrógeno. Dichos autores encontraron que el hierro, como especies férricas o ferrosas, no fue tóxico a concentraciones mayores de 7.16 mM, sin embargo, no explican si existió en algún grado la inhibición de las BSR por la presencia de hierro, así como tampoco reportan



el pH al cual realizaron sus experimentos, lo cual impide conocer si el trabajo se llevó a cabo en condiciones óptimas para tener el hierro en solución.

En el presente trabajo, las cinéticas de hierro se realizaron con 1 g DQO-etanol/L que fue la concentración de sustrato que correspondía a la  $q_{max}$  de 0.25 g DQO/ g SSV-día, obtenida de las cinéticas de etanol (prueba control). A partir de este valor, se esperaba que los valores de velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) fueran más bajos, debido a un posible efecto inhibitorio del hierro sobre la velocidad de utilización de sustrato, puesto que teóricamente se calculó que después de adicionar el pulso y llevarse a cabo una precipitación inicial de hierro con el sulfuro presente, existiría una concentración de hierro inicial en solución, que probablemente sería inhibitoria (Tabla 3.3). Los resultados de  $q$  se contraponen al valor de la prueba control (Tabla 3.4), pues se observó que había un incremento en su valor para la mayoría de los casos, desde 0.25 a 0.44, 0.40 y 0.35 g DQO/g SSV-día, para las concentraciones de hierro inicial en solución ( $Fe^{+2}$ ) que tienen valores de 3.5, 6.2 y 7.6 mM, respectivamente (Tabla 3.3). En el único caso en el que se observó una disminución de  $q$  fue a la concentración de hierro inicial en solución de 8.1 mM (Tabla 3.3), para la cual se determinó una  $q$  de 0.19 g DQO/g SSV-día.

En la Figura 3.12, se puede observar que cuando no se tenía hierro en el sistema (prueba control), el valor de  $q$  fue de 0.25 g DQO/g SSV-día, y cuando el hierro inicial en solución fue de 3.5 mM, se tuvo un efecto positivo en el valor de  $q$ , ya que su valor fue casi del doble con respecto a la prueba control (0.44 g DQO/g SSV-día). Sin embargo, conforme se fue incrementando la concentración de hierro en solución, el valor de  $q$  disminuyó gradualmente, aunque es importante destacar que hasta 7.6 mM de hierro en solución, el valor de  $q$  fue mayor que el de la prueba control. En contraste, cuando existió una concentración de 8.1 mM de hierro en el sistema, se observó una disminución mayor en el valor de  $q$ , desde 0.35 a 0.19 g DQO/g SSV-día. Por lo tanto, de manera general se puede observar en la Figura 3.12, que existió una tendencia de disminución en los valores de  $q$  a partir de 3.5 mM de hierro en solución. No es posible asociar dicha disminución solamente al hierro presente en el sistema, debido a que también se generó sulfuro como producto final de la sulfatorreducción que es un agente inhibitorio. Por lo anterior, se asume que las velocidades de utilización de sustrato fueron reducidas por un posible efecto combinado del sulfuro y hierro presente.

Con el objetivo de encontrar una correlación en la disminución de las velocidades de utilización de sustrato ( $q$ ), se construyó la Tabla 3.4. En dicha tabla se puede observar que si todo el hierro inicial en solución reaccionara con el  $H_2S$  máximo teórico en solución, se tendría una cantidad de  $H_2S$  teórico residual en solución mayor en la primera cinética (3.1 mmol de  $Fe^{+2}$ ), que eventualmente iría disminuyendo conforme se incrementa la cantidad de hierro inicial en solución. Asimismo, se indica que en las cinéticas de 6.6 y 7 mmol de hierro, se tendría casi la misma cantidad de  $H_2S$  residual en solución (6.6 y 6.7 mmol), sin embargo, hubo una disminución en el valor de  $q$  de 0.35 a 0.19 g DQO/g SSV-día, lo cual podría asociarse al aumento del hierro inicial en solución, ya que tal vez podría haber provocado un efecto inhibitorio de los microorganismos. No obstante, es necesario decir que esto es una especulación teórica, que solo podría dar una idea de lo que podría haber pasado. Por lo que la caída en los valores de  $q$  para las concentraciones de hierro experimentadas, podría asociarse a un posible efecto inhibitorio combinado del sulfuro y de hierro existente en el sistema, ya que los microorganismos presentes en el lodo inoculado pudieron haber sido afectados por ambos compuestos. Por lo anterior, la  $CI_{50}$  se denominó aparente.

