



**UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**BIOPRECIPITACIÓN DE COBRE POR SULFATO-
REDUCCIÓN EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LODOS
GRANULARES EXPANDIDOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

PRESENTA:

Ramón Axel Valenzuela

HERMOSILLO, SONORA

OCTUBRE DE 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

Ramón Axel Valenzuela

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

30 Sep 11
Fecha



Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia
Presidente

30 Sep 11
Fecha

Armando Tejeda M.

Dr. Armando Tejeda Mansir
Secretario

30 Sep 11
Fecha



Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García
Vocal

30 Sep 11
Fecha



Dra. Mónica Méraz Rodríguez
Sinodal Externo

UNIVERSIDAD DE SONORA
AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Octubre 10, de 2011.

Por la presente se hace constar que el estudiante **RAMON AXEL VALENZUELA**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.


DR. JOSE RONALDO HERRERAURBINA
COORDINADOR
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA:
INGENIERIA QUIMICA

RESUMEN

La biotecnología ambiental utiliza las propiedades de las bacterias sulfato-reductoras (BSR) para la remoción y recuperación de metales en drenaje ácido de mina (DAM). La aplicación del proceso de sulfato-reducción en reactores anaerobios de lodos granulares expandidos (EGSB) representa un nuevo método para la eliminación combinada de materia orgánica (DQO), sulfatos (SO_4^{2-}) e iones metálicos (M^{2+}) en altas cargas. Con lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la remoción simultánea de DQO, SO_4^{2-} y cobre (Cu^{2+}) de un efluente simulado utilizando un reactor EGSB a nivel laboratorio. La operación del reactor se llevó a cabo con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 1d, con velocidades de carga orgánica (VCO) en el rango de 0.74 a 2.0 g DQO/Ld y velocidades de carga de sulfato (VCS) entre 0.14 a 1.5 g SO_4^{2-} /Ld. La relación DQO/ SO_4^{2-} fue disminuida paulatinamente de 5.12 a 0.67. La velocidad de carga del ión metálico (VCM) fue aumentada gradualmente de 0.05 a 0.3 g Cu^{2+} /Ld. Los resultados mostraron eficiencias de remoción máximas de DQO, SO_4^{2-} y Cu^{2+} de 98%, 99% y 100% respectivamente. La producción de sulfuro biogénico alcanzó los 576 mg S^{2-} /L. El sulfuro de cobre (CuS) formado fue removido mediante un sedimentador acoplado al reactor. La mayor producción de biogás fue de 0.272 L Biogás/Ld. En las pruebas de toxicidad en lote la actividad sulfato-reductora (ASR) presentó una concentración inhibitoria (CI_{50}) de 115.2 mg Cu^{2+} /L, mientras que en la actividad metanogénica (AM) fue de 575.3 mg Cu^{2+} /L. Se concluye que el proceso es capaz de remover simultánea y totalmente materia orgánica, sulfatos e iones metálicos del influente sintético. Además, el proceso es apto para el tratamiento de concentraciones de metales divalentes en el rango de 0.05 a 17.6 mmol M^{2+} /L.

ABSTRACT

Environmental biotechnology uses the features of the sulfate-reducing bacteria (SRB) for metal removal and recovery in acid mine drainage (AMD). The application of sulfate-reducing process in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors represents a new method for the combined elimination of organic matter (COD), sulfates (SO_4^{2-}) and metals (M^{2+}) in high charges. With the above, the aim of this study was to evaluate the simultaneous removal of COD, SO_4^{2-} and copper (Cu^{2+}) of a synthetic effluent employing a laboratory-scale EGSB reactor. The operation of the reactor was carried out with a hydraulic retention time (HRT) of 1d, with organic loading rates (OLR) in the range from 0.74 to 2.0 g DQO/Ld and sulfate loading rates (SLR) between 0.14 to 1.5 g SO_4^{2-} /Ld. The COD/ SO_4^{2-} ratio was gradually lessen from 5.12 to 0.67. The metallic ion loading rate (MLR) was progressively increased from 0.05 to 0.3 g Cu^{2+} /Ld. The results showed respectively maximum removal efficiencies of COD, SO_4^{2-} and Cu^{2+} of 98, 99 and 100%. The biogenic sulphide production reach to the 576 mg S^{2-} /L. The formed copper sulphide (CuS) was removed from the reactor by an attached settler. The largest biogas production was 0.272 L Biogas/Ld. In the batch toxicity tests sulfate-reducing activity (SRA) presented an inhibitory concentration (IC_{50}) of 115.2 mg Cu^{2+} /L, while in the methanogenic activity (MA) was of 575.3 mg Cu^{2+} /L. It concludes that the process is able to remove simultaneously and entirely organic matter, sulfates and metal ions of the synthetic effluent. In addition, the process is suitable for the treatment of divalent heavy metals concentrations in the range from 0.05 to 17.6 mmol M^{2+} /L.

DEDICATORIA

A Mi Madre....

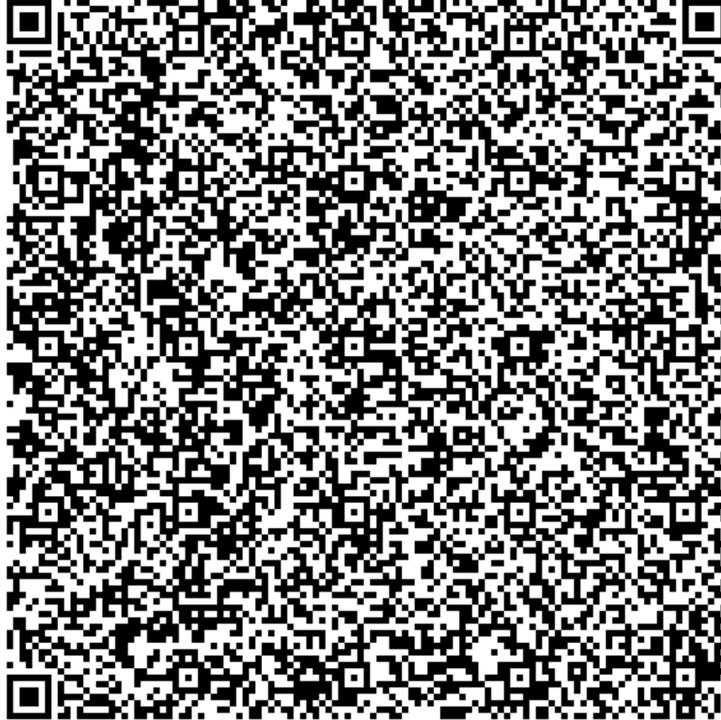


TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| LISTA DE TABLAS | xi |
| GLOSARIO DE TÉRMINOS | xii |
| AGRADECIMIENTOS | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS..... | 1 |
| 1.1. Introducción. | 1 |
| 1.2. Justificación..... | 4 |
| 1.3. Créditos Institucionales. | 5 |
| 1.4. Objetivos. | 5 |
| 1.4.1. Objetivo General..... | 5 |
| 1.4.2. Objetivos Particulares..... | 5 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 6 |
| 2.1. Bacterias Sulfato-Reductoras..... | 6 |
| 2.2. Papel de las Bacterias Sulfato-Reductoras en la Digestión Anaerobia. | 7 |
| 2.3. Fuentes de Carbono para el Proceso de Sulfato-Reducción..... | 8 |
| 2.4. Ventajas del Proceso de Sulfato-Reducción en el Tratamiento de Efluentes. .. | 11 |
| 2.5. Proceso de Sulfato-Reducción para la Bioprecipitación de Metales. | 11 |
| 2.6. Precipitación Selectiva de los Metales. | 12 |
| 2.7. Factores que Afectan el Proceso de Sulfato-Reducción. | 13 |
| 2.7.1. Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | 13 |
| 2.7.2. Efecto del pH. | 13 |
| 2.7.3. Efecto de la Temperatura. | 14 |
| 2.7.4. Efecto del Sulfuro. | 15 |
| 2.7.5. Efecto de los Metales..... | 16 |
| 2.8. Estrategias de Adaptación de un Lodo Sulfato-Reductor. | 17 |
| 2.9. Tipos de Reactores Empleados para el Proceso de Sulfato-Reducción. | 18 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.9.1. | Biorreactores de Alta Tasa..... | 20 |
| 2.9.2. | Reactor Anaerobio de Lodos Granulares Expandidos..... | 22 |
| 2.9.3. | Ventajas del Reactor EGSB en Aplicaciones de Sulfato-Reducción. | 23 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 27 |
| 3.1. | Materiales..... | 27 |
| 3.1.1. | Lodo Granular Anaerobio..... | 27 |
| 3.1.2. | Medio de Cultivo para Digestión Anaerobia..... | 27 |
| 3.1.3. | Aguas Residuales Sintéticas..... | 27 |
| 3.1.4. | Reactores en Continuo..... | 28 |
| 3.1.4.1. | Reactor de Lodos Anaerobios de Flujo Ascendente (UASB)..... | 28 |
| 3.1.4.2. | Reactor Anaerobio de Lodos Granulares Expandidos (EGSB)..... | 28 |
| 3.2. | Desarrollo Experimental..... | 28 |
| 3.2.1. | Estudio en Lote..... | 28 |
| 3.2.1.1. | Adaptación del Lodo en Condiciones Sulfato-Reductoras..... | 28 |
| 3.2.1.2. | Ensayo de Inhibición con Cobre..... | 31 |
| 3.2.2. | Estudio en Continuo..... | 31 |
| 3.2.2.1. | Etapa de Arranque..... | 33 |
| 3.2.2.2. | Etapa de Adaptación..... | 33 |
| 3.2.2.3. | Etapa de Bioprecipitación..... | 34 |
| 3.3. | Métodos Analíticos..... | 35 |
| 3.3.1. | Medición del pH..... | 35 |
| 3.3.2. | Relación de Alcalinidades..... | 35 |
| 3.3.3. | Demanda Química de Oxígeno (DQO)..... | 35 |
| 3.3.4. | Determinación de Sulfatos (SO_4^{2-})..... | 36 |
| 3.3.5. | Determinación de Sulfuro (S^{2-})..... | 36 |
| 3.3.6. | Determinación de Cobre (Cu^{2+})..... | 36 |
| 3.3.7. | Determinación de Biogás..... | 37 |
| 3.4. | Cálculos..... | 37 |
| 3.4.1. | Eficiencia de Remoción de DQO..... | 37 |
| 3.4.2. | Eficiencia de Reducción o Conversión de Sulfatos..... | 37 |
| 3.4.3. | Eficiencia de Remoción de Cobre..... | 37 |
| 3.4.4. | Estimación de la Remoción de DQO..... | 37 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.4.5. | Actividades Metanogénica y Sulfato-Reductora. | 38 |
| 3.4.6. | Parámetros Operacionales de los Reactores | 38 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 4.1. | Resultados. | 40 |
| 4.2. | Estudio en Lote. | 40 |
| 4.2.1. | Ensayo de Inhibición con Cobre. | 40 |
| 4.3. | Estudio en Continuo. | 42 |
| 4.3.1. | Desempeño del Reactor UASB. | 42 |
| 4.3.2. | Desempeño del Reactor EGSB. | 42 |
| 4.3.2.1. | Remoción de DQO. | 42 |
| 4.3.2.2. | Conversión de Sulfato. | 44 |
| 4.3.2.3. | Especiación del Sulfuro. | 53 |
| 4.3.2.4. | Bioprecipitación de Cobre. | 58 |
| 4.3.2.5. | Competencia entre Bacterias Metanogénicas y Sulfato-Reductoras. | 61 |
| 4.3.2.6. | Amortiguamiento del pH. | 66 |
| 4.4. | Discusión de Resultados. | 68 |
| 4.4.1. | Estudios en Lote. | 68 |
| 4.4.2. | Estudio en Continuo. | 69 |
| 5. | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 74 |
| 5.1. | Conclusiones. | 74 |
| 5.2. | Recomendaciones. | 75 |
| 6. | ANEXOS | 76 |
| A. | Preparación del Medio Mineral. | 76 |
| B. | Determinación del Equivalente Teórico de la DQO. | 76 |
| C. | Técnica de Relación de Alcalinidades. | 77 |
| D. | Técnica de DQO. | 79 |
| E. | Técnica de Sulfatos. | 81 |
| F. | Técnica de Sulfuros. | 83 |
| G. | Estimación de la Especiación del Sulfuro. | 86 |
| H. | Determinación de Cobre. | 88 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 89 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Degradación anaerobia en presencia de sulfato. | 9 |
| 2. Reactores anaerobios utilizados en aplicaciones de sulfato-reducción. | 19 |
| 3. Reactor UASB. | 29 |
| 4. Reactor EGSB. | 30 |
| 5. Cinética de inhibición por cobre. | 41 |
| 6. Remoción de la fuente de carbono en el reactor EGSB. | 45 |
| 7. Eficiencia de remoción de la fuente de carbono en el reactor EGSB. | 46 |
| 8. Conversión de sulfato en el reactor EGSB. | 49 |
| 9. Eficiencia de conversión de sulfato en el reactor EGSB. | 50 |
| 10. Fracciones del sulfuro en la fase acuosa. | 54 |
| 11. Fracciones del sulfuro disuelto remanente. | 55 |
| 12. Remoción de cobre en la etapa de bioprecipitación. | 59 |
| 13. Eficiencia de remoción de cobre en la etapa de bioprecipitación. | 60 |
| 14. Competencia entre bacterias sulfato-reductoras y metanogénicas. | 63 |
| 15. Amortiguamiento del pH en el reactor EGSB. | 67 |
| 16. Curva estándar promedio de la DQO. | 82 |
| 17. Curva estándar promedio de sulfato. | 84 |
| 18. Curva estándar promedio de sulfuros. | 87 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1. Desempeño de reactores sulfato-reductores en general, para tratamiento de efluentes que contienen metales..... | 21 |
| 2. Desempeño de reactores de lodos granulares expandidos sulfato-reductores para tratamiento de efluentes que contienen sulfatos..... | 25 |
| 3. Desempeño de reactores de lodos granulares expandidos sulfato-reductores para tratamiento de efluentes que contienen metales..... | 26 |
| 4. Condiciones operacionales de las etapas del estudio en continuo..... | 32 |
| 5. Resumen del comportamiento del reactor de lodos anaerobios de flujo ascendente, al final de la etapa de activación de la biomasa..... | 43 |
| 6. Resumen de la remoción de la demanda química de oxígeno en el reactor de lodos granulares expandidos..... | 47 |
| 7. Resumen de la conversión del sulfato y la producción de sulfuro en el reactor de lodos granulares expandidos..... | 52 |
| 8. Resumen de la especiación del sulfuro biogénico en el reactor de lodos granulares expandidos..... | 57 |
| 9. Resumen de la etapa de bioprecipitación en el reactor de lodos granulares expandidos..... | 62 |
| 10. Resumen de la competencia por el sustrato entre las bacterias sulfato-reductoras y las metanogénicas, en el reactor de lodos granulares expandidos..... | 65 |
| 11. Comparación de estudios en reactores de lodos granulares expandidos utilizados para la remoción de metales por sulfato-reducción..... | 73 |
| 12. Componentes del Medio Mineral..... | 76 |

GLOSARIO DE TÉRMINOS

| | |
|------------------|--|
| α | Relación de Alcalinidades |
| AGV | Ácidos Grasos Volátiles |
| AM | Actividad Metanogénica |
| ASR | Actividad Sulfato-Reductora |
| BSR | Bacterias Sulfato-Reductoras |
| CI ₅₀ | Concentración de un tóxico que inhibe el 50% de la actividad |
| DQO | Demanda Química de Oxígeno |
| EGSB | Expanded Granular Sluged Bed |
| F | Flujo de Alimentación |
| F _R | Flujo de Recirculación |
| H ₂ S | Sulfuro no-disociado o no-ionizado |
| HS ⁻ | Sulfuro disociado o ionizado |
| pS | Potencial S ²⁻ |
| SDR | Sulfuro Disuelto Remanente |
| SDT | Sulfuro Disuelto Total |
| SP | Sulfuro Precipitado |
| SSV | Sólidos Suspendidos Volátiles |
| ST | Sólidos Totales |
| T _D | Tasa de Dilución |
| TRH | Tiempo de Residencia Hidráulica |
| T _R | Tasa de Recirculación |
| V ^a | Velocidad Ascensional |
| VCM | Velocidad de Carga del Ión Metálico |
| VCO | Velocidad de Carga Orgánica |
| VCS | Velocidad de Carga de Sulfato |
| VPS | Velocidad de Producción de Sulfuro |
| V _R | Volumen del Reactor |

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora. Mi alma mater, que me ha permitido seguir expandiendo mis conocimientos. A la Institución Becaria del Concejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACyT), que brindó la beca para mi sustento durante mis estudios y los apoyos para la investigación de laboratorio que realizamos. Al personal docente y administrativo del departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, quienes siempre me atendieron cordialmente. A los maestros integrantes del Posgrado en Ciencias de la Ingeniería, que autorizaron mi integración a la maestría. Al maestro Jaime Varela, quien me apoyó para ser aceptado en el Posgrado y me aconsejó en mis momentos de mayor necesidad. A los Doctores Víctor Sánchez y Armando Tejeda, quienes me dieron una segunda oportunidad cuando estuve a punto de fracasar en mí camino científico. Al Dr. Leobardo Valenzuela, quien resolvió mis problemas en la elección de director y tema de tesis. Al Maestro Ángel Antonio Romero quien amablemente nos apoyó en la lectura de las muestras por absorción atómica. A la Dra. Mónica Meraz por aceptar ser mi “Sinodal Externo”. Muy especialmente agradezco al Dr. Francisco Javier Almendáriz, quien me recibió como su tesista, me brindó su apoyo incondicional y siempre confió en mí hasta la última instancia. También, quiero mencionar con mucho cariño a los integrantes del laboratorio de biorremediación. Las Doctoras Onofre Monge y Tere Certucha de quienes siempre recibí apoyo moral y técnico. A Rigoberto Plascencia, mi amigo, confidente y compañero de laboratorio quien me brindó el apoyo moral cuando lo necesite. A Glenda Rigel Duarte, quien me apoyó en mis momentos de mayor cansancio en el laboratorio. Y en general a los integrantes de servicio social que laboraron durante mi estancia en laboratorio de biorremediación. Por último, pero no menos importante, agradezco a mi hermano Larry en quien me he apoyado todos estos años para poder realizar mis estudios universitarios.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción.

La contaminación de los recursos acuíferos con aguas residuales conteniendo metales pesados es uno de los problemas ambientales de mayor relevancia a nivel mundial en lo que va del siglo 21. Los metales son descargados en el ambiente en pequeñas cantidades a través de numerosas actividades industriales (Ertugay & Bayhan, 2008). Sin embargo, varios sectores industriales generan efluentes con altos niveles de iones metálicos. Entre los cuales se incluyen descargas líquidas provenientes de actividades de la minería, fundición, semiconductores, metalurgia y galvanoplastia (Karri *et al.*, 2006). Los metales más frecuentemente encontrados en estas descargas industriales son cobre, zinc, plomo, mercurio, cromo, cadmio, hierro, níquel y cobalto (Altaş, 2008). Estos metales pueden presentar serios problemas para la salud humana y animal, debido a que la mayoría no pueden ser degradados en productos finales no tóxicos. Por tal razón, sus concentraciones deben ser reducidas a niveles aceptables antes de ser vertidos en el ambiente (Badmus *et al.*, 2007). Por lo tanto, la remoción y recuperación de los metales pesados de las aguas residuales es importante para la protección del ambiente y la salud humana, así como también de interés económico para la industria (Bina *et al.*, 2006).