Por otro lado, la probable explicación del aumento en el valor de la velocidad de utilización de sustrato con respecto a la observada en la prueba control es que, posiblemente, el sistema al cual no se le adicionó hierro (prueba control) sufrió una inhibición por producto con el sulfuro generado a partir de la oxidación de etanol y reducción de sulfato. Por lo que, al adicionar hierro en el sistema, se atenuó el efecto que tiene el sulfuro sobre la degradación del sustrato, debido a la precipitación del sulfuro con el hierro adicionado formando sulfuro ferroso ( $FeS$ ). Esta hipótesis se sustenta con lo reportado por Gupta *et al.* (1994), quienes estudiaron las interacciones entre la sulfatorreducción y la metanogénesis de un cultivo microbiano mixto utilizando ácido acético, metanol y ácido fórmico como sustratos, y encontraron que al adicionar hierro al sistema se eliminó la inhibición por sulfuro y la operación del quimiostato fue estable, pues el hierro precipitó con el sulfuro producido. La adición de sales de hierro en reactores es una práctica común para reducir la toxicidad del sulfuro (Hao, 2000), ya que el hierro es el metal más comúnmente usado para precipitar el sulfuro y mantenerlo a bajas concentraciones en los reactores anaerobios (Lens *et al.*, 1998).

Asimismo, Greben *et al.* (2005) reportan que cuando no hay metales en el sistema la acumulación del sulfuro puede provocar una severa inhibición del proceso sulfatorreductor, lo cual permitiría explicar que la presencia del hierro en el sistema efectivamente disminuyó la acumulación del sulfuro. Por lo tanto, es posible decir que debido a la presencia del hierro disuelto en el sistema se logró una disminución del efecto tóxico del sulfuro que permitió el aumento en la velocidad de utilización de sustrato ( $q$ ) por los microorganismos presentes, en comparación con la prueba control en donde no había hierro disuelto en el sistema. Sin embargo, es necesario aclarar que en este trabajo, el hierro en un inicio provocó la atenuación del efecto inhibitorio del sulfuro, pero a ciertas concentraciones, el hierro se volvió inhibitorio. Por lo cual, es posible que el efecto de hierro haya sido más pronunciado con respecto a la prueba control después de 7.6 mM.

Por otro lado, al comparar la concentración de sulfuro máxima producida en las cinéticas con etanol, que fue de aproximadamente 569 mg ST/L, con la concentración promedio máxima de sulfuro para las cinéticas con hierro que fue de 180 mg ST/L, se puede decir que si pudo existir una inhibición por el sulfuro producido en ausencia de hierro. O'Flaherty *et al.* (1998) estudiaron el efecto del pH en las velocidades de crecimiento y los umbrales de toxicidad de sulfuro en botellas serológicas de una variedad de grupos bacterianos involucrados en la digestión anaerobia con acetato, propionato, butirato, etanol y lactato como sustratos y encontraron que a un pH de 6.8 y etanol como sustrato la  $CI_{50}$  fue de 561 mg ST/L. Con lo anterior se podría fundamentar que posiblemente si hubo una inhibición por sulfuro en las cinéticas de etanol, mientras que a la concentración máxima promedio de sulfuro (180 mg ST/L) para las concentraciones de hierro en solución evaluadas de 3.5 a 7.6mM la inhibición estaba atenuada (Tabla 3.3). Pero a la concentración de 8.1 mM de hierro disuelto dicha atenuación ya no se observó; no es posible saber si la disminución en el valor de  $q$  (0.19 g DQO/ g SSV-día) se debió al efecto del sulfuro producido, al hierro disuelto o a una combinación de ambos.