Los métodos convencionales para remover metales pesados provenientes de efluentes industriales como precipitación, oxidación y reducción química, intercambio iónico, osmosis inversa, separación por membranas, tratamiento electroquímico y evaporación; son frecuentemente inefectivos y costosos cuando son aplicados en efluentes diluidos, con concentraciones de metales pesados menores a 100 mg/L (Bina *et al.*, 2006). Las legislaciones ambientales restrictivas, los problemas ecológicos y el alto costo de las tecnologías convencionales para el tratamiento de efluentes conteniendo metales pesados han resultado en la búsqueda de métodos alternativos para la remoción y recuperación de

metales en base a materiales biológicos (Marques *et al.*, 2000; Tomko *et al.*, 2006). Algunas de las ventajas más importantes de las alternativas biológicas para la deposición de metales son: menores costos, mayores eficiencias en la remoción de metales en concentraciones por debajo de 1 mg/L, y selectividad en la remoción de los metales deseados (Alvarez *et al.*, 2007).

El proceso biológico de sulfato-reducción, ha sido descrito como una herramienta potencial para remoción de metales durante los procesos finales de tratamiento y recuperación en efluentes de una variedad de plantas industriales. Bajo condiciones anaerobias, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) reducen el sulfato a sulfuro, el cual reacciona con los metales presentes formando precipitados de sulfuro metálico; caracterizados universalmente por su baja solubilidad en corrientes acuosas. Lo que implica que las aguas residuales que contienen metales pueden ser tratadas efectivamente por éste proceso biológico (Bhagat *et al.*, 2004). La principal ventaja de éste sobre otros procesos biológicos es su capacidad de remoción simultánea de la acidez, la materia orgánica, el sulfato y los metales pesados (Kaksonen *et al.*, 2006). Sin embargo, destaca la posibilidad de recuperación selectiva de metales económicamente importantes (Sampaio *et al.*, 2009). Además, el proceso es ahora aplicado exitosamente para remoción de metales y sulfatos en drenajes ácidos de mina (DAM) y puede ser aplicado para el tratamiento de metales remanentes de en aguas residuales industriales (Bhagat *et al.*, 2004).

Numerosos diseños de reactores sulfato-reductores han sido reportados en la literatura para el tratamiento de DAM y otros efluentes industriales sintéticos y reales (Kaksonen & Puhakka, 2007). Sin embargo, una de los principales limitantes de estos reactores es el pobre contacto del agua residual con la biomasa, por la presencia de zonas muertas con mezclado deficiente (Almendáriz-Tapia, 2005). El reactor anaerobio de lodos granulares expandidos (EGSB, por sus siglas en inglés) es un sistema desarrollado recientemente. Su diseño es en particular provechoso para el tratamiento de aguas residuales diluidas (0.7-0.9 g DQO/L), debido a que sus velocidades ascensionales elevadas (4-10 m/h) garantizan un buen contacto entre el líquido y el lodo anaerobio (Rebac *et al.*, 1998; Yoochatchaval *et al.*,

2008). Además, la alta tasa de recirculación favorece la dilución de las concentraciones de los influentes, siendo esto propicio para el tratamiento de compuestos tóxicos (Almendáriz-Tapia, 2005). Por otro lado, el alto nivel de mezclado puede ser útil para incrementar la transferencia del sulfuro a la fase gaseosa reduciendo los riesgos de inhibición (Valdés *et al.*, 2006). Estas propiedades hacen del reactor EGSB una herramienta conveniente para el tratamiento por sulfato-reducción del DAM y otros efluentes industriales caracterizados por su alta acidez, y por contener altos niveles de sulfatos y metales pesados, además de bajos niveles de materia orgánica (Neculita *et al.*, 2007).

Algunas investigaciones han evaluado la utilidad del EGSB para el proceso de sulfato-reducción en la remoción de compuestos orgánicos, sulfatos y nitratos, retención y caracterización de biomasa sulfato-reductora, evaluación de condiciones de temperatura (psicrófilas, mesófilas o termófilas) y evaluaciones de la relación DQO/SO_4^{2-} ; entre otras (Rebac *et al.*, 1996; Omil *et al.*, 1997a; De Smul & Verstraete, 1999; Weijma *et al.*, 2000a; O'Reilly & Colleran, 2006; Chen *et al.*, 2008). Sin embargo, sólo dos investigaciones se han desarrollado para la remoción de metales en un efluente industrial por este proceso. En uno de los estudios Sierra-Álvarez y *col.*, (2007), propusieron una configuración del proceso en dos etapas, integrando al reactor EGSB un reactor de cristalización de lecho fluidizado conteniendo arena de cuarzo para promover la nucleación heterogénea del sulfuro metálico. El efluente sintético utilizado simuló aguas residuales generadas durante las operaciones de planarización químico-mecánica (CMP) en la manufactura de semiconductores. Aunque el experimento anterior obtuvo buenos resultados comprobando la utilidad reactor EGSB en el tratamiento de aguas residuales con metales pesados, nuevos ensayos deben ser realizados en la optimización del proceso y en la evaluación de su potencial bajo diferentes condiciones operacionales; con distintos tipos de efluentes industriales y con otros arreglos experimentales. En este trabajo se ha propuesto el uso de un diseño en dos etapas que incluye un reactor EGSB acoplado a un sedimentador sencillo (sin matriz para retención de sulfuros metálicos). Con lo anterior, el objetivo de esta investigación es evaluar la remoción simultánea de cobre, sulfatos y materia orgánica en un efluente sintético simulando aguas del Río San Pedro; utilizando un reactor EGSB a nivel laboratorio.

1.2. Justificación.

En el estado de Sonora las actividades mineras han experimentado un desarrollo muy notorio en los últimos años. Lo cual ha generado el deterioro de la calidad del agua en ríos y lagos, principalmente debido a la generación y liberación de aguas ácidas provenientes de minas activas y abandonadas. Estas aguas residuales presentan un alto contenido de metales pesados como Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn. El ejemplo de contaminación más notorio es el originado por la actividad minera de cobre en Cananea, afectando a los Ríos Sonora, Bacanuchi y San Pedro (Gómez-Álvarez, 2001). En el caso particular del agua superficial del Río San Pedro; los niveles de metales pesados, sulfatos y acidez en la zona más cercana a la fuente de contaminación superaron a los valores máximos permitidos por los criterios de calidad del agua (Gómez-Álvarez *et al.*, 2004). Además, las descargas de aguas negras de la ciudad de Cananea agravan aún más el problema, pudiendo convertirse en un conflicto de índole internacional; ya que el río es transfronterizo con el estado de Arizona en Estados Unidos (Carrillo-Moreno, 1986; Gómez-Álvarez, 2001). Por consiguiente, tanto en las zonas contaminadas de manera natural como en los sitios donde se llevan a cabo los procesos de la minería se requiere implementar procedimientos innovadores viables que permitan la remoción de los contaminantes del agua de manera conveniente y efectiva.

El bioproceso de sulfato-reducción surgió como una alternativa factible y económica a los procesos físicos, químicos, físico-químicos y electroquímicos para el tratamiento de este tipo de contaminación. Siendo el más prometedor en el tratamiento de DAM y la recuperación de metales, debido a la remoción combinada de la acidez, los metales y el sulfato. Los sistemas de tratamiento pasivo basados en las bacterias sulfato-reductoras representan un método adecuado y más económico para la biorremediación in-situ de DAM o aguas ácidas como las generadas en el Río San Pedro. Entre estos procesos se encuentran las barreras reactivas permeables, camas de infiltración, humedales, lagunas anóxicas e inyección de sustratos en el subsuelo. Sin embargo, los sistemas de tratamiento activo o biorreactores son más útiles en la prevención de la contaminación y la recuperación de los metales valiosos en los efluentes industriales (Kaksonen & Puhakka, 2007). Debido a lo anterior, se decidió realizar la investigación intitulada:

Bioprecipitación de Cobre por Sulfato-Reducción en un Reactor Anaerobio de Lodos Granulares Expandidos, como tema de tesis para los estudios de maestría.

1.3. Créditos Institucionales.

Esta investigación pertenece al proyecto intitulado: Biotecnología Anaerobia para la Biorremoción de Metales Pesados del Agua Superficial del Río San Pedro, Sonora, México. Bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Almendáriz Tapia. Cuyo número de proyecto es 50844. El cual fue aprobado en la convocatoria 2006 del programa de apoyo complementario para la consolidación institucional de grupos de investigación en la modalidad de retención, perteneciente al Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Cuyo investigador responsable fue el Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García. La investigación fue realizada en el Laboratorio de Biorremediación del Posgrado en Ciencias de la Ingeniería, perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora.

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo General.

- Evaluar la remoción simultánea de DQO, sulfato y cobre (Cu^{2+}) en un efluente industrial simulado, utilizando un reactor EGSB a nivel laboratorio.

1.4.2. Objetivos Particulares.

- Evaluación de la concentración del ión cobre sobre la actividad sulfato-reductora de un lodo granular en sistemas en lote.
- Adaptación del lodo anaerobio metanogénico a condiciones sulfato-reductoras.
- Evaluación de la capacidad de bioprecipitación del cobre por el sulfuro biogénico en un sistema en continuo.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bacterias Sulfato-Reductoras.

Las Bacterias Sulfato-Reductoras (BSR) son microorganismos anaerobios obligados, metabólicamente versátiles provenientes de varias familias y diferentes géneros. Utilizan sulfato u otros compuestos oxidados de azufre como aceptor final de electrones (agente oxidante) para la producción de H_2S . Pueden crecer de forma heterotrófica usando moléculas orgánicas de bajo peso molecular y de manera autotrófica usando hidrógeno y dióxido de carbono (Nagpal *et al.*, 2000; Lens & Kuenen, 2001).

Las BSR son notablemente adaptables y pueden ser encontradas en numerosos ambientes terrestres y acuáticos en los que se ha agotado el oxígeno debido a la descomposición aeróbica de la materia orgánica. Se encuentran principalmente en ambientes anóxicos ricos en sulfatos. Han sido descubiertas en suelos, lodos de estuarios, en aguas dulces, de alcantarillado, marinas, salobres, termales y áreas geotermales, depósitos de sulfuro, en pozos petroleros y de gas, y en el intestino de mamíferos e insectos (Postgate, 1984).

En la búsqueda de una clasificación de los microorganismos sulfato-reductores se han utilizado muchas de sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Entre estas propiedades se encuentran: el tipo de célula, motilidad, condiciones óptimas de crecimiento, capacidad de oxidación de acetato, perfiles de utilización de fuentes de carbono, tipos de enzimas reductoras de sulfitos, tipos de proteínas de transferencia de electrones, composición de nucleótidos del ADN, composición del RNA ribosomal, entre otras (McMahon, 2007). Sin embargo, no hay una clasificación oficial que restrinja o reemplace la utilización de las clasificaciones antiguas.

Una forma tradicional muy sencilla y adecuada de clasificarlas está dada en base a su capacidad para degradar la materia orgánica en forma parcial o total. De acuerdo a esta propiedad pueden ser divididas en dos grupos principales: 1) Oxidantes incompletas del sustrato, que generan acetato como producto final. Estas utilizan lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos como fuente de carbono y energía para reducir el sulfato a sulfuro. Bajo condiciones ideales tienen una velocidad de crecimiento mucho más rápida que las oxidantes completas y pueden lograr tiempos de duplicación de 3 a 4 horas, si son alimentadas con los sustratos que lo favorecen, como hidrógeno y lactato. El grupo está constituido por géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium*. 2) Las oxidantes completas del sustrato a dióxido de carbono y sulfuro. Estos géneros utilizan ácidos grasos, especialmente acetato. Tienen un crecimiento lento, frecuentemente con tiempos de duplicación mayores a 20 horas. El grupo está compuesto por *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium* (Widdel, 1988; Visser, 1995; Nagpal *et al.*, 2000).

2.2. Papel de las Bacterias Sulfato-Reductoras en la Digestión Anaerobia.

Las bacterias sulfato-reductoras son conocidas por presentarse en consorcios de microorganismos involucrados en el proceso de digestión anaerobia, ampliamente utilizado para el tratamiento de aguas residuales. Durante el tratamiento de aguas con altos niveles de sulfato compiten con las bacterias fermentativas o acidogénicas por los productos de la hidrólisis, con las bacterias acetogénicas por sustratos intermediarios como los ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes, y con las bacterias metanogénicas por los sustratos menos complejos como hidrógeno y acetato. El resultado de esta competencia es importante porque determina el rendimiento de los productos finales de la mineralización (sulfuro y metano) (Lens *et al.*, 2000). La actividad de las sulfato-reductores depende principalmente de la disponibilidad de sulfato (Espinosa-Chávez, 2007).

A pesar de que las consideraciones termodinámicas y cinéticas favorecen a las bacterias sulfato-reductoras en la competencia por los sustratos disponibles de la digestión anaerobia (Colleran *et al.*, 1995), en la práctica se ha observado que el resultado de la

competencia puede ser afectado por diversos factores como la concentración de la materia orgánica y sulfato, la relación DQO/SO_4^{2-} , el tipo de sustrato, la presencia de metales traza y otros nutrientes, el tipo de inóculo, las propiedades de inmovilización, la duración del experimento, los factores ambientales como pH y temperatura, y la inhibición por sulfuros (Patidar & Tare, 2005).

El proceso de digestión anaerobia (Figura 1) es un proceso complejo llevado a cabo por las diferentes poblaciones microbianas interactuando en sintrofia. Este se lleva a cabo en varias etapas, como se describe a continuación. 1) Hidrólisis: Ocurre la desintegración de la materia orgánica compleja e insoluble. En esta etapa los carbohidratos, proteínas y lípidos son hidrolizados a azúcares monoméricos, aminoácidos, polioles y ácidos grasos de cadena larga. Es llevada a cabo por las bacterias hidrolíticas. 2) Acidogénesis: Se lleva a cabo la fermentación de compuestos solubles (azúcares, aminoácidos y polioles) y los productos formados son ácidos grasos volátiles, hidrógeno, dióxido de carbono y pequeñas cantidades de etanol y ácido láctico. Es realizada por las bacterias fermentativas o acidogénicas. 3) Acetogénesis: consiste en la conversión de ácidos grasos volátiles a acetato e hidrógeno. Es producida por las bacterias acetogénicas. 4) Metanogénesis: Es la formación de metano por la descarboxilación de acetato, llevada a cabo por las bacterias metanogénicas acetotróficas y por hidrogenación de dióxido de carbono por las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas. 5) Sulfato-Reducción: Se lleva a cabo en la presencia de sulfato. 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 bacterias sulfato-reductoras acetotróficas y de hidrógeno por bacterias sulfato-reductoras hidrogenotróficas (Visser, 1995).

2.3. Fuentes de Carbono para el Proceso de Sulfato-Reducción.

Desde el punto de vista ambiental, la demanda química de oxígeno (DQO) es una medida aproximada del contenido total de materia orgánica presente en una muestra de agua (Romero-Aguilar *et al.*, 2009). Algunas aguas residuales ricas en sulfatos como el DAM y otros efluentes industriales, son usualmente deficientes en materia orgánica.

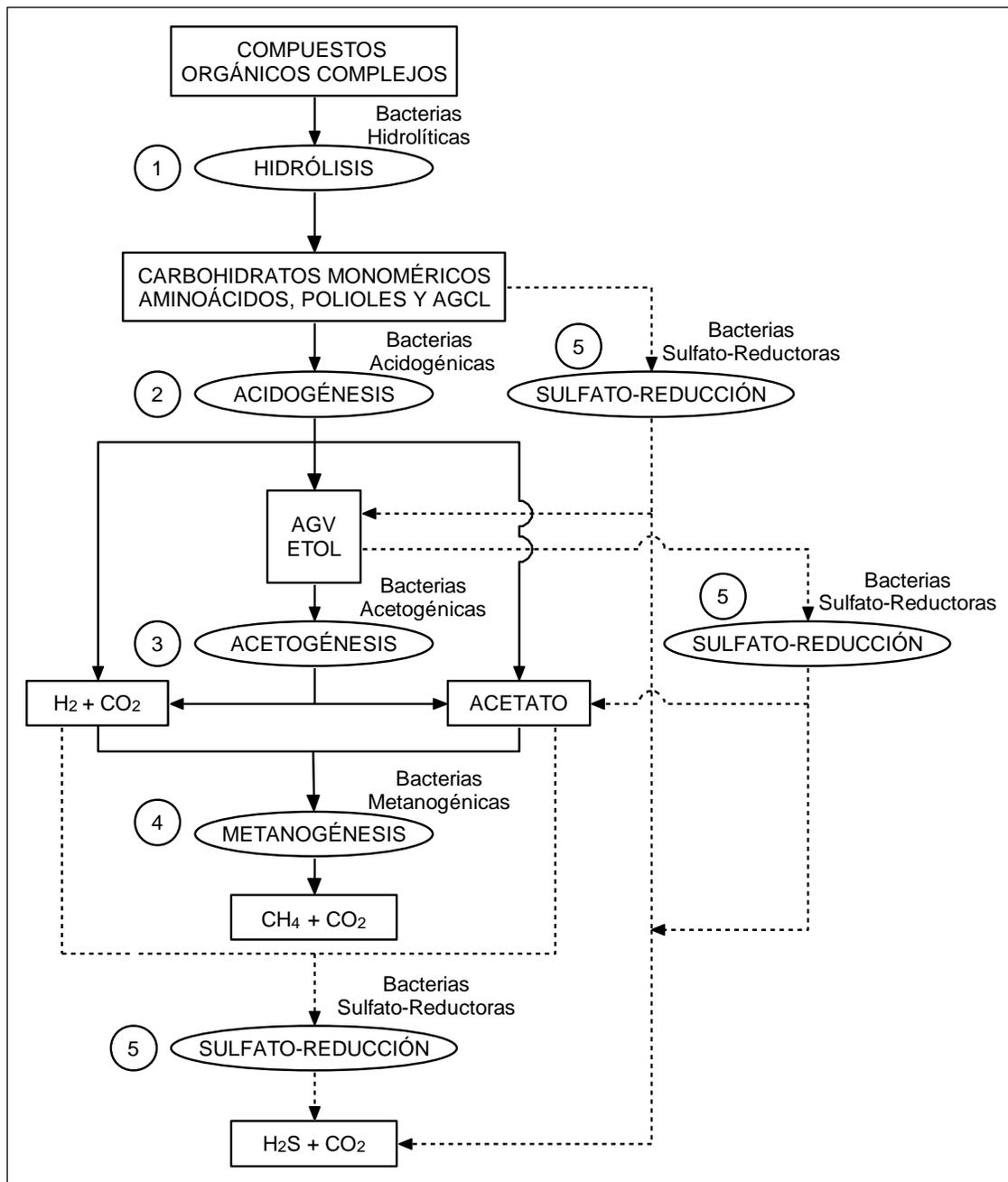


Figura 1. Degradación anaerobia en presencia de sulfato.

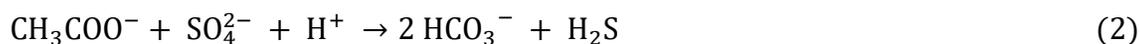
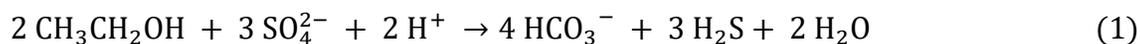
(AGCL)= Ácidos grasos de cadena larga, (AGV)= Ácidos grasos volátiles, (ETOL)= Etanol. Adaptado de Lopes (2007) y Bijmans (2008).

En tales casos es necesario adicionarla con la finalidad de conseguir la reducción completa del sulfato (Liamleam & Annachhatre, 2007). La mínima relación DQO/SO₄²⁻ requerida para conseguir teóricamente la remoción total del sulfato es de 0.67. Lo cual significa que la conversión de 1 gramo de SO₄²⁻ requiere de 0.67 gramos de DQO del compuesto orgánico presente en el agua a tratar (Choi & Rim, 1991).

Las bacterias sulfato-reductoras pueden utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos (Liamleam & Annachhatre, 2007). Para la selección de una fuente de carbono adecuada para aplicaciones de sulfato-reducción se deben considerar los siguientes aspectos: Su precio, su disponibilidad local, el costo del tratamiento del agua residual en sí, la conveniencia para el tratamiento de un agua residual o agua de proceso específica (dependiendo de su volumen, composición, temperatura, pH y salinidad) y las legislaciones relativas a la seguridad ambiental (Bijmans, 2008).

El etanol es la fuente de carbono más útil en la estimulación del proceso de sulfato-reducción y el crecimiento de los microorganismos sulfato-reductores, comparado con el lactato y el acetato. Por el contrario, el acetato es el menos efectivo, ya que es degradado más lentamente y tiende a acumularse en el proceso (Barnes *et al.* 1991; White & Gadd, 1996; Kolmert & Johnson, 2001). El costo de las aplicaciones sulfato-reductoras puede ser reducido significativamente, si se utiliza etanol proveniente de aguas residuales (Bijmans, 2008).

Las reacciones estequiométricas de sulfato-reducción para la oxidación completa de etanol (CH₃CH₂OH) y acetato (CH₃COO⁻) se muestran en las “Ec. (1) y (2)”. Estas pueden ocurrir en un rango de pH de 6.3 a 7.0 (Drury, 1999):



La oxidación del etanol por las bacterias sulfato-reductoras consiste de dos pasos, la oxidación inicial del etanol a acetato “Ec. (3)”, seguida de la oxidación del acetato hasta bicarbonato “Ec. (4)” como se muestra a continuación (Nagpal *et al.*, 2000):



2.4. Ventajas del Proceso de Sulfato-Reducción en el Tratamiento de Efluentes.

El proceso de sulfato-reducción es una valiosa herramienta biotecnológica para la remoción de metales en lixiviados de minas y efluentes industriales. Es considerado potencialmente superior a otros procesos biológicos debido a su capacidad para producir alcalinidad y neutralizar el pH de aguas ácidas; y su facultad para la remoción simultánea de materia orgánica, sulfatos y metales pesados (Tuppurainen *et al.*, 2002; Kaksonen *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2007; Kaksonen & Puhakka, 2007). Por otro lado, recientes estudios han demostrado su utilidad en la inmovilización de metaloides (Arsénico), isótopos radiactivos (Uranio) y Cianuros (Jong & Parry, 2005; Yi *et al.*, 2007; Sirianuntapiboon *et al.*, 2008). Además, se ha visto que puede aplicarse para aumentar la remoción de materia orgánica y en la degradación de compuestos xenobióticos y tóxicos (Van Lier *et al.*, 2001a).

Las ventajas más ampliamente mencionadas del proceso son la baja producción de lodos de sulfuro metálico, con volúmenes más compactos y con baja solubilidad comparado con la precipitación con hidróxidos. Además, de la recuperación de los metales con valor económico, de los sulfuros metálicos precipitados (Kaksonen *et al.*, 2003). Por otro lado, recientemente se han implementado métodos para la recuperación selectiva de los metales implementando el control de pH y la concentración de sulfuro (Sampaio *et al.*, 2009).

2.5. Proceso de Sulfato-Reducción para la Bioprecipitación de Metales.

El proceso para la remoción de iones metálicos se basa en la formación de sulfuros metálicos de baja solubilidad y la neutralización del agua debido a la alcalinidad

producida en la oxidación microbiana de la fuente de carbono (Christensen *et al.*, 1996). Este método ha sido descrito como bioprecipitación (Diels *et al.*, 2001). El proceso puede representarse con las siguientes ecuaciones (Kaksonen & Puhakka, 2007):

Producción de sulfuro y alcalinidad “Ec. (5)” en donde el metanaldehído (CH₂O) representa la fuente de carbono:



El sulfuro biogénico producido precipita los metales disueltos como sulfuros de baja solubilidad “Ec. (6)”. Donde M²⁺ representa metales como Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺:



La reacción de precipitación del metal libera protones “Ec. (6)”, los cuales se suman a la acidez del agua. La alcalinidad de bicarbonato producida en la oxidación sulfidogénica de la materia orgánica “Ec. (5)” neutraliza la acidez producida en la reacción de precipitación del metal “Ec. (7)”.



2.6. Precipitación Selectiva de los Metales.

La gran ventaja de la bioprecipitación es la posibilidad de la separación selectiva de los sulfuros metálicos. Estos sulfuros son altamente insolubles en pH neutros, mientras que algunos como el sulfuro de cobre (CuS), lo son en valores de pH de dos. Se ha demostrado que cada metal precipita a una concentración única de sulfuro o potencial S²⁻ (pS), la cual está directamente relacionada a la solubilidad del producto de sulfuro metálico. El control de estas concentraciones en un precipitador puede realizarse mediante electrodos de pH y electrodos selectivos de iones sulfuro (electrodo pS). La cualidad única del nivel de pS para cada metal, ha sido aplicada exitosamente como un

parámetro de control para precipitar metales selectivamente y obtener sulfuros metálicos puros; los cuales tienen mejor oportunidad de reutilización. El éxito del proceso de precipitación no solo depende de la remoción del metal de la fase soluble, sino también de su separación de la fase líquida. Por consiguiente, los procesos de separación sólido-líquido como la sedimentación o la filtración son de importancia primordial en procesos eficientes de remoción de metales (Lens *et al.*, 2008).

2.7. Factores que Afectan el Proceso de Sulfato-Reducción.

Varios factores como la relación DQO/SO_4^{2-} , el pH, la temperatura, las concentraciones de sulfuros y metales en los efluentes industriales como el DAM pueden afectar el crecimiento y la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. El efecto de estos se discute a continuación (Baskaran, 2005).

2.7.1. Relación DQO/SO_4^{2-} .

La relación DQO/SO_4^{2-} es un parámetro importante que define la existencia de la competencia entre los microorganismos sulfato-reductores y los metanogénicos. El grado de esta competencia aumenta con el decremento de la relación. La estequiometría de las reacciones de sulfato-reducción indica que por encima de una relación de 0.67 hay un exceso de materia orgánica, por lo que coexistirán la metanogénesis y la sulfato-reducción (Omil *et al.*, 1997b; Hulshoff-Pol *et al.*, 1998). Algunos estudios han comprobado que se puede desarrollar una biomasa con actividad completamente sulfato-reductora si se opera con relaciones menores a 0.67 (Omil *et al.*, 1997a; Harada *et al.*, 1994). Algo interesante de esta relación es que cuando se opera a relaciones menores a 0.67 también se presenta la competencia entre los diferentes grupos de sulfato-reductores (Visser *et al.*, 1993a).

2.7.2. Efecto del pH.

El efecto del pH en la competencia de los grupos bacterianos está directamente relacionado con el rango óptimo de crecimiento. Para los sulfato-reductores se encuentra entre 6.0 y 9.0 (Zehnder *et al.*, 1982), mientras que para los metanogénicos entre 6.5 y 7.6 (Rittman & McCarty, 2001). Se ha reportado que en lodos granulares las bacterias

sulfato-reductoras presentan mayores velocidades de crecimiento a pH superiores a 7.5 y las metanogénicas en pH menores a 7.0. También, se ha observado que al disminuir el pH de 8.0 a 7.0, la actividad metanogénica declina debido a la transformación del sulfuro en su forma no disociada (Visser *et al.*, 1996; O'Flaherty *et al.*, 1998).

La mayoría de las bacterias sulfato-reductoras conocidas son inhibidas en valores de pH por debajo de 6 y por encima de 9. Sin embargo, la sulfato-reducción ha sido comprobada en ecosistemas naturales o artificiales en valores de pH inferiores en el rango de 3 a 3.8 (Lopes, 2007). La mayoría de los biorreactores sulfato-reductores o sulfidogénicos son operados en pH cercanos al neutral. No obstante, la sulfato-reducción en pH por debajo o por encima del neutral puede ser de interés, dependiendo de los valores manejados en las aguas de proceso o aguas residuales. En la minería y la industria metalúrgica son producidas grandes cantidades de aguas de proceso y residuales con bajos pH. Sin embargo, el interés industrial sólo se ha enfocado en pH de 5, debido a que bajo condiciones ácidas la inhibición por sulfuros es usualmente la limitante de la sulfato-reducción. De cualquier forma, durante el tratamiento por sulfato-reducción el pH de las aguas es incrementado por la producción de alcalinidad, lo cual puede evitar la necesidad de utilización de biorreactores bajo condiciones ácidas. Por otro lado, en valores altos se ha tenido interés en pH de 8 (Bijmans, 2008).

2.7.3. Efecto de la Temperatura.

Otro factor ambiental importante en la competencia de las bacterias es la temperatura. Existen estudios que indican que las metanogénicas son más sensibles al incremento que las sulfato-reductoras (Rintala & Lettinga, 1992). Las bacterias sulfato-reductoras pueden encontrarse en ambientes con temperaturas extremas. Por tal razón, el proceso de sulfato-reducción puede llevarse a cabo bajo condiciones psicrófilas (0-25°C) y mesófilas (23-35°C), así como en termófilas (35-70°C) (Isaksen & Jørgensen, 1996; Liamleam & Annachhatre, 2007). Sin embargo, las condiciones óptimas de crecimiento se dan en un intervalo de temperatura entre 28 y 32°C (Hao *et al.*, 1996). La mayoría de los biorreactores sulfato-reductores operados hasta hoy son mesófilicos, algunos han sido termófilicos y muy

pocos psicrófilos. Cada especie sulfato-reductora tiene una temperatura óptima y un rango óptimo de crecimiento, pero generalmente las velocidades de conversión y de crecimiento son más altas en temperaturas elevadas. No obstante, también pueden decaer bajo altas temperaturas. Obviamente, la energía requerida para enfriar o calentar un biorreactor contribuye al costo, especialmente para aguas diluidas. Por lo tanto, es sensato operar el reactor bajo temperaturas cercanas a la del agua residual a tratar (Bijmans, 2008).

2.7.4. Efecto del Sulfuro.

El tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato y metales pesados tales como los DAM y aguas residuales del procesamiento de minerales (Nagpal *et al.*, 2000), puede resultar afectado por la potencial toxicidad del sulfuro como producto final de la sulfato-reducción. El sulfuro de hidrógeno es un compuesto tóxico para casi cualquier bacteria (Rinzema y Lettinga, 1988). Su forma no disociada (H_2S) es la especie de sulfuro más tóxica debido a que es una molécula neutra que puede penetrar la membrana celular (González-Silva, 2007). El mecanismo exacto de la toxicidad no ha sido esclarecido. Una posible explicación es la desnaturalización de proteínas mediante la formación de puentes disulfuro entre las cadenas polipeptídicas. Otra teoría es la interferencia en la ruta metabólica para la fijación de dióxido de carbono. Por otro lado, se piensa que el sulfuro puede afectar el pH interno de la célula. Si bien, las especulaciones anteriores pueden ser posibles, una forma de inhibición más probable puede suceder cuando el sulfuro secuestra el hierro u otros metales esenciales presentes en el medio ambiente o en las biomoléculas; causando que los sistemas de transporte de electrones se inactiven (Celis-García, 2004; Baskaran, 2005).

Los estudios realizados tanto en cultivos puros como en mixtos han demostrado que la inhibición por sulfuro es del tipo no competitivo y puede ser reversible (Okabe *et al.*, 1995; Kaksonen *et al.*, 2004). Se ha reportado que a valores de pH sobre 7.8, el grado de inhibición de las bacterias metanogénicas es más elevado que para las sulfato-reductoras. Sin embargo, por debajo de 7.0 no hay diferencia (Koster *et al.*, 1986). Por otra parte, se ha observado que factores como la biomasa utilizada también afectan el grado de inhibición. Por ejemplo, en especies metanogénicas se ha visto que la

inhibición depende de las características de los lodos; siendo el lodo granular menos sensible que los lodos floculentos (Visser *et al.*, 1996).

Los datos disponibles de la sensibilidad de las bacterias sulfato-reductoras al sulfuro en consorcios anaerobios son pocos y muchas veces contradictorios (González-Silva, 2007). Es difícil obtener de la literatura una mayor comprensión acerca de la toxicidad del sulfuro en las poblaciones sulfato-reductoras, ya que no siempre se considera el efecto del pH en los diseños experimentales (Villa-Gómez, 2006). Además, se ha observado que muchas veces no existe una correlación en los resultados de inhibición y toxicidad, debido a que los experimentos no se han realizado bajo condiciones similares. Es decir utilizando reactores, inóculos, sustratos, así como condiciones operacionales de pH, temperatura y TRH comparables (González-Silva, 2007). Por lo tanto, no es posible mencionar datos concluyentes sobre cuál o cuáles son las concentraciones inhibitorias de los consorcios bacterianos anaerobios.

2.7.5. Efecto de los Metales.

Se ha reportado que los metales son agentes inhibitorios o tóxicos para los microorganismos anaerobios, incluyendo las bacterias sulfato-reductoras (Karri *et al.*, 2006; Utgikar *et al.*, 2004). Esto se debe 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); provocando impactos negativos sobre el crecimiento y la actividad bacteriana (Sani *et al.*, 2001).

En la literatura existen marcadas diferencias en cuanto a los niveles inhibitorios o de toxicidad de los metales sobre los microorganismos sulfato-reductores, ya que al igual que el caso del sulfuro, los experimentos se han llevado a cabo bajo diferentes condiciones (González-Silva, 2007). La toxicidad de los metales en el proceso de sulfato-reducción es atenuada por la formación de complejos insolubles con el sulfuro biogénico (Karri *et al.*, 2006), por lo que frecuentemente es necesario que el metal sobrepase significativamente

las concentraciones de sulfuro para causar inhibición. La toxicidad del sulfuro también es disminuida al ser precipitado con la adición de metales como el hierro (Gupta *et al.*, 1994). Varios estudios de sulfato-reducción se han enfocado en la bioprecipitación de los iones metálicos en contacto directo con la biomasa contenida dentro de los reactores. Sin embargo, esta práctica puede resultar en la toxicidad para las bacterias (Chen *et al.*, 2000). Para reducir los efectos inhibitorios de los metales e incrementar el pH en reactores anaerobios, una parte del agua tratada puede ser reciclada y mezclada con el influente. Con esto, el sulfuro remanente en la recirculación reaccionará con los metales presentes precipitándolos antes de entrar en contacto con el lodo anaerobio (Glombitza, 2001). Para prevenir los efectos tóxicos de los metales en cultivos de bacterias sulfato-reductoras se pueden tomar medidas como buscar nuevas cepas de bacterias tolerantes a metales o empleando biorreactores con diseños especiales (Baskaran, 2005).

Otro problema, asociado con la precipitación de los metales dentro del reactor es que los sulfuros metálicos se depositan sobre la biomasa, de tal modo que hay un aumento de volumen por el sedimento contaminado con metales (Esposito *et al.*, 2006). Además, contrario a la creencia común de que sólo los iones metálicos solubles pueden ser inhibitorios; se ha demostrado que los sulfuros metálicos también pueden afectar la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. Estos sulfuros no son en sí mismos tóxicos, pero bloquean el acceso al sustrato y los nutrientes esenciales formando una barrera sobre las paredes celulares bacterianas (Utgikar *et al.*, 2001). Una buena alternativa para desacoplar el proceso biológico y la precipitación del metal es la utilización de un proceso en dos etapas, en donde el paso de la precipitación del metal es separado del sistema biológico (Esposito *et al.*, 2006).

2.8. Estrategias de Adaptación de un Lodo Sulfato-Reductor.

Aunque en las últimas dos décadas se ha llevado a cabo una investigación intensiva, no existe información suficiente para formular una guía práctica para dirigir la competencia entre los grupos bacterianos (Lens *et al.*, 1998). Para lograr aumentar la capacidad de sulfato-reducción de un lodo se ha evaluado la disminución gradual de la relación

DQO/SO₄²⁻ hasta alcanzar la relación estequiométrica de 0.67 o inferiores (Celis-García, 2004), la adición de químicos como cloroformo para interrumpir la actividad metanogénica específica (Visser *et al.*, 1993b), la bioaumentación con cepas de bacterias sulfato-reductoras puras (Omil *et al.*, 1997c), la variación del pH (Omil *et al.*, 1996), el cambio de temperatura (Visser *et al.*, 1993c, Weijma *et al.*, 2000a), el tipo de sustrato con el que se alimenta el lodo (Omil *et al.*, 1998 y Visser *et al.*, 1993b) y el tipo de inóculo alimentado al reactor (Lens *et al.*, 1998). El resultado de todas estas estrategias fue que el tiempo requerido para transformar un lodo metanogénico en uno sulfato-reductor no fue menor a 100 días (Espinosa-Chávez, 2007).

Por otro lado, Omil *et al.* (1997d), mencionaron que la adaptación previa de la biomasa a altos niveles de sulfuro favorece a las bacterias metanogénicas en la competencia por el sustrato, retardando el aumento en la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. Lo cual puede ocurrir de la misma manera cuando la relación DQO/SO₄²⁻ es reducida gradualmente. A esto Celis-García (2004), añadió que la mejor estrategia para tener un reactor sulfato-reductor a partir de un lodo metanogénico sería no alimentar el reactor con acetato y trabajar con relaciones cercanas a 0.67 desde el arranque del reactor.