El resultado del modelo de inhibición no competitivo [Ecuación 3.4] para la constante de inhibición aparente por hierro,  $K_{I\ app}$  de hierro, fue de 10.26 mM de  $Fe^{+2}$ . En la Tabla 3.3 se puede observar que las concentraciones de hierro evaluadas en el sistema fueron menores a 10.26 mM, por lo tanto se puede decir que debido a un posible efecto combinado de sulfuro-hierro, la constante  $K_{I\ app}$  de hierro, solamente podría dar una aproximación al

valor real. De igual forma, el valor de 8 mM para la  $CI_{50\ app}$  de la Figura 3.12, proporciona un valor aproximado del valor de  $CI_{50}$  real para los valores de  $q$ , pues como se explicó anteriormente, no es posible separar el efecto provocado por un solo inhibidor (sulfuro o hierro), debido a que la reducción de  $q$  podría ser debida a un efecto combinado de estos, para cada una de las concentraciones de hierro evaluadas.

La  $K_{I\ app}$  y la  $CI_{50\ app}$  por hierro, se calcularon en base a los datos de  $q$  obtenidos a partir del perfil de DQO experimental (Figura 3.10). Cuando se realizaron los balances para determinar cuanta DQO se utilizó para sulfatorreducción, se obtuvo que las pendientes antes de las 2 ó 3 horas coincidían con las de la DQO experimental, lo cual indicó que toda o la mayor parte de la DQO se oxidó por vía sulfatorreducción. La  $K_{I\ app}$  y la  $CI_{50\ app}$  no se calcularon en base a sulfuro porque como se puede observar en la figura 3.10 para la mayoría de los casos, después de las 2 ó 3 horas el perfil de la producción de sulfuro total mostraba una caída pronunciada que impidió el cálculo de una pendiente en donde se tomaran en cuenta más puntos.

Para explicar esta caída en la concentración de sulfuro, se consideraron las posibles interferencias que la pudieron causar. Una probable interferencia es la que pudo haber provocado el hierro en la cuantificación del sulfuro por el método yodométrico, ya que el  $Fe^{+2}$  se pudo haber oxidado a  $Fe^{+3}$  por la presencia del yodo y por lo tanto sobre estimar la concentración de sulfuro. Otra posibilidad pudo haber sido la pérdida del sulfuro líquido a la fase gaseosa de acuerdo con la ley de Henry, al tomar en cuenta el aumento en la cabeza de gas provocada por el muestreo del líquido del reactor; así como el sulfuro que se utilizó en la precipitación con el hierro. Por otro lado, se evaluó la posibilidad de haber formado otras especies reducidas de azufre como son tiosulfato y sulfito, sin embargo, esta consideración se descartó debido a que si se hubieran generado dichas especies, la concentración de sulfuro cuantificado por el método yodométrico hubiera dado una concentración de sulfuro mayor, debido a que éste método puede cuantificar tiosulfato y sulfito y por lo tanto no se hubiera visto esa disminución de sulfuro. También se consideró la posibilidad de haber producido azufre elemental; sin embargo, esto se descartó debido a que se hubiera necesitado una entrada constante de aire y eso no sucedió porque el sistema estaba completamente cerrado y en condiciones reducidas. Waybrant *et al.* (1998) trabajaron con barreras reactivas permeables para el tratamiento de los DAM y encontraron

que en el sistema se forman inicialmente fases carbonatadas de hierro con el  $\text{CO}_2$  producido, que a su vez controlan la formación de  $\text{FeS}$ , debido a que inicialmente el medio está ligeramente saturado con respecto a la siderita ( $\text{FeCO}_3$ ). Sin embargo, conforme pasa el tiempo dicha precipitación tiende a desestabilizarse. Lo anterior podría explicar el hecho de que hayan existido oscilaciones de sulfuro en solución, debido a que, es posible que el sulfuro tienda a precipitar con el hierro, después de que se desestabiliza la fase carbonatada.