2.9. Tipos de Reactores Empleados para el Proceso de Sulfato-Reducción.

Los reactores se clasifican de acuerdo a la forma en que su biomasa es retenida con base a las propiedades de adhesión de las bacterias (Oude-Elferink *et al.*, 1994). De acuerdo a esto pueden ser divididos en dos grandes grupos: reactores de lecho libre o suspendido y reactores de lecho fijo (Figura 2). En los reactores de lecho fijo la biomasa es retenida formando biopelículas (estructuras complejas de células y polímeros extracelulares) sobre materiales inertes (acarreadores), estáticos o suspendidos. La biomasa también puede ser retenida por aislamiento u obstrucción de partículas biológicas sólidas como lodos suspendidos y granulares en materiales de empacado. (Lettinga *et al.*, 1980). Por el otro lado, los reactores de lecho libre retienen su biomasa con la formación de partículas biológicas de gran densidad y sedimentabilidad llamadas gránulos.

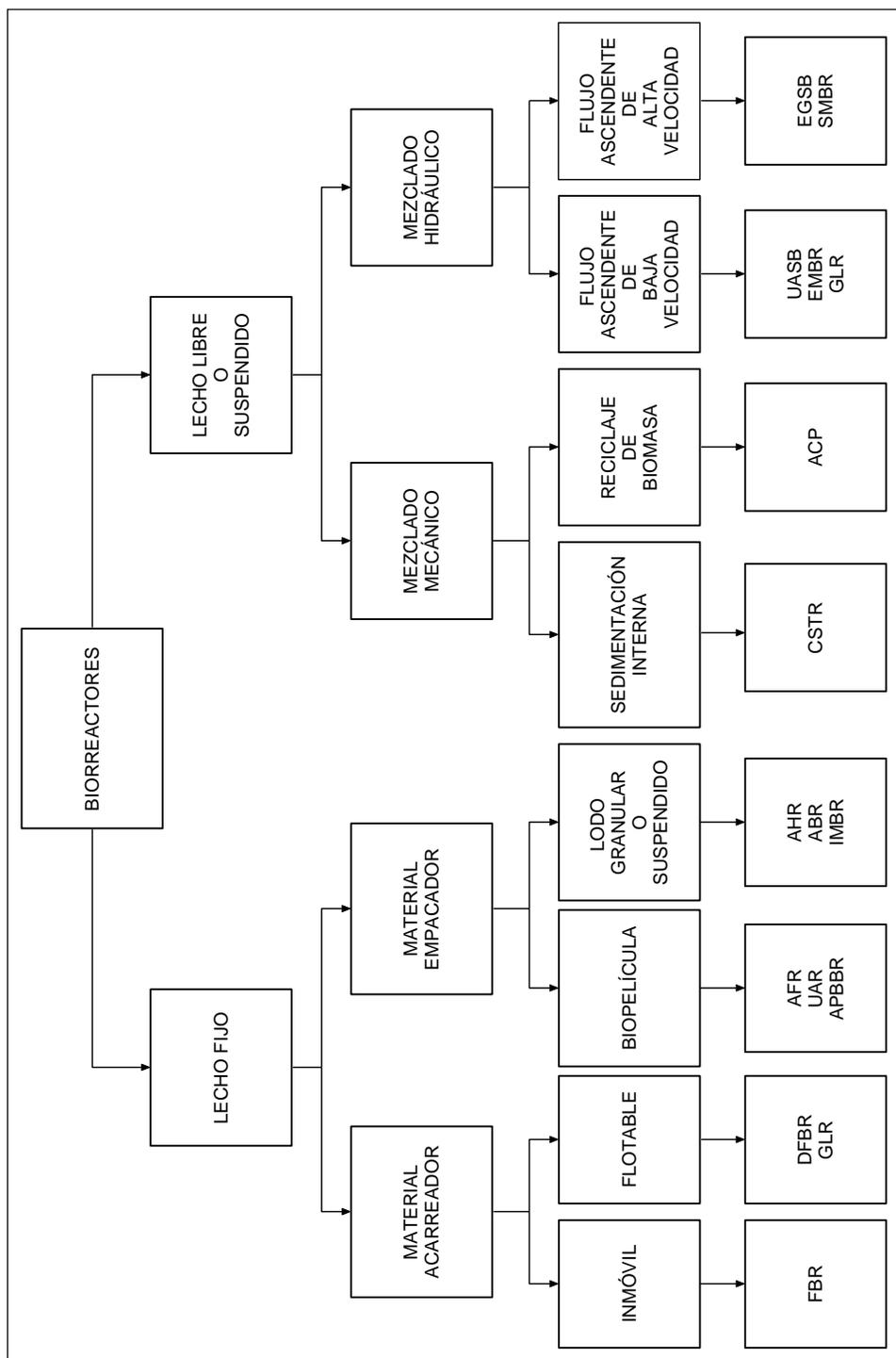


Figura 2. Reactores anaerobios utilizados en aplicaciones de sulfato-reducción.

Modificado de Bijmans, 2008; con material de apoyo de Kaksonen & Puhakka, 2007.

El lodo granular metanogénico y sulfato-reductor consiste de agregados microbianos altamente sedimentables que se desarrollan por las uniones mutualistas de células bacterianas en la ausencia de un material acarreador o de soporte (Lettinga, 1995).

En la literatura, han sido reportados numerosos diseños de reactores aplicados para el proceso de sulfato-reducción en el tratamiento de aguas residuales industriales con altos contenidos de sulfatos y metales pesados. Entre estos reactores sulfato-reductores se encuentran reactores en lote (BR, batch reactors), reactores en lote secuenciales (SBR, sequencing batch reactors), reactores de tanque continuamente agitado (CSTR, continuously stirred tank reactors), reactores de contacto anaerobio (ACP, anaerobic contact processes), reactores anaerobios de placa deflectora (ABR, anaerobic baffled reactors), reactores de filtro anaerobio (AFR, anaerobic filter reactor), reactores de lecho fluidizado (FBR, fluidized-bed reactors), reactores de expansión de gas (GLR, gas lift reactors). También se han utilizado reactores anaerobios híbridos (AHR, anaerobic hybrid reactors), reactores de membrana (MBR, membrane bioreactors), reactores anaerobios de flujo ascendente (UASB, upflow anaerobic sludge blanket reactors) y más recientemente el reactor anaerobio de lodos granulares expandidos (EGSB; Expanded Granular Sludge Bed) (Kaksonen & Puhakka, 2007). En la Tabla 1, se enuncian algunas de las investigaciones recientes a escala laboratorio, en los distintos tipos de reactores y diseños experimentales para el tratamiento de efluentes conteniendo metales, compuestos orgánicos y sulfato.

2.9.1. Biorreactores de Alta Tasa.

La aplicación exitosa de la tecnología de la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales industriales depende críticamente del desarrollo y uso de biorreactores de alta tasa o velocidad. Esto debido a la necesidad de tratar grandes volúmenes de efluentes. Los reactores diseñados óptimamente pueden disminuir su tiempo de tratamiento e incrementar la eficiencia, llevando a una reducción global del costo del tratamiento. La aplicación de reactores de alta tasa ha resaltado el reconocimiento de la digestión anaerobia como una tecnología eficiente y efectiva en costo para la protección ambiental.

Tabla 1. Desempeño de reactores sulfato-reductores en general, para tratamiento de efluentes que contienen metales.

| Referencia | Tipo de Reactor | Fuente de Carbono | Tipo de Efluente | Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | DQO (g/L) | SO ₄ ²⁻ (g/L) | S ²⁻ (mg/L) | Ión Metálico | | Eficiencia de Remoción | | |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|--|--------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|--|--|-----------------|-----------------------------------|
| | | | | | | | | Esp ^d | M ²⁺ (mg/L) | M ²⁺ (%) | DQO (%) | SO ₄ ²⁻ (%) |
| De Lima <i>et al.</i> (2001) | UASB | Aguas Negras | ARS ^a | 1.5 2.2 | 0.12 0.17 | 0.08 0.14 | ≈24 ^c ≈33 ^c | Ni ²⁺ | 15.9 22.4 | 96 97 | 57 34 | 91 71 |
| La <i>et al.</i> (2003) | AFR | Estiércol | DAMa ^b | >0.54 | >0.97 | 1.52 | ≈482 ^c | Fe ²⁺ Al ³⁺ Cu ²⁺ Cd ²⁺ Mn ²⁺ Zn ²⁺ | 56.2 2.66 17.3 28.6 7.50 7.51 | >98 >62 >94 >96 >94 >86 | ND | >95 |
| Kaksonen <i>et al.</i> (2004) | FBR | Etanol | ARS ^a | 0.73 | 1.50 | 2.00 | 370 | Zn ²⁺ Fe ²⁺ | 200 100 | 100 99.9 | 61 | 96 |
| Kaksonen <i>et al.</i> (2006) | FBR | Etanol | ARS ^a | 0.72 | 1.50 | 2.08 | 400 | Zn ²⁺ Fe ²⁺ | 176 87 | 99.9 99.9 | ND | 57 |
| Sierra-Alvarez <i>et al.</i> (2006) | UASB | Etanol | DAMa ^b | 0.43 | 0.90 | 2.10 | ≈283 ^c | Cu ²⁺ Ni ²⁺ Zn ²⁺ | 100 15 15 | 100 99.5 99.6 | 86 | 40 |
| Sahinkaya <i>et al.</i> (2007) | FBR | Etanol | ARS ^a | 0.66 0.67 | 0.66 1.01 | 1.00 1.50 | 50 70 | Fe ²⁺ | 40-60 40-90 | 100 100 | 50 71 | 35 60 |
| Velasco <i>et al.</i> (2007) | UASB | Etanol | ARS ^a | 0.67-2.5 | 1.0-3.7 | 1.5 | 145-470 | Pb ²⁺ | 20- 200 | >99 | AA ^e | 38-94 |

^a agua residual sintética; ^b drenaje ácido de mina artificial; ^c datos calculados teóricamente; ^d especie del ión metálico; ^e acumulación de acetato.

Los reactores de alta tasa deben reunir las siguientes dos condiciones: (a) alta retención de lodos o biomasa viable, bajo condiciones de altas cargas orgánicas; y (b) buen contacto entre la biomasa y el agua residual entrante. Lo anterior resulta en la reducción del tamaño del reactor y en bajos requerimientos de energía del proceso. Los biorreactores de alta tasa incluyen a los reactores de lecho empacado, de lecho fluidizado, y los de lecho libre como el UASB y el EGSB. Estos biorreactores proporcionan una alta velocidad de reacción por unidad de volumen de reactor, lo cual reduce el volumen de reactor y finalmente permite la aplicación de altas velocidades de carga (Parawira, 2004).

2.9.2. Reactor Anaerobio de Lodos Granulares Expandidos.

La generación más reciente de sistemas de tratamiento anaerobios de alta tasa es el reactor de lodos granulares expandidos (EGSB); el cual se ha hecho popular, principalmente debido a su muy alto potencial de carga en comparación con los reactores UASB convencionales (Lettinga, 2001).

El reactor EGSB (modificación del reactor UASB), hace uso de velocidades ascensionales altas (4-10 m/h) y mejora el contacto entre el agua residual y el lodo anaerobio (Lettinga, 1995). Al igual que el UASB, utiliza biomasa anaerobia granular (lodos granulares) y por consiguiente presentan el mismo principio operacional pero difiere en términos de geometría y parámetros del proceso (Zoutberg & Eker, 1999). En el proceso del EGSB el lodo granular es expandido o fluidizado por la alta velocidad ascendente del líquido y el gas producido. En contra parte, el lodo es retenido debido a su alta sedimentabilidad y a la ayuda del sistema de separación gas-sólido-líquido semejante al del reactor UASB.

Las ventajas del sistema EGSB son su espacio reducido y el manejo de velocidades de carga más elevadas en comparación con los sistemas UASB. Las cargas orgánicas pueden alcanzar valores de 20-40 g DQO/Ld, dependiendo del tipo de sistema y el agua residual a ser tratada (Van Lier *et al.*, 2001b). Uno de los problemas más serios asociados con los

digestores expandidos durante la operación continua, es la inestabilidad de los conglomerados granulares. Esto también afecta a los reactores UASB, aunque en mucho menor grado. La pérdida de la biomasa puede ocurrir debido a los siguientes factores: desintegración del gránulo, lavado o arrastre fuera del reactor de gránulos huecos o que contienen gas en su centro, formación de gránulos esponjosos, y arrastre sobre precipitados inorgánicos (Parawira, 2004).

2.9.3. Ventajas del Reactor EGSB en Aplicaciones de Sulfato-Reducción.

El diseño del reactor EGSB es particularmente ventajoso para el tratamiento de aguas residuales con bajas cargas orgánicas (como el DAM y otros efluentes industriales) debido a sus altas velocidades ascensionales, ya que permiten una mejor distribución del agua residual en los intersticios del lodo granular o más particularmente de la fuente de carbono que contienen (Rebac *et al.*, 1998). También es conveniente para procesos en los cuales la inducción de mezclado por gas es baja, como en los procesos sulfidogénicos o sulfato-reductores (Dries *et al.*, 1998). Por otro lado, la alta tasa de dilución del influente producida por la recirculación puede favorecer las siguientes circunstancias en el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfatos: (1) el tratamiento compuestos tóxicos (Seghezzi *et al.*, 1998), como los metales pesados y sustancias ácidas; (2) la reducción de la toxicidad del sulfuro debido al fenómeno de desorción a la fase gaseosa (Pizarro-Torres *et al.*, 2002); (3) la formación de gránulos densos y firmes (Shayegan *et al.* 2005); y (4) Incremento de la segregación y el lavado de partículas suspendidas pequeñas e inactivas (Colussi *et al.*, 2009), como los sulfuros metálicos.

Las características anteriores hacen del EGSB una herramienta útil en el proceso de sulfato-reducción. Sin embargo, Omil y *col.*, (1996) mencionaron que la utilización del reactor EGSB para el tratamiento sulfidogénico de aguas residuales ricas en sulfato no es recomendable, ya que las altas velocidades ascensionales pueden afectar negativamente el desempeño del proceso por pérdida de biomasa y disminución de la eficiencia de remoción de DQO. Además, indicaron que las bacterias sulfato-reductoras tienen menor capacidad de adhesión a superficies que las metanogénicas, por lo que pueden ser

selectivamente lavadas a altas velocidades ascensionales. En este contexto se propuso que la máxima velocidad ascensional para reducir el lavado selectivo de las bacterias sulfato-reductoras acetogénicas en reactores de lodos granulares es de aproximadamente 4.5 m/h.

A pesar de lo anterior, varias investigaciones se han realizado exitosamente aplicando el proceso de sulfato-reducción en reactores EGSB para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de sulfatos como se muestra en la Tabla 2. Sin embargo, en el tratamiento de efluentes con alto contenido de sulfatos, metales, con alta acidez y con bajo contenido de materia orgánica (como el DAM y otros efluentes industriales) sólo se han llevado a cabo dos experimentos; uno a escala piloto y el otro a escala laboratorio.

En el estudio a escala laboratorio Sierra-Alvarez y *col.* (2007) investigaron el uso de un sistema de tratamiento consistente en un biorreactor EGSB sulfidogénico (2.9L) y un reactor de cristalización de lecho fluidizado conteniendo arena de cuarzo fina para facilitar la remoción de cobre y recuperarlo como sulfuro de cobre puro. El funcionamiento del sistema fue probado usando aguas residuales que simulaban efluentes de la industria de manufactura de semiconductores conteniendo cobre y sulfato. El lodo granular fue obtenido de un reactor a escala laboratorio. La remoción completa del metal ocurrió en el cristalizador. Los cristales de cobre depositados sobre los granos de arena fueron identificados como Covelita (CuS). La configuración en dos etapas propuesta en tal trabajo fue ventajosa sobre los sistemas de una etapa debido a que permiten la recuperación de minerales valiables y aseguran la presencia de bajas concentraciones de metales en el efluente, evitando la toxicidad en los microorganismos y reduciendo la contaminación/dilución de la biomasa activa con los sulfuros metálicos. El sistema propuesto también pudo proveer ventajas sobre los reactores sulfidogénicos operados en conjunción con una fase de coagulación/sedimentación, ya que no son requeridos la adición de coagulantes, floculantes o la necesidad de deshidratación del lodo, resultando en el ahorro en mantenimiento y operación del sistema. En la Tabla 3, se mencionan los estudios existentes en reactores EGSB para el tratamiento de efluentes con metales por sulfato-reducción. Incluyendo los datos de este trabajo de tesis.

Tabla 2. Desempeño de reactores de lodos granulares expandidos sulfato-reductores para tratamiento de efluentes que contienen sulfatos.

| Referencia | T (°C) | V ^a (L) | TRH (d) | Fuente de Carbono | Tipo de Efluente | pH | | Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | DQO (g/L) | SO ₄ ²⁻ (g/L) | S ²⁻ (mg/L) | Eficiencia de remoción | |
|-------------------------------------|--------|--------------------|---------|--|------------------|-----------------|-----------------|--|-----------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| | | | | | | IN ^c | EF ^d | | | | | DQO (%) | SO ₄ ²⁻ (%) |
| De Smul <i>et al.</i> (1999) | 33- | 2.3 | 0.14- | Etanol Etilenglicol | ARS ^b | 7.7-8.3 | 7.0-2.6 | ND ^e | ND ^e | ND ^e | ≈437-500 ^f | 70-75 | 80-90 |
| | 55 | | 0.17 | | | | | | | | | | |
| Weijma <i>et al.</i> (2000b) | 65 | 4.0 | 0.12- | Metanol | ARS ^b | 7.5 | 1.32-1.35 | 2.3-3.7 | 1.7-2.8 | 41-2250 | 73-91 | 22-72 | |
| | | | 0.42 | | | | | | | | | | |
| Briones-Méndez <i>et al.</i> (2002) | 35 | 2.2 | 1.56 | Almidones Colorantes AZO | Real Textil | 9.0 | 28-6.7 | 2.0 | 0.07-0.3 | ND ^e | 63-77 | 77 | |
| | | | 1.56 | | | | | | | | | | |
| O'Reilly & Collieran (2006) | 37 | 5.0 | 2.0 | Glucosa Etanol Acetato Butirato Propionato | ARS ^b | ND ^e | 16-2 | 12.0 | 0.75-6.0 | ND ^e | ND ^e | ND ^e | ND ^e |
| | | | 2.0 | | | | | | | | | | |
| Valdés <i>et al.</i> (2006) | 25 | 4.5 | ND | Vino diluido | ARS ^b | 6.5-7.5 | 28-4.7 | 4.2 | 0.15-0.9 | ND ^e | ND ^e | 80-90 | 85-95 |
| | | | ND | | | | | | | | | | |

^avolumen del reactor; ^b agua residual sintética; ^cinfluyente; ^defluente; ^edatos no disponibles; ^fdato calculado teóricamente.

Tabla 3. Desempeño de reactores de lodos granulares expandidos sulfato-reductores para tratamiento de efluentes que contienen metales.

| Referencia | V ^a (L) | TRH (d) | Fuente de DQO | Tipo de EF | pH | | Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | DQO (g/L) | SO ₄ ²⁻ (g/L) | S ²⁻ (mg/L) | Ión Metálico | | Eficiencia | | |
|-------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------------------------|------------------|--|-----------------|--|--------------|-------------------------------------|------------------------|--|----------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| | | | | | IN ^e | EF ^f | | | | | Esp ^j | CM (mg/L) | M (%) | DQO (%) | SO ₄ ²⁻ (%) |
| Picavet <i>et al.</i> (2003) | 7000 EP ^b | 0.29 | Etanol | Real | 8.0 | 8.0 | ≥0.35 | ≥0.29 | 0.84 | ≈147 ⁱ | Cu ²⁺ Sn ²⁺ Pb ²⁺ Ni ²⁺ Zn ²⁺ | 90 11 15 2 1.5 | >99 >91 >95 >90 >60 | ND ^j | 48 |
| Sierra-Alvarez <i>et al.</i> (2007) | 2.9 | 0.35 | Etanol | MM ^c | 7.6- 8.1 | 7.4- 8.0 | 0.60 | 2.97 | 4.98 | 1164 | NA ^k | NA ^k | 95 | 70 | |
| Este estudio | 3.4 | 1.0 | Ác. Cítrico Isopropanol PEG | ARS ^d | 7.6- 8.1 | 7.4- 7.8 | 0.60 | 3.01 | 4.98 | 686- 835 | Cu ²⁺ | 4- 66 | 99- 99.8 | 63- 69 | 41-50 |
| | | | Glucosa Acetato Etanol | MM ^c | 6.0- 6.7 | 7.2- 7.5 | 5.12- 0.67 | 0.74- 1.0 | 0.144 -1.50 | 8-121 | NA ^k | NA ^k | 56- 91 | 20-78 | |
| | | | Etanol | ARS ^d | 6.7- 7.0 ^g 4.4- 4.5 ^h | 7.7- 7.9 | 0.67- 1.33 | 1.0- 2.0 | 1.50 | 383- 472 | Cu ²⁺ | 50- 300 | 94- 100 | 86- 95 | 61-97 |

^avolumen del reactor; ^bescala piloto; ^cMedio mineral; ^dAgua residual sintética; ^einfluyente; ^fefluente; ^gpH del medio mineral; ^hpH del agua residual sintética; ⁱdato calculado teóricamente; ^jespecie del ión metálico; ^kno aplicado; ^ldato no disponible.

CAPÍTULO 3:

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. Lodo Granular Anaerobio.

La biomasa, constituida por un consorcio bacteriano se obtuvo de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera Corona; ubicada en Cd. Obregón Sonora. Las características físicas del lodo fueron: ST (60.57 g/L), SSV (30.95 g/L), SF (29.6 g/L), VS (12.93 mL Lodo/s), IVL (43 mL Lodo/g SSV). Con tamaños de gránulos en el intervalo de 0.125 a 0.850 mm de diámetro (Duarte-Rodríguez, 2009).

3.1.2. Medio de Cultivo para Digestión Anaerobia.

El medio de cultivo está constituido en base al medio mineral propuesto por Visser, (1995), ver *anexo A*. Se utilizaron como fuentes de carbono la combinación de Dextrosa/Acetato de Sodio y Etanol en diferentes etapas.

3.1.3. Aguas Residuales Sintéticas.

El agua residual sintética simuló el agua superficial de las zonas más contaminadas del Río San Pedro en Cananea, Sonora, México; según Gómez-Álvarez y *col.* (2004). Se prepararon dos soluciones simuladas: una con pH 6.0 en base al medio mineral de Visser, conteniendo etanol (1 g DQO/L) como fuente de carbono, sulfato de sodio como fuente de sulfato ($1.5 \text{ g SO}_4^{2-}/\text{L}$) y sulfato de cobre como fuente de cobre ($50 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$); la otra con pH de 4.0 a 4.5, conteniendo solamente el ión cúprico en un rango de 50-300 mg Cu^{2+}/L . El cálculo del equivalente teórico de la DQO para el etanol detalla en el *anexo B*.

3.1.4. Reactores en Continuo.

3.1.4.1. Reactor de Lodos Anaerobios de Flujo Ascendente (UASB).

El reactor UASB fue un cilindro de vidrio de 0.8L, con 0.25m de altura y un diámetro interno de columna de 7.2cm (Figura 3); inoculado con 340mL de lodo anaerobio metanogénico. Las condiciones de operación fueron: un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de $0.553d \pm 0.04$, un flujo de alimentación (F) de $1.468 \text{ L/d} \pm 0.10$. La temperatura se mantuvo a $28^\circ\text{C} \pm 2$. No se reguló el pH dentro del reactor.

3.1.4.2. Reactor Anaerobio de Lodos Granulares Expandidos (EGSB).

El reactor EGSB fue un cilindro de vidrio de 3.4L, 1.2m de altura y diámetro interno de columna de 4.6cm (Figura 4). Fue inoculado con el lodo anaerobio contenido en el UASB y 100mL adicionales (440mL). La operación durante la segunda y tercera etapa se ajustó con un TRH de 1d, velocidades ascensionales (v^a) de 4 a 10 m/h, flujo de recirculación (F_R) de 174 a 434 L/d (tasas de recirculación (T_R) de 51 a 128) y una F de 3.4 L/d. La temperatura se mantuvo a $35^\circ\text{C} \pm 2$. No se controló el pH dentro del reactor. El biogás se colectó en una columna de vidrio invertida, llena de solución salina saturada. Adicionalmente, durante la tercera etapa de operación se utilizó un sedimentador de vidrio de 0.77L, 0.20m de altura y 6.6cm de diámetro interno (Figura 4-11).

3.2. Desarrollo Experimental.

El experimento completo se desarrolló en dos etapas, una en lote y otra en continuo.

3.2.1. Estudio en Lote.

La etapa experimental en lote duró 127d, comprendiendo desde el proceso de adaptación del lodo anaerobio, hasta las pruebas de inhibición o toxicidad al cobre.

3.2.1.1. Adaptación del Lodo en Condiciones Sulfato-Reductoras.

El lodo anaerobio (400mL) fue adaptado a condiciones sulfato-reductoras durante 120d, en un matraz Erlenmeyer de 1L cubierto con un tapón horadado para purgar los gases.

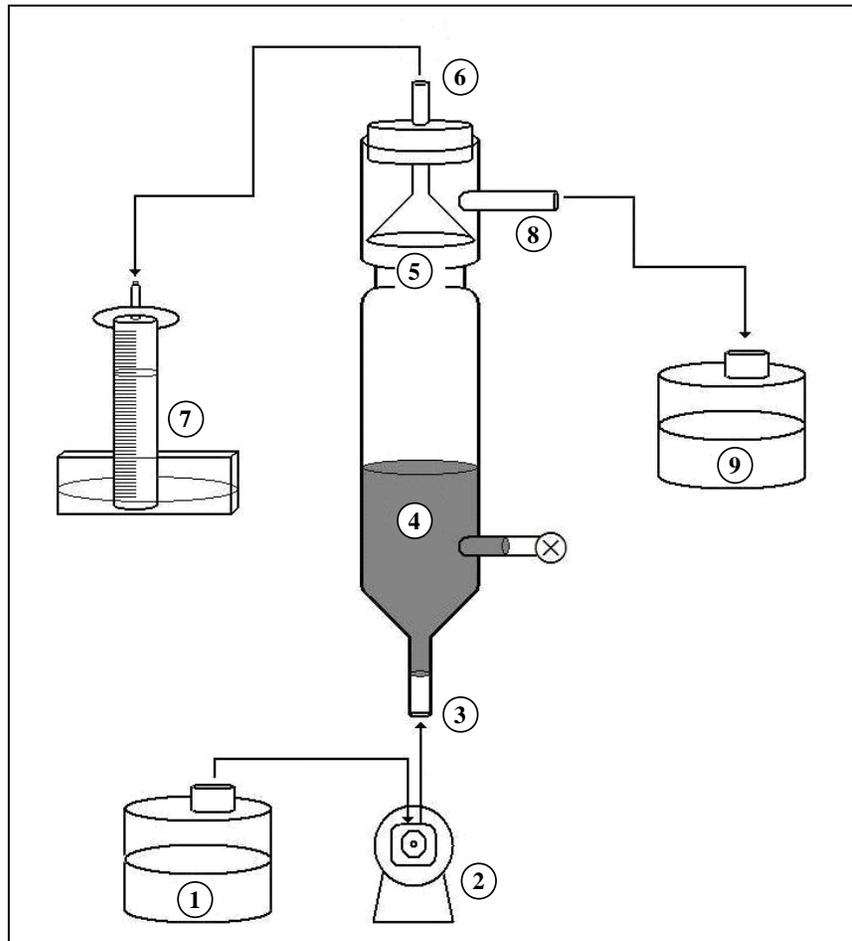


Figura 3. Reactor UASB.

1) Influyente de medio mineral, 2) Bomba peristáltica, 3) Entrada de influente, 4) Lodo granular anaerobio, 5) Separador gas/líquido/sólido, 6) Salida de biogás, 7) Sistema colector y medidor de biogás, 8) Salida de efluente, 9) Receptor de efluente.

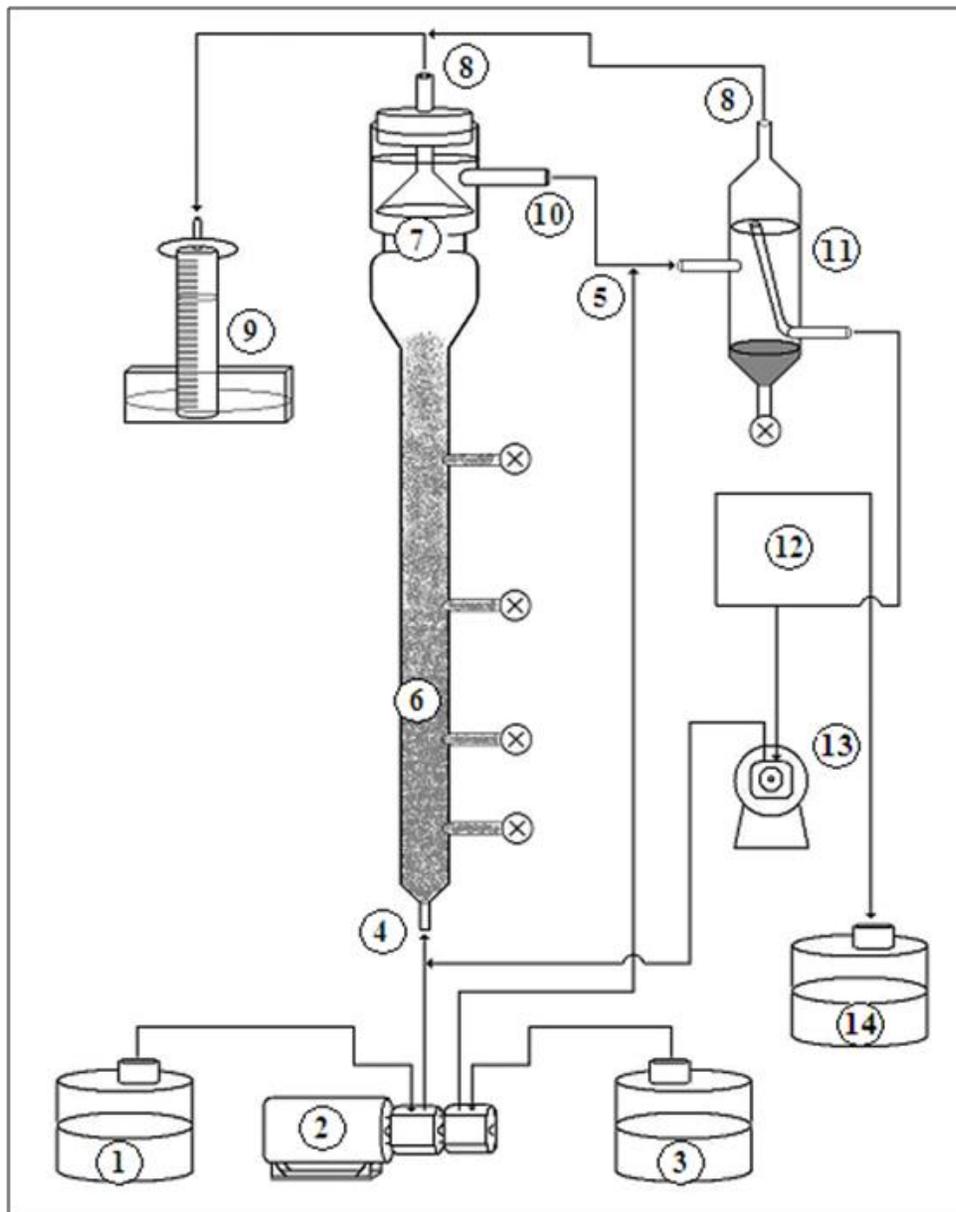


Figura 4. Reactor EGSB.

1) Influyente I (Medio Mineral), 2) Bomba con doble alimentación, 3) Influyente II (Solución de Cobre), 4) Entrada influente I y recirculación, 5) Entrada influente II, 6) Lodo granular expandido, 7) Separador gas/líquido/sólido, 8) Salidas de biogás, 9) Sistema colector y medidor de biogás, 10) Salida de efluente, 11) Sedimentador, 12) Bucle de recirculación, 13) Bomba de recirculación, 14) Receptor de efluente.

La incubación se llevó a cabo en un equipo Water Bath Shaker C76 a una temperatura de 35°C y una velocidad de rotación de 80rpm. El lodo fue alimentado semanalmente con 500mL de medio mineral elaborado con una solución de elementos traza sin cobre, con etanol como fuente de carbono en una relación DQO/SO₄²⁻ de 0.67 ((2 g DQO/3 g SO₄²⁻)/L). Se monitoreó diariamente la relación de alcalinidades y las concentraciones de DQO y SO₄²⁻.

3.2.1.2. Ensayo de Inhibición con Cobre.

En el ensayo (duración de 7d), las botellas serológicas fueron inoculadas con 0.3095g SSV (10mL de lodo granular) y 140mL de medio mineral para una concentración de 2.06 g SSV/L en 150mL. Las concentraciones de etanol y sulfato se mantuvieron en 2 g DQO/L y 3 g SO₄²⁻/L respectivamente, para una relación de 0.67. Las concentraciones de cobre utilizadas fueron de 0, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 1000 y 1500 mg Cu²⁺/L. El pH se ajustó a 6. La temperatura de incubación fue de 35°C. Se monitorearon diariamente las concentraciones de DQO, SO₄²⁻ y Cu²⁺, tomando muestras cada 24h. Las botellas se mantuvieron cerradas y el biogás fue purgado a diario. Como control se utilizaron botellas con la misma cantidad de lodo y medio, pero sin fuente de carbono y sulfato.

3.2.2. Estudio en Continuo.

El estudio en continuo de sulfato-reducción tuvo una duración de 272d y estuvo constituido de 3 etapas llamadas: Etapa de Arranque (I), Etapa de Adaptación (II) y Etapa de Bioprecipitación (III). Durante el experimento se utilizaron los dos reactores anaerobios de lodos granulares que fueron descritos anteriormente. Se monitorearon diariamente el pH, la relación de alcalinidades y las concentraciones de DQO, SO₄²⁻ y H₂S. Adicionalmente, se examinó la concentración de cobre en la última etapa. En la Tabla 4, se resume el estudio en continuo completo.

Tabla 4. Condiciones operacionales de las etapas del estudio en continuo.

| Etapa | Sub-Etapa | Periodo (d) | Duración (d) | TRH ^b (d) | Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | DQO (gDQO/L) | VCO ^c (gDQO/Ld) | SO ₄ ²⁻ (gSO ₄ ²⁻ /L) | VCS ^d (gSO ₄ ²⁻ /Ld) |
|-------|-----------|-----------------------------------|--------------|----------------------|--|--------------|----------------------------|---|---|
| I | Ia | 1-22 | 22 | 0.5 | 10.24 | 0.74 | 1.47 | 0.072 | 0.144 |
| | Ib | 23-95 | 73 | | 5.12-I | | | | |
| II | IIa | 1-7 (96-102) ^a | 7 | 1.0 | 5.12-II | 0.74 | 0.74 | 0.144 | 0.144 |
| | IIb | 8-29 (103-124) ^a | 22 | | 2.56 | | | | |
| | IIc | 30-38 (125-133) ^a | 9 | | 1.28-I | | | | |
| | IIId | 39-71 (134-166) ^a | 33 | | 1.28-II | | | | |
| | IIe | 72-106 (167-201) ^a | 35 | | 0.67-I | | | | |
| III | IIIa | 107-157 (202-252) ^a | 51 | 1.0 | 0.67-II | 1.0 | 1.0 | 0.780 | 1.500 |
| | IIIb | 158-177 (253-272) ^a | 20 | | 1.33 | | | | |

^aperiodo del experimento completo; ^btiempo de retención hidráulico; ^cvelocidad de carga orgánica; ^dvelocidad de carga de sulfato.

3.2.2.1. Etapa de Arranque.

El arranque de un reactor es una etapa crítica. Arrancar implica el seguimiento del desarrollo del sistema, no únicamente en lo relacionado con la remoción de materia orgánica, sino en su paso hacia la estabilización. En sistemas anaerobios la población bacteriana es altamente sensible a cambios generados en el medio ambiente que los rodea, ya que no está adaptada al nuevo sustrato (Rojas-CH, 1987).

La duración de esta etapa fue de 95d y se llevó a cabo en el Reactor UASB inoculado con 340mL de lodo anaerobio metanogénico. La alimentación inicial del reactor fue ajustada con velocidades de carga orgánica (VCO) de 1.474 g DQO/Ld y de sulfato (VCS) de 0.144 g SO_4^{2-} /Ld. El medio mineral incluyó dextrosa y acetato de sodio, como fuentes de carbono y sulfato de sodio (Na_2SO_4), como fuente de sulfato. Hasta el día 22, la relación DQO/ SO_4^{2-} fue de 10.24 ((0.737 g DQO/0.072 g SO_4^{2-})/L). A partir del día 23, la relación fue modificada a 5.12 ((0.737 g DQO/0.144 g SO_4^{2-})/L). El día 57 se sustituyó la mitad de la DQO proveniente de dextrosa y acetato por etanol. El día 80, la fuente de carbono fue sustituida totalmente por etanol, manteniendo la misma relación DQO/ SO_4^{2-} . El día 95 se cambió de reactor, finalizando la etapa.

3.2.2.2. Etapa de Adaptación.

La adaptación es una etapa lenta que debe realizarse con cuidado. En el medio acuoso ocurre una selección de microorganismos necesarios para el metabolismo del sustrato en sus diferentes fases (Rojas-CH, 1987).