Con respecto a las oscilaciones de pH que se observan en la Figura 3.10, estas pueden estar relacionadas con la ecuación de precipitación del hierro con sulfuro [Ecuación 2.1] ya que la formación de  $\text{FeS}$  libera dos moles de  $\text{H}^+$  por cada mol de  $\text{FeS}$  producido. Por lo tanto, los protones generados durante la precipitación tal vez tienden a bajar el pH del sistema.

Por otro lado, en la Tabla 3.3 se puede observar que las concentración de hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) adicionadas al reactor son mayores que la reportada por Kaksonen *et al.*, (2004) de 1.79 mM, quien obtuvo 100% de la remoción de hierro. En este trabajo se obtuvo la remoción de 96% del hierro en solución para la concentración de 4.7 mM y 78-87% para las concentraciones de 7.4, 8.1 y 8.5 mM.

Una contribución de la introducción del ión ferroso en un sistema sulfatorreductor es que al formar el precipitado insoluble con el sulfuro ( $\text{FeS}$ ) puede servir como un amortiguador para reducir la toxicidad causada por la introducción de metales pesados tóxicos (Rittmann y McCarty, 2001) debido a que los metales pueden realizar una reacción de intercambio con el sulfuro ferroso que está en solución al unirse con el sulfuro y desplazar al hierro acomplejado, atenuando de esta forma la toxicidad de los metales pesados tóxicos (Hao *et al.*, 1994).

## 5. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados de la operación del reactor en continuo indicaron que el sistema no sufrió disturbios entre lote y lote, ya que presentó un comportamiento estable al alcanzar eficiencias de remoción mayores a 95% y valores de pH en el efluente alrededor de 7.

El valor de la  $q_{max}$  determinado a partir de las cinéticas de etanol fue la base para comparar las velocidades de utilización de sustrato con la presencia de sulfuro y hierro. El valor de la  $q_{max}$  fue de 0.25 g DQO/g SSV-día y el de  $K_s$  de 0.18 g DQO/L (86 mg etanol/L).

Los resultados de las cinéticas con sulfuro demostraron que el efecto inhibitorio del sulfuro fue provocado principalmente por el sulfuro no disociado ( $H_2S$ ) ya que el pH influyó en la especiación del sulfuro. La constante de inhibición ( $K_I$ ) de sulfuro total fue de 240 mg  $S^{2-}$ /L y el valor de  $K_I$  para  $H_2S$  fue de 199 mg  $S^{2-}$ /L.

El hierro favoreció la actividad sulfatorreductora, los resultados de las cinéticas con hierro demostraron que el efecto inhibitorio del sulfuro se atenuó con la presencia del hierro en solución, ya que este metal precipitó con el sulfuro biogénico formando FeS. Asimismo, permitió un aumento en las velocidades de utilización de sustrato al compararlas con la prueba control sin hierro. Sin embargo, se pudo observar una tendencia de disminución en los valores de  $q$ , que podría estar asociada con un efecto combinado del sulfuro y del hierro en solución. La  $K_{I\ app}$  de hierro, fue de 10.26 mM y la  $CI_{50\ app}$  tuvo un valor de 8 mM. El pH alcanzado en el sistema durante los experimentos en lote para las cinéticas de hierro jugó un papel importante ya que permitió tener disponibilidad de hierro en solución.

Para corroborar que efectivamente se forma un precipitado de hierro con carbonato y posteriormente al desestabilizarse es cuando se forma el sulfuro de hierro (Waybrant *et al.*, 1998), se sugiere que cuando se lleven a cabo estudios en lote con metales tales como el hierro, se realice un análisis de la fase sólida al inicio y al final de la experimentación.