La etapa de adaptación bajo condiciones sulfato-reductoras (duración de 106d), se inició con la inoculación del reactor EGSB con el lodo anaerobio contenido en el reactor UASB y 100mL adicionales de lodo inactivo. La alimentación inicial del reactor se mantuvo durante 7 días con las características finales de la etapa anterior, una relación de 5.12 ((0.737 g DQO/0.144 g SO_4^{2-})/L), con una VCO de 0.737 g DQO/Ld y una VCS de 0.144 g SO_4^{2-} /Ld. A partir del día 8, la relación fue modificada a 2.56 ((0.737 g DQO/0.288 g SO_4^{2-})/L). El día 30 la relación se disminuyó a 1.28-I

((0.737 g DQO/0.576 g SO_4^{2-})/L). 9 días después (día 39) se modificaron al mismo tiempo las concentraciones de DQO y SO_4^{2-} manteniendo la relación de 1.28-II ((1 g DQO/0.78 g SO_4^{2-})/L). Por último, el día 72 de actividad se colocó la relación en 0.67 ((1 g DQO/1.5 g SO_4^{2-})/L). Relación a la cual teóricamente se puede alcanzar el 100% de eliminación de sulfato, si toda la DQO adicionada es utilizada por las bacterias sulfato-reductoras (Celis-García, 2004). La etapa terminó el día 106 de actividad en el reactor EGSB ó 202 del estudio en continuo.

3.2.2.3. Etapa de Bioprecipitación.

En la etapa de bioprecipitación se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con los metales pesados (Orellana-Jaramillo, 2009). En este caso, las bacterias sulfato-reductoras fueron utilizadas para formar sulfuros a partir de la reducción de sulfatos. Tales sulfuros fueron precipitados con el cobre adicionado al medio y separados del torrente acuoso por medio de un sedimentador.

La duración de la etapa fue de 71d. Se inició después de la estabilización de la actividad sulfato-reductora en el reactor EGSB con la relación DQO/ SO_4^{2-} de 0.67. Se adicionó cobre (Cu^{2+}) al medio mineral (día 107), utilizando como fuente sulfato de cobre (CuSO_4). El pH se mantuvo en 6.0. La relación se conservó en 0.67 ((1 g DQO/1.5 g SO_4^{2-})/L). El medio mineral fue alimentado directamente en la entrada del reactor hasta el día 124, con una concentración inicial de 50 mg Cu^{2+} /L. A partir del día 125, el influente de 4L se separó en dos de 2L. Los componentes de ambos fueron preparados doblemente concentrados para alimentarlos al mismo tiempo dentro del reactor, diluyéndose así a la mitad. Los influentes fueron llamados uno y dos. El influente uno fue el medio mineral con un pH de 7, con concentraciones de etanol y sulfato de (4 g DQO/6 g SO_4^{2-})/L. Éste fue alimentado directamente en la entrada del reactor. Las concentraciones finales de los componentes, luego de la dilución, continuaron siendo de (1 g DQO/1.5 g SO_4^{2-})/L, para una relación de 0.67. El resto de la etapa de bioprecipitación, la concentración de sulfato permaneció constante. No obstante, la VCO fue modificada por última vez el día 158 a 2 g DQO/Ld, dando una relación de 1.33 ((2 g DQO/1.5 g SO_4^{2-})/L).

Por otra parte, el influente dos se conformó únicamente de solución de cobre; primeramente con un pH de 4.5 (días 125 al 175) y después con uno de 4.0 durante 2 días. La alimentación se realizó directamente en la recirculación del reactor. La concentración de cobre se preparó al doble (100 mg Cu²⁺/L), para dar una concentración final de 50 mg Cu²⁺/L. En adelante, las concentraciones de ión metálico se incrementaron gradualmente en porciones de 50 mg Cu²⁺/L, hasta 300 mg Cu²⁺/L. A partir del día 156 se colocó un sedimentador en la salida de efluente del reactor EGSB, pasando a formar parte de la recirculación del efluente. En este punto, este influente fue introducido directamente en la entrada al sedimentador. La reacción entre el H₂S y el Cu²⁺ fue instantánea y la precipitación se llevó a cabo dentro del sedimentador. El experimento culminó el día 177 de funcionamiento del reactor EGSB ó 272 del estudio en continuo.

3.3. Métodos Analíticos.

3.3.1. Medición del pH.

El pH se midió diariamente en influente y efluente, utilizando un potenciómetro Accumet Excel XL94001428 (*Fischer Scientific*) con un electrodo *Cole Parmer*. Para la calibración del equipo, se utilizaron soluciones reguladoras de pH.

3.3.2. Relación de Alcalinidades.

La relación de alcalinidad (α) es un método que estima la capacidad de amortiguación del pH del sistema a través de la medida indirecta de ácidos grasos volátiles y bicarbonato. La relación debe mantenerse entre 0.6 y 0.9 indicando una alcalinización eficiente (Jenkins *et al.*, 1983). Para la preparación de reactivos, normalización y el procedimiento de determinación *ver anexo C*.

3.3.3. Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Se determinó mediante la técnica de digestión en reflujo cerrado (Standard Methods, 1999). El método consiste en la digestión de la muestra con una mezcla crómica seguido de calentamiento a 150°C durante 2h. Cuando la muestra es digerida, el ión dicromato

oxida la materia orgánica presente, lo cual resulta en el cambio de estado del cromo de Cr^{6+} a Cr^{3+} . El ión crómico formado absorbe fuertemente a una longitud de onda de 620_{nm} . Para la preparación de reactivos y el estándar de DQO, la determinación y la curva estándar de DQO *ver Anexo D*.

3.3.4. Determinación de Sulfatos (SO_4^{2-}).

El ión sulfato (SO_4^{2-}), en un medio electrolítico-ácido, reacciona con cloruro de bario (BaCl_2) para formar sulfato de bario insoluble (BaSO_4). La absorbancia de la suspensión de BaSO_4 se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420_{nm} y la concentración de SO_4^{2-} se determina por relación de las lecturas con una curva estándar (Kolmert *et al.*, 2000). Para la preparación de reactivos, la determinación y la preparación de la curva estándar *ver anexo E*.

3.3.5. Determinación de Sulfuro (S^{2-}).

El ión sulfuro fue determinado por el método espectrofotométrico de Cord-Ruwisch, 1985. El método consiste en la precipitación coloidal del sulfuro en forma de sulfuro de cobre (CuS) en un medio ácido. La absorbancia de la suspensión de CuS se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 480_{nm} y la concentración de sulfuro se determina por relación de las lecturas con una curva estándar. El estándar para la curva de calibración se normalizó por el método yodimétrico de Day & Underwood, 1989. La curva estándar se realizó en un intervalo de 0 a $1000 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$. *Ver Anexos F y G*.

3.3.6. Determinación de Cobre (Cu^{2+}).

Las concentraciones de cobre se determinaron por espectrometría de absorción atómica (EAA), por el método de flama directa de aire-acetileno (Standard Methods, 1999). El equipo utilizado fue un espectrómetro de absorción atómica de doble haz Perkin Elmer, modelo 3100, con un sistema de flujo laminar-nebulizador y una flama de aire-acetileno. El instrumento se calibró usando un blanco de reactivos y las soluciones de referencia con concentraciones en el intervalo de 0.1 a $1.0 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$. *Ver anexo H*.

3.3.7. Determinación de Biogás.

El biogás producido en el reactor se midió por desplazamiento utilizando un medidor constituido de un cilindro de vidrio graduado (figuras 3-7 y 4-8), con una sección adelgazada en un extremo. El volumen del cilindro fue de 453.3mL, con medidas de 4.5cm de diámetro interno, 4.8cm de diámetro externo y 28.5cm de altura.

3.4. Cálculos.

3.4.1. Eficiencia de Remoción de DQO.

$$\% \text{ remoción de DQO} = [(DQO_{in} - DQO_{ef}) / (DQO_{in})] \times 100 \quad [8]$$

3.4.2. Eficiencia de Reducción o Conversión de Sulfatos.

$$\% \text{ conversión de sulfato} = [(SO_4^{2-}_{in} - SO_4^{2-}_{ef}) / (SO_4^{2-}_{in})] \times 100 \quad [9]$$

3.4.3. Eficiencia de Remoción de Cobre.

$$\% \text{ remoción de cobre} = [(Cu^{2+}_{in} - Cu^{2+}_{ef}) / (Cu^{2+}_{in})] \times 100 \quad [10]$$

3.4.4. Estimación de la Remoción de DQO.

La DQO removida correspondiente para los procesos de metanogénesis y sulfato-reducción se calculó en base a las siguientes fórmulas (McMahon, 2007).

DQO Removida por Metanogénesis:

$$DQO_{CH_4} = (DQO_{Removida \text{ Total}} - DQO_{SO_4^{2-}}) \quad [11]$$

DQO Removida por Sulfato-Reducción:

$$DQO_{SO_4^{2-}} = (0.67)(SO_4^{2-}_{In} - SO_4^{2-}_{Ef}) \quad [12]$$

3.4.5. Actividades Metanogénica y Sulfato-Reductora.

$$AME = [(m_{CH_4})(fct)/(SSV)](V_B) \quad [13]$$

AME = Actividad Metanogénica Específica (g DQO_{CH₄}/(g SSV)(d))

m_{CH_4} = Pendiente de la DQO consumida por metanogénesis (g DQO_{CH₄}/(L)(h))

$$ASR = [(m_{SO_4^{2-}})(fct)/(SSV)](V_B) \quad [14]$$

ASR = Actividad Sulfato-Reductora (g DQO_{SO₄²⁻}/(g SSV)(d))

$m_{SO_4^{2-}}$ = Pendiente de la DQO consumida por sulfato-reducción (g DQO_{SO₄²⁻}/(L)(h))

V_B = Volumen de líquido en el reactor en lote (L)

SSV = Masa de sólidos suspendidos volátiles (g SSV)

fct = Factor de conversión de tiempo (24h/1d)

3.4.6. Parámetros Operacionales de los Reactores

Tiempo de Residencia hidráulica (TRH), dada en días (d):

$$TRH = (V_R/F) \quad [15]$$

V_R = Volumen del reactor (L)

F = Flujo de alimentación (L/d)

Tasa de Dilución (T_D), dada en (d^{-1}):

$$T_D = (F/V_R) = (1/TRH) \quad [16]$$

Tasa de Recirculación T_R , es adimensional:

$$T_R = (F_R/F) \quad [17]$$

F_R = Flujo de recirculación (L/d)

Velocidad de Carga Orgánica (VCO), dada en (g DQO/Ld):

$$VCO = (DQO_{in}/TRH) \quad [18]$$

DQO_{in} = Concentración de DQO en el influente (g/L)

Velocidad de Carga de Sulfato (VCS), dada en (g SO_4^{2-} /Ld):

$$VCS = (SO_{4in}/TRH) \quad [19]$$

SO_{4in} = Concentración de SO_4^{2-} en el influente (g/L)

Velocidad de Carga de Metal (VCM), dada en (g M^{2+} /Ld):

$$VCM = (M_{in}^{2+}/TRH) \quad [20]$$

M_{in}^{2+} = Concentración del ión metálico en el influente (g/L)

Velocidad ascensional (v^a), dada en (m/h):

$$v^a = (F + F_R)/(A_R) \quad [21]$$

F y F_R dadas en (m^3/h)

Área seccional de la columna del reactor (A_R), dada en (m^2):

$$A_R = \pi r^2 \quad [22]$$

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

4.2. Estudio en Lote.

En este estudio como inóculo inicial se utilizó lodo granular adaptado a condiciones sulfato-reductoras para evaluar la concentración del ión cobre sobre las actividades metanogénicas y sulfato-reductoras.

4.2.1. Ensayo de Inhibición con Cobre.

La inhibición por iones metálicos puede describirse mediante la CI_{50} ; concentración de un componente tóxico presente en un agua residual dada, que causa el descenso del 50% de la actividad bacteriológica. En este caso las Actividades Sulfato-Reductora (ASR) y Metanogénica (AM). El valor se calcula graficando la actividad porcentual contra la concentración del metal a evaluar. Se hace una regresión lineal para el 50% de la actividad o se realiza la intersección de los puntos desde el valor de 50% de actividad en el eje Y hasta el punto de contacto con en el eje X (Omil *et al.*, 2003). En la Figura 5, se muestran las actividades porcentuales correspondientes a la ASR y la AME en presencia de cobre (II). Las concentraciones del metal se manejaron entre 0 a 1500 mg Cu^{2+} /L. Mientras la relación DQO/SO_4^{2-} se fijó en 0.67. Se encontró que el ión metálico fue más tóxico para las bacterias sulfato-reductoras, ya que la CI_{50} de la ASR fue de 115.2 mg Cu^{2+} /L, mientras en las metanogénicas fue de 575.3 mg Cu^{2+} /L. Con lo anterior puede corroborarse que los metales pesados son agentes inhibitorios de los microorganismos anaerobios incluyendo los sulfato-reductores, como fue mencionado por los trabajos de Karri *et al.*, (2006) y Utgikar *et al.*, (2004). Además, se puede asumir que las concentraciones de cobre tolerables para el lodo granular anaerobio son menores a 600 mg Cu^{2+} /L. Lo cual puede ser tomado como referencia para el estudio en continuo.

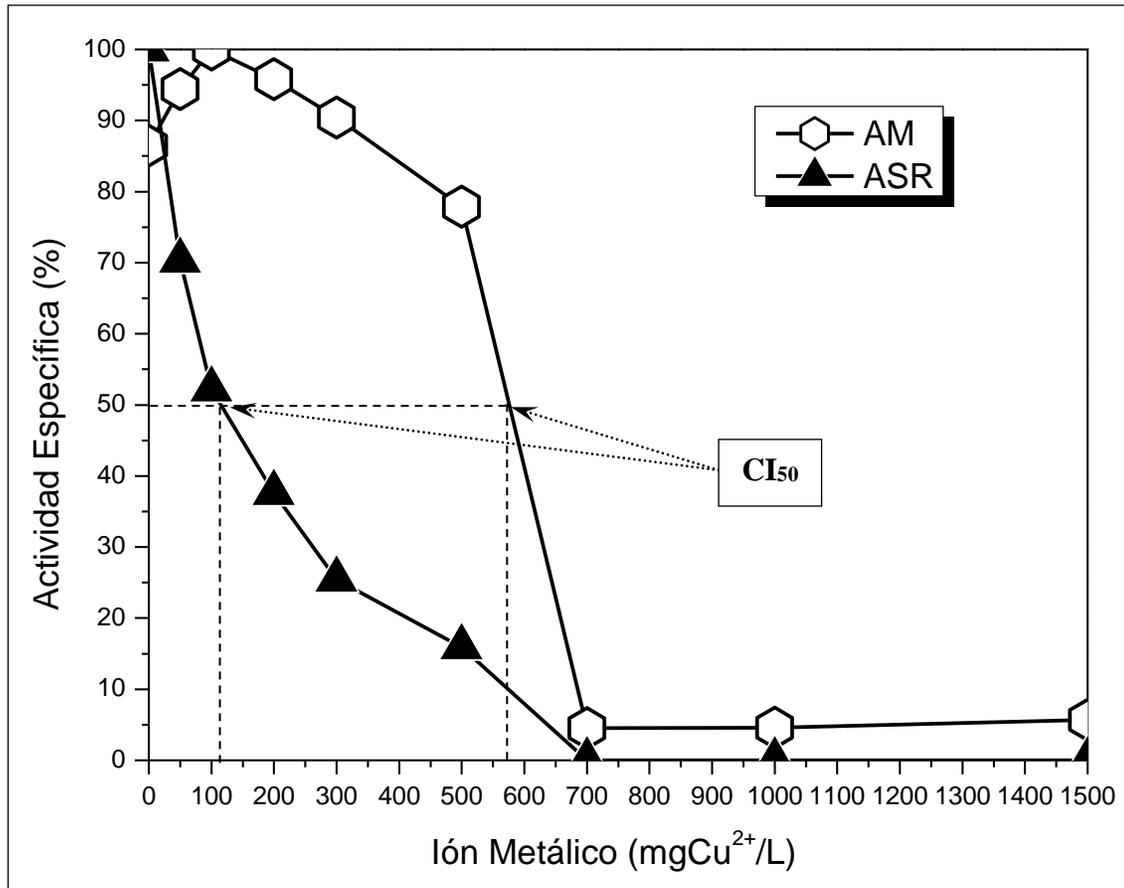


Figura 5. Cinética de inhibición por cobre.

CI₅₀= Punto de inhibición del 50% de la actividad biológica, ASR= Actividad Sulfato-Reductora, AM= Actividad Metanogénica. Actividad específica = Calculada en base a la máxima actividad obtenida para ambos tipos de bacterias.

4.3. Estudio en Continuo.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en las tres etapas del estudio en continuo. La etapa de arranque (primera etapa (I)) se llevó a cabo en el reactor UASB con el fin de activar la biomasa, en donde se utilizaron diferentes fuentes de carbono y bajas concentraciones de sulfato. Las siguientes dos etapas se realizaron en el reactor EGSB. En la etapa de adaptación a condiciones Sulfato-Reductoras (segunda etapa (II)), la DQO permaneció constante, mientras que el sulfato se incrementó con el fin de disminuir la relación DQO/SO_4^{2-} . La etapa de bioprecipitación se inicio una vez adaptado el lodo a condiciones sulfato-reductoras (tercera etapa (III)). Los resultados de la primera etapa se describen aparte, mientras que las dos etapas en el reactor EGSB se detallan juntas.

4.3.1. Desempeño del Reactor UASB.

Durante la etapa de arranque (duración de 95 días), se alcanzaron las condiciones estables con una alta remoción de DQO y buena producción de biogás. En la Tabla 5, se resume el comportamiento del reactor al final de esta etapa. El sistema logró un adecuado amortiguamiento del pH con la producción de bicarbonato suficiente para neutralizar los AGV generados, reflejándose en valores de pH cercanos al neutro.

4.3.2. Desempeño del Reactor EGSB.

4.3.2.1. Remoción de DQO.

En la etapa de adaptación a condiciones sulfato-reductoras (días 1 al 106), la relación DQO/SO_4^{2-} fue disminuida en tres pasos desde 5.12 a la estequiometria de 0.67. Para tal efecto la concentración de DQO del influente se mantuvo en el rango de 0.72 a 1.3 g DQO/L (con velocidades de carga orgánica (VCO) entre 0.68 a 1.39 g DQO/Ld), mientras que la concentración de sulfato se aumentó de 0.16 a 1.58 g SO_4^{2-} /L. Durante esta etapa se observó que el cambio de condiciones metanogénicas a sulfato-reductoras no afectó la remoción de la materia orgánica.

| Tabla 5. Resumen del comportamiento del reactor de lodos anaerobios de flujo ascendente, al final de la etapa de activación de la biomasa. | |
|---|---|
| Parámetro | Valores |
| DQO Entrada | 0.82 g DQO/L |
| DQO Salida | 0.58 g DQO/L |
| Velocidad de carga orgánica (VCO) | 1.53 g DQO/Ld |
| Eficiencia de Consumo de la DQO | 95.4 % |
| pH Entrada | 6.02 ±0.10 |
| pH Salida | 6.92 ±0.23 |
| Relación de Alcalinidades (α) | 0.96 |
| Biogás | 0.487 L/Ld |
| Sulfato de Entrada | 0.23 g SO ₄ ²⁻ /L |
| Sulfato de Salida | 0.2 g SO ₄ ²⁻ /L |
| Velocidad de Carga de Sulfato (VCS) | 0.435 g SO ₄ ²⁻ /Ld |
| Eficiencia de Reducción de Sulfato | 96.8 % |
| Sulfuro Total | 133.2 mg S ²⁻ /L |

La actividad bacteriana removió entre 0.63 a 1.11 g DQO/L (Figura 6 etapa II), manteniendo eficiencias de remoción superiores al 89% (Figura 7, etapa II). En el cambio a la relación de 0.67 (día 72) puede notarse que el proceso experimentó una falla llevando a la disminución de la remoción de la DQO. Éste problema fue generado por un periodo prolongado de inactividad del reactor. La recuperación de la actividad microbiológica se consiguió 18 días después de la reactivación (día 90), alcanzando una remoción del 81.3%.

Una vez conseguidas las condiciones sulfato-reductoras se procedió a la etapa de bioprecipitación (días 107-177), en donde la concentración de sulfato se mantuvo entre 1.2 a 1.6 g SO_4^{2-} /L y la materia orgánica se varió entre 0.88 a 1.96 g DQO/L (VCO entre 0.86 a 2.07 g DQO/Ld). Las relaciones DQO/ SO_4^{2-} utilizadas fueron de 0.67 y 1.33. La presencia del cobre durante esta etapa no afectó la acción del consorcio bacteriano, ya que durante este lapso pudo remover entre 0.67 a 1.9 gDQO/L (Figura 6, etapa III); manteniendo eficiencias de remoción por arriba del 88% (Figura 7, etapa III). En la Tabla 6, se muestran un resumen de los resultados para cada relación DQO/ SO_4^{2-} .

La producción de biogás fue mínima los primeros 99 días de operación del reactor EGSB, probablemente debido a una fuga. Sin embargo, a partir del día 100 se mejoró la captación de biogás, ya que el sistema fue cerrado herméticamente. La máxima producción de biogás obtenida fue de 0.927 L Biogás/d (0.272 L Biogás/Ld).

4.3.2.2. Conversión de Sulfato.

En la etapa de adaptación, la relación DQO/ SO_4^{2-} se disminuyó como fue mencionado en la sección 4.3.2.1. Cabe mencionar que el cambio de una relación a otra se realizó cuando la conversión del sulfato alcanzó su estado estacionario. Los primeros 71 días de operación se pudo observar que la actividad sulfato-reductora fue incrementándose conforme se aumentó la concentración de sulfato, lográndose conversiones desde 0.08 a 0.65 g SO_4^{2-} /L.

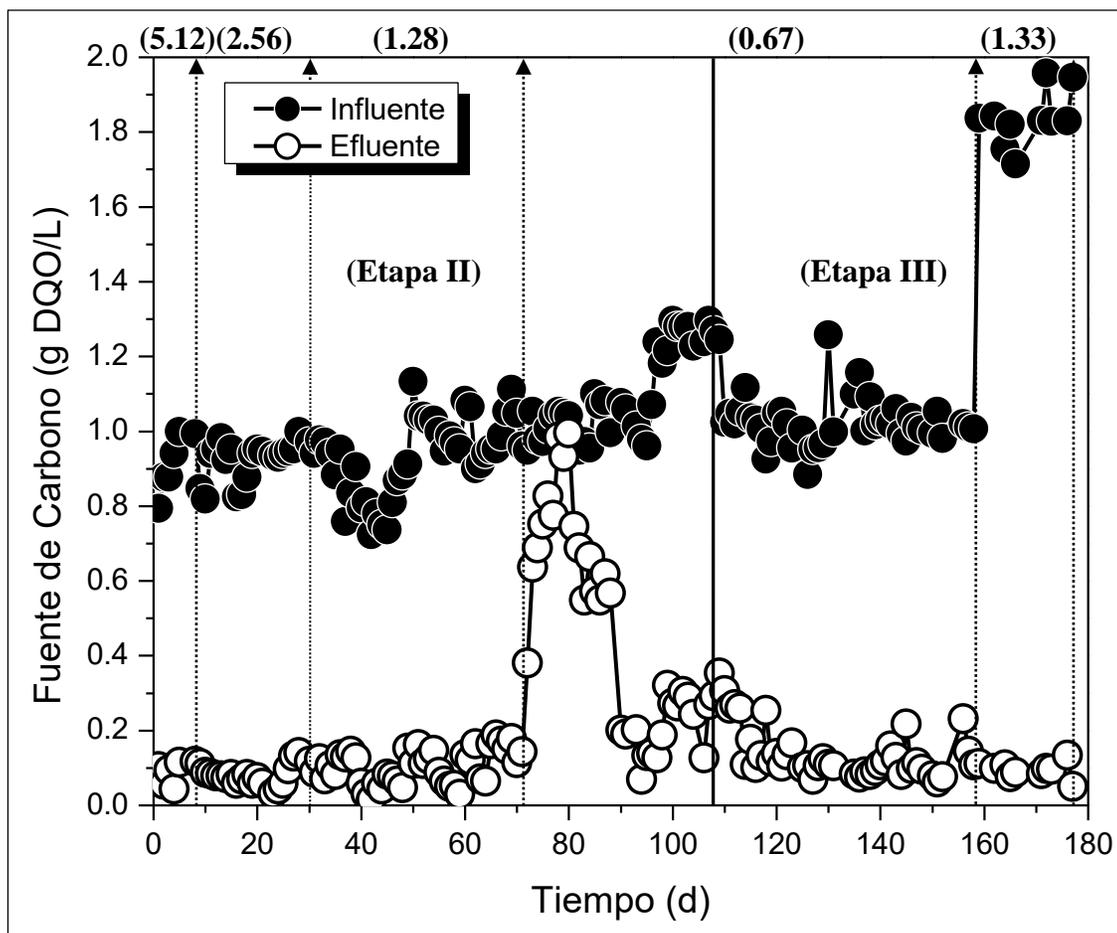


Figura 6. Remoción de la fuente de carbono en el reactor EGSB.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación. El cambio en las relaciones $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33.

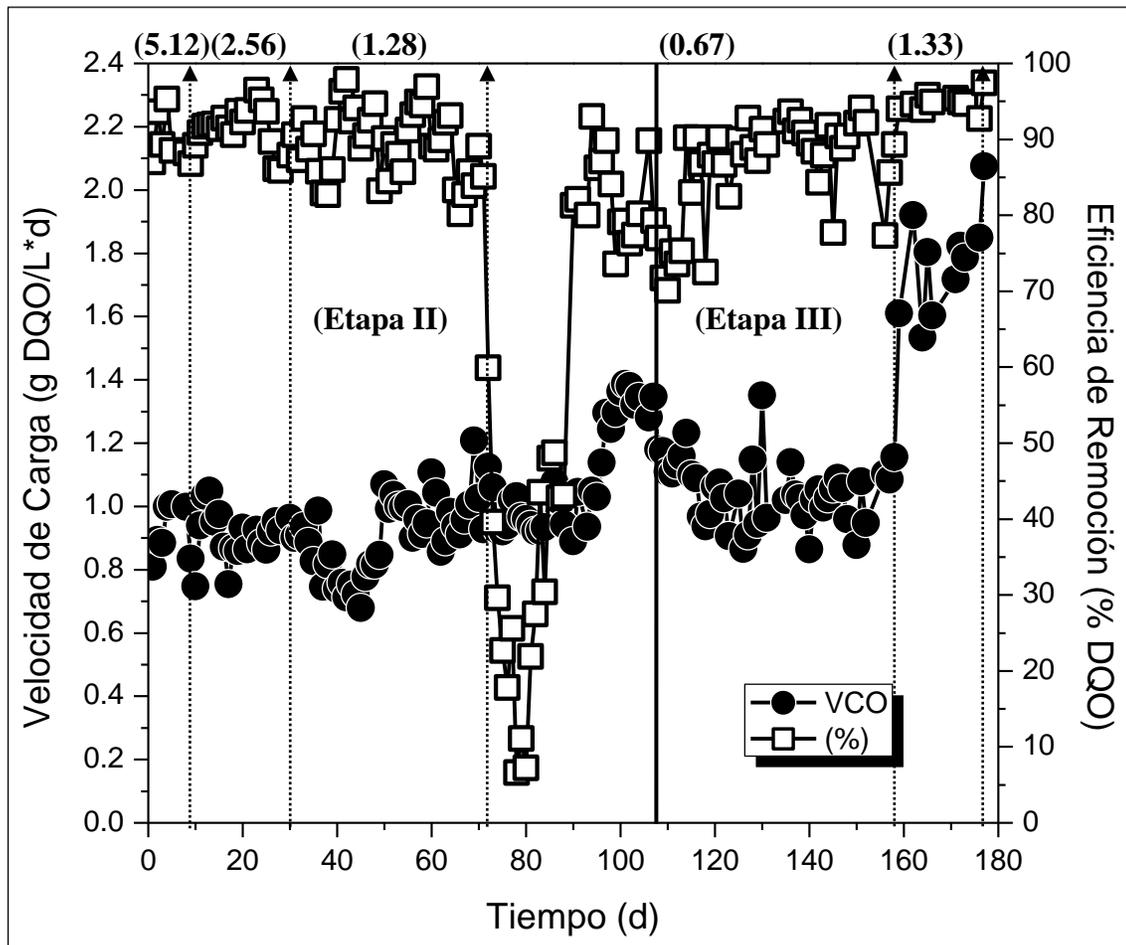


Figura 7. Eficiencia de remoción de la fuente de carbono en el reactor EGSB.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación. El cambio en las relaciones DQO/SO_4^{2-} se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33. VCO= Velocidad de carga orgánica.

Tabla 6. Resumen de la remoción de la demanda química de oxígeno en el reactor de lodos granulares expandidos.

| Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | Entrada | | Salida | | | Consumo | |
|--|--------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | Total- Soluble (g DQO/L) | VCO ^b (gDQO/Ld) | Total (g DQO/L) | Soluble (g DQO/L) | Insoluble (g DQO/L) | Soluble (g DQO/L) | Eficiencia (%) |
| | 5.12 | 0.898 ±0.08 | 0.92 ±0.08 | 0.111 ±0.03 | 0.082 ±0.03 | 0.029 ±0.01 | 0.815 ±0.08 |
| 2.56 | 0.925 ±0.06 | 0.91 ±0.08 | 0.100 ±0.03 | 0.081 ±0.03 | 0.018 ±0.01 | 0.843 ±0.06 | 91 (86.0-96.5) |
| 1.28-I | 0.915 ±0.07 | 0.89 ±0.08 | 0.133 ±0.03 | 0.111 ±0.03 | 0.022 ±0.01 | 0.804 ±0.09 | 88 (82.7-92.7) |
| 1.28-II | 0.942 ±0.11 | 0.91 ±0.13 | 0.141 ±0.06 | 0.099 ±0.05 | 0.042 ±0.03 | 0.843 ±0.09 | 89 (80.2-97.9) |
| 0.67-I | 1.082 ±0.12 | 1.09 ±0.16 | 0.565 ±0.30 | 0.468 ±0.28 | 0.098 ±0.06 | 0.614 ±0.35 | 57 (6.6-93.0) |
| 0.67-II | 1.039 ±0.09 | 1.05 ±0.11 | 0.203 ±0.09 | 0.146 ±0.07 | 0.057 ±0.04 | 0.893 ±0.09 | 86 (70.1-94.1) |
| 1.33 | 1.836 ±0.07 | 1.77 ±0.16 | 0.125 ±0.05 | 0.095 ±0.02 | 0.030 ±0.03 | 1.742 ±0.08 | 95 (92.7-97.4) |
| PC ^a | 1.052 ±0.24 | 1.04 ±0.24 | 0.240 ±0.23 | 0.187 ±0.20 | 0.053 ±0.05 | 0.865 ±0.31 | 82 (6.6-97.9) |

^aproceso completo; ^bvelocidad de carga orgánica.

Mientras que la producción de sulfuro se mantuvo por arriba de $72 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ (Figura 8, etapa II) con eficiencias de conversión de sulfato superiores al 60% (Figura 9, etapa II). Durante este periodo no se consiguió la reducción completa del sulfato, esto debido a que en relaciones $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ superiores a 0.67 hay un exceso de materia orgánica; lo cual favorece a la metanogénesis permitiendo su coexistencia (Omil *et al.*, 1997b).

Entre tanto en la relación de 0.67 (día 72), la actividad sulfato-reductora disminuyó debido a la falla en el proceso. Se consideró que la recuperación de la actividad se consiguió luego de 30 días, al igualar la máxima reducción de sulfato alcanzada en relaciones anteriores. Los últimos días de la etapa (102 al 106), la reducción del sulfato se mantuvo con conversiones cercanas a $0.6 \text{ g SO}_4^{2-}/\text{L}$ y niveles de sulfuro de más $310 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$, con eficiencias de conversión de 41%. Hasta este punto no se pudo conseguir que el proceso fuese predominantemente sulfato-reductor, ya que el consumo de la DQO por las bacterias sulfato-reductoras fue del 40% de la remoción total. Lo cual se reflejó en una conversión del sulfato incompleta. Sin embargo, se decidió proceder a la etapa de bioprecipitación debido a que las concentraciones de sulfuro fueron superiores a $288 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$; lo suficiente para remover teóricamente más de $571 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$ ($8.98 \text{ mmol Cu}^{2+}/\text{L}$).

Hasta el día 106, la alimentación del reactor estuvo deficiente en cobre. Se sabe que los iones metálicos como hierro, cobre y zinc son necesarios para la mayoría de los microorganismos, incluyendo los sulfato-reductores; ya que son importantes cofactores en el transporte de electrones y en metaloenzimas redox-activas (Bridge *et al.*, 1999). Tomando en cuenta lo anterior, se observó que la capacidad sulfato-reductora durante los primeros 27 días (107-134) de la etapa de bioprecipitación fue levemente afectada con concentraciones de $50 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$; ya que la conversión de sulfato aumentó a $0.65 \text{ g SO}_4^{2-}/\text{L}$ y la concentración de sulfuro sobrepasó los $353 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ (Figura 8, etapa III). Mientras que la eficiencia de conversión superó el 47% (Figura 9, etapa III).

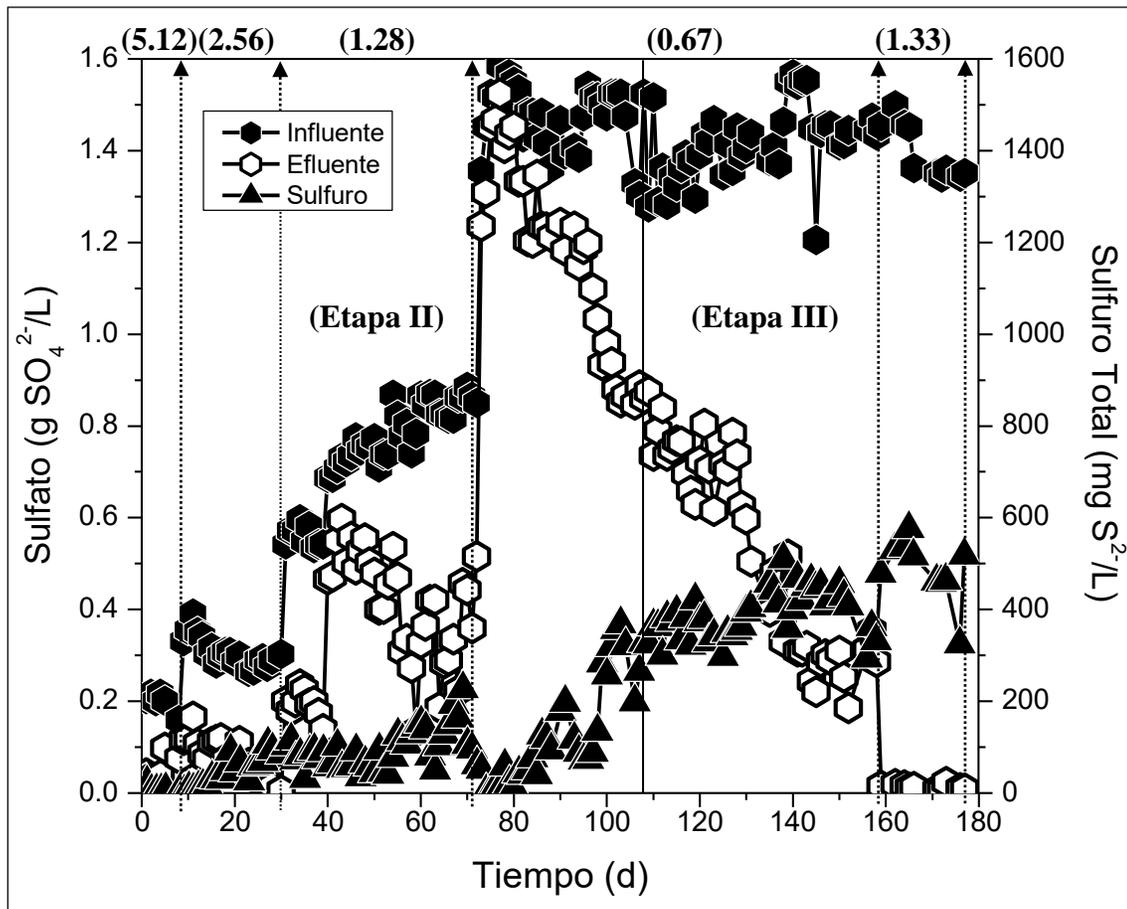


Figura 8. Conversión de sulfato en el reactor EGSB.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación. El cambio en las relaciones $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33. Influyente= Sulfato en el influente; Efluente= Sulfato en el efluente.