A manera de recomendación se sugiere que cuando se lleven a cabo experimentos de este tipo, el muestreo se realice a intervalos de tiempo más cortos puesto que de esta forma se tendrían más puntos para un mejor cálculo de las velocidades de consumo de sustrato o de producción de sulfuro.

## 6. Referencias bibliográficas

- APHA-AWWA-WPCF 1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20 th edition. American Public Health Association. New York. U.S.A.
- Bailey J.E., Ollis D.F. (1986). Biochemical engineering fundamentals, Second Edition. *Mc Graw- Hill Book Company*. Singapore, pp.122-125
- Bollag D.M., Edelstein S.J. (1991). Protein Methods. Department of Biochemistry, University of Geneva, Geneva, Suiza. Editorial *Wiley –Liss*, 4-5.
- Cabrera G., Pérez, R., Gómez J.M., Cantero A.A. (2005). Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* strains. *J. Hazardous Mat.* **135** (1-3), 40-46
- Celis García, M.L.B. (2004). *Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes*. Tesis doctoral, División de Ciencias Biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, México, D.F., México.
- Cord Ruwisch (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulphides in cultures of sulphate-reducing bacteria. *J. Microbial Methods.* **4**, 3-36.
- Goenka A.A. (2005). Molecular biological and spectroscopic characterization of the [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio Vulgaris*. Tesis doctoral. Max-Planck-Institute für Bioanorganische chemie Mülheim an der Ruhr, Alemania.
- González-Gil G., Seghezze L., Lettinga G., Kleerebezem R. (2001). Kinetics and mass-transfer phenomena in anaerobic granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 125-134.
- Greben H.A., Maree J.P., Eloff E., Murray K. (2005) Improved sulphate removal rates at increased sulphide concentration in the sulphidogenic bioreactor, *Water SA.* **31**, 351-358.
- Gupta A., Flora J.R., Gupta M., Sayles G.D., Suidan M. T. (1994). Methanogenesis and sulfate reduction in chemostats-I. Kinetic studies and experiments. *Water Res.* **28**, 781-793.
- Hao O.J., Huang L., Chen J.M. (1994). Effects of metal additions on sulfate reduction activity in wastewaters. *Toxicol. Environ. Chem.* **46**, 197-212.
- Hao O.J. (2000). Metal effects on sulfur cycle bacteria and metal removal by sulfate reducing bacteria. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed). International Water Association. Londres, pp. 393-413.

- Johnson D.B. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution- Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed). International Water Association. Londres, pp.175-205.
- Jong T., Parry D.L. (2006). Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Water Res.* **40**, 2561-2571.
- Juárez Alcaraz A. (2004). Biolixiviación de minerales sulfuro-ferrosos en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Colima. Colima, México.
- Kaksonen A.H., Franzman P.D., Puhakka J.A. (2003a). Performance and ethanol utilization kinetics of a sulfate reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation.* **14**, 207-217.
- Kaksonen A.H., Riekkola-Vanhanen. M.L., Puhakka J.A. (2003b). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater *Water Res.* **37**, 255-266.
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D., Puhakka J.A. (2004). Effects of hydraulic retention time and toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulphate-reducing metal-precipitating fluidized- bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 333-342.
- Kalyuzhnyi D. V., Fragoso L. C., Martinez R. J. (1997). Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with ethanol as the electron donor. *Microbiology.* **66**, 674-680.
- Kalin M., Fyson A., Wheeler W.N. (2006). The chemistry of conventional and alternative treatment systems for the neutralization of acid mine drainage. *Sci. Total Environ.* **366**, 395-408.
- Karri S., Sierra-Alvarez R., Field J. A. (2006). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere* **62**, 121-127.
- Koch, A. L. (1994). Growth measurement, En: *Methods for general and Molecular Bacteriology* (Eds. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood and N. R. Krieg) American Society of Microbiology, Washington, D.C., 188-191.
- Lens P.N., De Poorter M.-P, Cronenberg C.C., Verstraete W.H. (1995). Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. *Water Res.* **29**, 871-880.
- Lens P.N.L., Visser, A., Janssen A.J.H., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **28**, 41-88.



- Lens P.N.L., Omil F., Lema J.M., Hulshoff Pol L.W. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution- Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed). International Water Association. Londres, pp.153-174.
- Maillacheruvu K.Y., Parkin G.F., Peng C.Y., Kuo W., Oonge Z.I., Lebduschka V. (1993). Sulfide toxicity in anaerobic systems fed sulfate and various organics. *Wat. Env. Res.* **65**, 99-109.
- Maillacheruvu K.Y., Parkin G.F. (1996). Kinetics of growth, substrate utilization and sulfide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utilizers, in anaerobic systems. *Wat. Env. Res.* **68**, 1099-1106.
- Moosa S., Harrison S.T.L. (2006). Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for treatment of acid mine drainage. *Hydrometallurgy*. **86**, 214-222.
- Nagpal S., Chichulcherm S., Livingston A., Peeva L. (2000). Ethanol utilization by sulphate reducing bacteria: An experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 534-543.
- O'Flaherty V., Mahony T., O'Kennedy R., Colleran E. (1998). Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate- reducing bacteria. *Process Biochem.* **33**, 555-569.
- O'Flaherty V., Colleran E. (1999). Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: Process disturbance and remediation. *Biores. Technol.* **68**, 101-107.
- Okabe S., Nielsen P.H., Jones W.L., Characklis W.G. (1995). Sulphide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water. Res.* **29**, 571-578.
- Omil F., Lens P., Visser A., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1998). Long term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 666-685.
- Oude Elferink., S.J.W.H., Visser A., Hulshoff Pol L.W. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 119-136.
- Rittmann B.E., McCarty P.L. (2001). Environmental Biotechnology: principles and applications. *McGraw- Hill*.
- Sani R.K., Peyton B.N., Brown L.T. (2001). Copper-induced inhibition of growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: Assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4765-4772.

- Schmidt J.E., Ahring K. (1995). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 229-246.
- Stumm W., Morgan J.J. (1996). *Aquatic Chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters*. Third edition. Wiley- Interscience Publication. pp.425-515.
- Tabak H., Holder E., Kupferle M., Haines J. EPA U.S. (2004). Use of respirometry to determine metal toxicity through measurement of hydrogen consumption by sulfate reducing bacteria in the presence of heavy metals. En: Fourth SETAC world congress, 25 th Annual meeting in North America, Portland Oregon. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL.
- Tarvin D., Buswell A.M. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 1751-1755.
- Utgikar V.P., Chaudhary N., Koeniger A., Tabak H.H., Haines J. R., Govind R. (2004). Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Res.* **38**, 3652-3658.
- Utgikar V.P., Harmon S.M., Chaudhary N., Tabak H.H., Govind R., Haines J.R. (2001), Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environ. Toxicol.* **17**, 40-48.
- Vavilin V.A., Vasiliev S.V., Rytov S.V., Ponomarev A.V. (1994). Self-oscillating coexistence of methanogens and sulfate-reducers under hydrogen sulfide inhibition and the pH-regulating effect. *Biores. Technol.* **49**,105-119.
- Visser A., Beeksmas I., Zee F., Stams A. J. M., Lettinga G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 549-556.
- Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holanda.
- Visser A., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Wat. Sci. Technol.* **33**, 97-110.
- Yamaguchi T., Harada H., Hisano T., Yamazaki S., Tseng I-C. (1999). Process behaviour of UASB reactor treating a waster containing high strength sulfate. *Water Res.* **33**, 3182-3190.
- Waybrant K.R., Blowes D.W., Ptacek C.J. (1998). Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environ. Sci. Technol.* **32** 1972-1979.

Widdel F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur reducing bacteria. En: *Biology of anaerobic microorganisms* (ed. A.J.B. Zehnder), pp. 469-586, John Wiley and Sons, New York