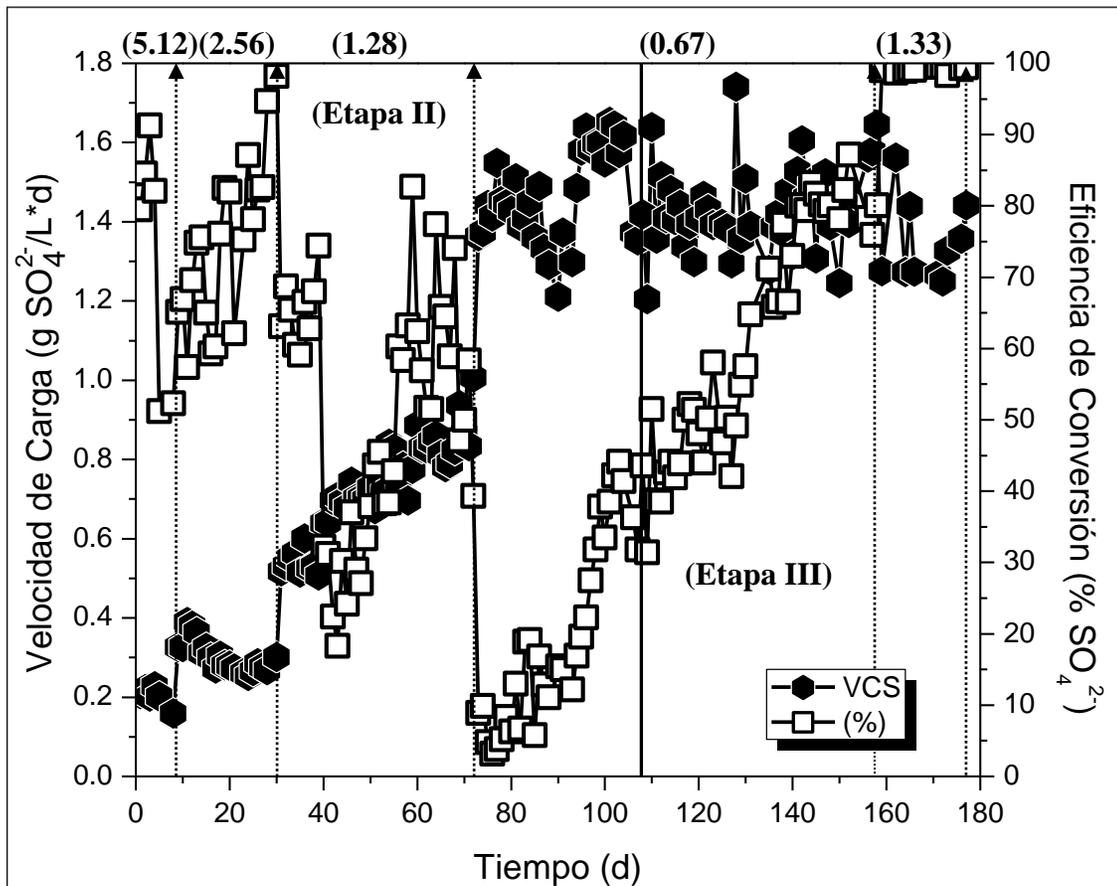


Figura 9. Eficiencia de conversión de sulfato en el reactor EGSB.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación.

El cambio en las relaciones DQO/SO_4^{2-} se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33. VCS= Velocidad de carga de sulfato.

Los 22 días posteriores (135 al 157), las concentraciones del ión metálico se aumentaron de entre 100 a 200 mg Cu^{2+} /L. Lo cual incrementó la conversión aproximadamente al doble, alcanzando valores mayores a 1.12 g SO_4^{2-} /L con niveles de sulfuro cercanos a 424 mg S^{2-} /L. La eficiencia de conversión correspondiente superó el 77%. Sin embargo, no se consiguió la remoción completa del sulfato. El aumento en la capacidad sulfato-reductora observado en este periodo pudo deberse a que el cobre fue asimilado por las bacterias sulfato-reductoras potenciando su desarrollo. Aunque se sabe que el cobre debió ser precipitado por el sulfuro disminuyendo su biodisponibilidad (Bridge *et al.*, 1999), se asume que una pequeña parte del cobre permaneció en estado soluble facilitando su asimilación. En cuanto al consumo de la fuente de carbono, los sulfato-reductores lograron consumir más del 82% de la DQO removida total; con lo cual se consiguió el predominio del proceso sulfato-reductor.

Durante los últimos 19 días de la etapa (158 al 177), se procedió a subir la relación estratégicamente a 1.33. Manteniendo fija la concentración de sulfato y aumentando la de la materia orgánica a 2 g DQO /L. Esto, debido a que no se logró la conversión completa del sulfato en la relación de 0.67. En respuesta a esta estrategia, la reducción del sulfato se elevó a más de 1.4 g SO_4^{2-} /L, con producciones de sulfuro superiores a 472 mg S^{2-} /L. La eficiencia de conversión sobrepasó el 97%, por lo que se consiguió remover el sulfato casi en su totalidad. Por otro lado, el consumo de la DQO por las bacterias reductoras del sulfato disminuyó al 53% de la remoción total debido al efecto del exceso de materia orgánica; como se mencionó anteriormente.

En cuanto a las concentraciones de cobre utilizadas en este periodo, aunque fueron las más altas en la etapa (200 a 300 mg Cu^{2+} /L), no parecieron influir significativamente en el desempeño de las bacterias sulfato-reductoras en comparación con el cambio en la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$. En la Tabla 7, se muestra el resumen de los resultados de la conversión del sulfato para cada relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$.

Tabla 7. Resumen de la conversión del sulfato y la producción de sulfuro en el reactor de lodos granulares expandidos.

| Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | Entrada | | Salida | Conversión | | Producto | | |
|--|---|---|---|--|-------------------|--|--|---------------------|
| | Sulfato Total (g SO ₄ ²⁻ /L) | VCS ^b (g SO ₄ ²⁻ /Ld) | Sulfato Remanente (g SO ₄ ²⁻ /L) | Sulfato Reducido (g SO ₄ ²⁻ /L) | Eficiencia (%) | Sulfuro ^c Empírico (mg S ²⁻ /L) | Sulfuro ^c Experimental (mg S ²⁻ /L) | Recuperación (%) |
| 5.12 | 0.207 ±0.01 | 0.212 ±0.01 | 0.046 ±0.03 | 0.162 ±0.03 | 78 (51.2-91.3) | 54 (35-61) | 8 (4-22) | 15 |
| 2.56 | 0.300 ±0.05 | 0.295 ±0.05 | 0.083 ±0.04 | 0.218 ±0.04 | 72 (57.4-98.2) | 73 (27-91) | 41 (2-106) | 57 |
| 1.28-I | 0.533 ±0.09 | 0.515 ±0.08 | 0.179 ±0.07 | 0.354 ±0.03 | 66 (59.1-74.4) | 118 (100-132) | 83 (32-115) | 70 |
| 1.28-II | 0.782 ±0.07 | 0.758 ±0.09 | 0.402 ±0.12 | 0.380 ±0.15 | 49 (18.3-82.7) | 127 (44-216) | 98 (36-228) | 77 |
| 0.67-I | 1.450 ±0.13 | 1.450 ±0.14 | 1.170 ±0.23 | 0.282 ±0.19 | 19 (3.0-44.0) | 94 (16-225) | 121 (2-369) | 128 |
| 0.67-II | 1.410 ±0.08 | 1.430 ±0.11 | 0.548 ±0.22 | 0.865 ±0.26 | 61 (31.0-87.0) | 289 (134-420) | 385 (265-511) | 133 |
| 1.33 | 1.400 ±0.06 | 1.346 ±0.10 | 0.038 ±0.08 | 1.384 ±0.06 | 97 (98.3-99.5) | 462 (445-494) | 472 (325-576) | 102 |
| PC ^a | 1.048 ±0.47 | 1.043 ±0.48 | 0.513 ±0.42 | 0.535 ±0.39 | 51 (3.2-99.5) | 179 (16-494) | 199 (2-576) | 111 |

^aproceso completo; ^bvelocidad de carga de sulfato. ^csulfuro total (soluble + gaseoso).

4.3.2.3. Especiación del Sulfuro.

Las especies que conforman al sulfuro en la fase acuosa son: el sulfuro disuelto total (SDT), que es el sulfuro inicialmente en solución; el cual es igual al sulfuro disuelto remanente (SDR) o sulfuro que permanece en estado soluble más el sulfuro precipitado (SP) por los metales presentes en el medio. Además, bajo las condiciones de este experimento, el SDR está constituido por dos especies solubles: el sulfuro ionizado o disociado (HS^-) y el sulfuro no-ionizado o no-disociado (H_2S). Tomando en cuenta lo anterior, a continuación se describe el comportamiento de las especies de sulfuro en el proceso sulfato-reductor.

Los primeros 71 días de la etapa de adaptación, la producción de SDT se incrementó gradualmente conforme se disminuyó la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 5.12 a 1.28, alcanzando valores superiores a $66 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$. Los niveles de SP fueron bajos debido a la escasez de iones metálicos en el medio, siendo cercanos a $9 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$; con lo cual las concentraciones de SDR llegaron a ser mayores a $57 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ (figura 10, etapa II). Entre las especies solubles se tiene que la concentración de HS^- fue superior a $44 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$, mientras que la de H_2S se mantuvo en niveles inferiores a $13 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ (figura 11, etapa II). El sulfuro ionizado predominó de manera importante debido a que el consocio bacteriano logró amortiguar adecuadamente el pH, manteniendo un valor cercano a 7.4. Lo anterior también fue posible gracias a un buen control de la temperatura. El control de los niveles de sulfuro no-ionizado es importante, ya que es un compuesto tóxico para casi cualquier bacteria, incluyendo las sulfato-reductoras (Rinzema y Lettinga, 1988; González-Silva, 2007).

En el cambio a la relación de 0.67 (día 72), los niveles de SDT decayeron debido a la falla en el proceso, al igual que los niveles de las demás especies. No obstante, la recuperación de la actividad sulfidogénica se consiguió luego de 19 días (día 90). Los últimos 16 días de la etapa de adaptación (90 al 106), el sulfuro soluble se incrementó a más de $190 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$. La precipitación del sulfuro se elevó a $19 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$, quedando concentraciones en solución cercanas a $172 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$.

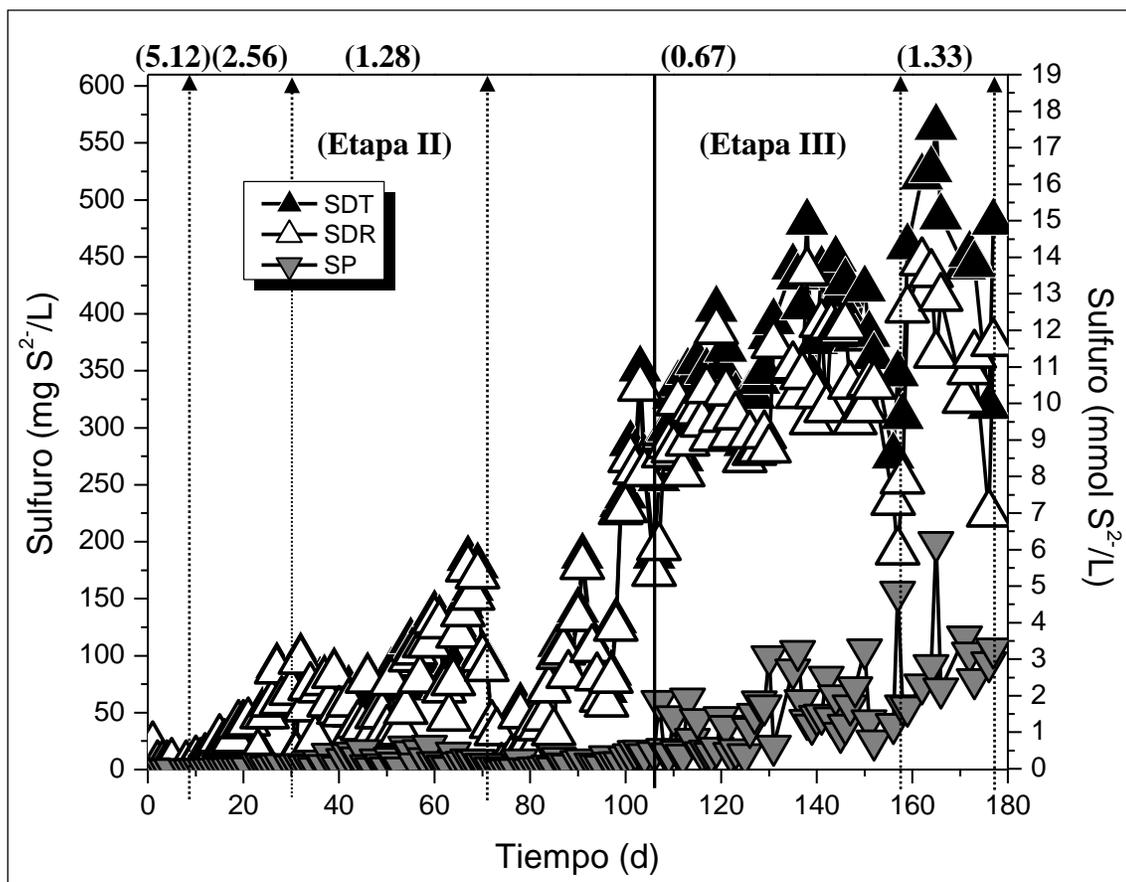


Figura 10. Fracciones del sulfuro en la fase acuosa.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación. El cambio en las relaciones DQO/SO_4^{2-} se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33. SDT = Sulfuro disuelto total, SDR = Sulfuro disuelto remanente, SP = Sulfuro precipitado.

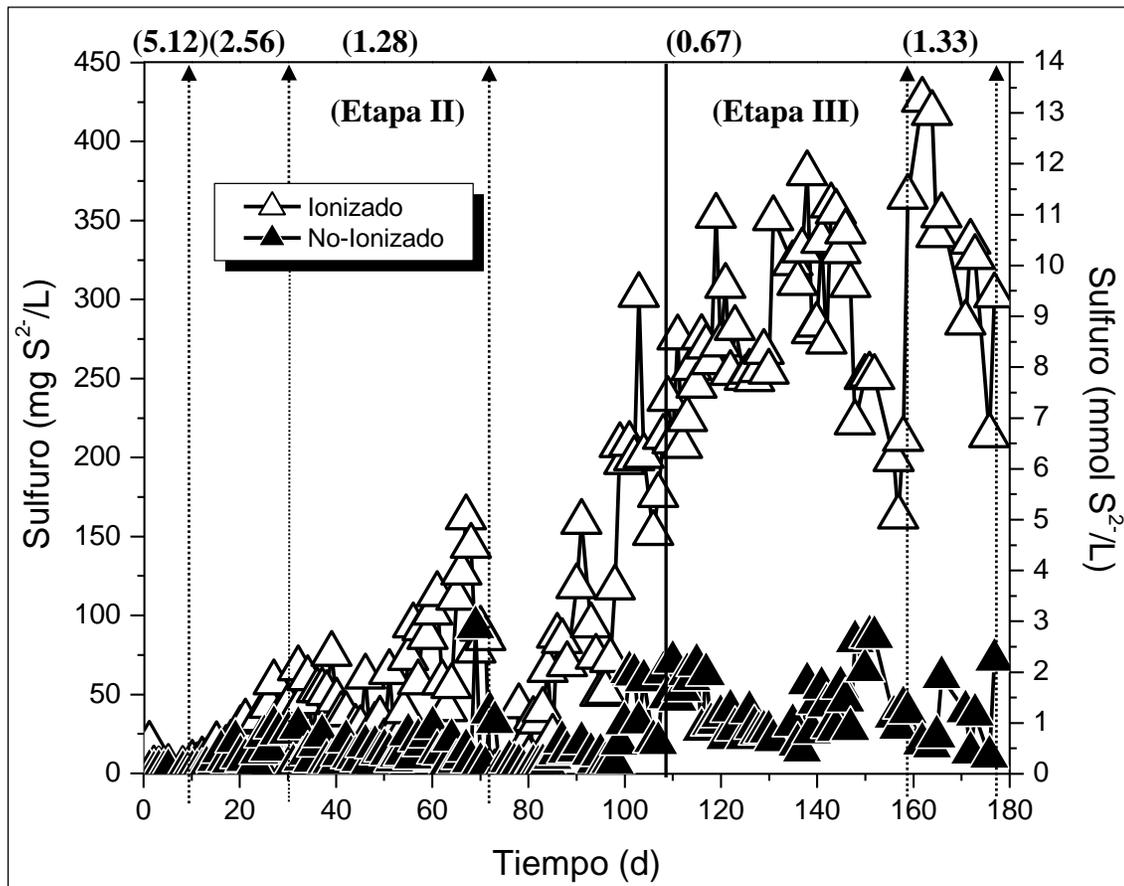


Figura 11. Fracciones del sulfuro disuelto remanente.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación. El cambio en las relaciones $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33. Sulfuro Ionizado= HS^- ; Sulfuro No-Ionizado= H_2S .

En consecuencia, los niveles de HS^- aumentaron por arriba de $147 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$, mientras que el H_2S se mantuvo en $25 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ gracias a que las bacterias controlaron el pH manteniéndolo cercano a 7.7. La elevación del SP en esta parte del proceso pudo deberse a la acumulación del sulfuro metálico en las mangueras de salida del efluente, en donde se tomaron las muestras para las determinaciones. Por otro lado, la disminución de las actividades biológicas en la falla del proceso pudo deberse a los factores que se discuten en la sección de discusión de resultados.

En la etapa de bioprecipitación, con la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 0.67 (días 107 al 157). Los niveles de SDT se elevaron considerablemente, alcanzando valores superiores a $362 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$. La precipitación del sulfuro se incrementó hasta $47 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$, con concentraciones del metal de hasta $200 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$, dejando en solución cerca de $315 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ (figura 10, etapa III); de los cuales $273 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ fueron para el HS^- y $42 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ para el H_2S (figura 11, etapa III). Los microorganismos anaerobios lograron conservar el pH en 7.7, asegurando el dominio de la forma ionizada del sulfuro.

Durante la última relación de 1.33 (días 158-177), la producción de sulfuro total se elevó considerablemente debido al aumento en la carga orgánica. Los niveles de SDT subieron a más de $454 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$. Sin embargo, los altos niveles del ión metálico de entre 200 a $300 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$ removieron hasta $95 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$; dejando en solución cerca de $359 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$. Para esta parte del proceso las bacterias mejoraron el control del pH, ya que lograron aumentarlo en dos unidades a 7.9; con lo cual se consiguió disminuir la concentración de sulfuro no-disociado a valores menores a $34 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$, mientras que los niveles de HS^- subieron a más de $325 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$. Los altos niveles de cobre manejados en esta etapa no afectaron el proceso de sulfato-reducción, ya que fueron contrarrestados por la presencia del sulfuro (formando sulfuro de cobre), el cual no es biodisponible (Bridge *et al.*, 1999). Además, el sulfuro metálico no pudo acumularse en las superficies celulares gracias el lavado provocado por las altas velocidades ascensionales (Colussi *et al.*, 2009). En la tabla 8, se incluye un resumen de la especiación del sulfuro para cada relación y el proceso completo.

Tabla 8. Resumen de la especiación del sulfuro biogénico en el reactor de lodos granulares expandidos.

| | Sulfuro Total | Sulfuro Disuelto Total (SDT) | Sulfuro Disuelto Remanente (SDR) | | Sulfuro Precipitado (SP) | Sulfuro Gaseoso |
|-----------------------------------|---|--|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | | | HS ^b * | H ₂ S ^c * | | |
| DQO/SO ₄ ²⁻ | HS ^b +H ₂ S ^c +MS ^d +H ₂ S ^e (mg S ²⁻ /L) | HS ^b + H ₂ S ^c + MS ^d (mg S ²⁻ /L) | HS ^b * | H ₂ S ^c * | MS ^d * | H ₂ S ^e * |
| 5.12 | 8.3 (4-22) | 7.7 (4-21) | 6.1 (2-19) | 1.2 (0.6-2) | 0.4 (0.2-1) | 0.6 (0.3-0.9) |
| 2.56 | 41.2 (2-106) | 36.0 (2-91) | 19.4 (1-58) | 9.9 (0.3-29) | 6.7 (0.1-41) | 5.2 (0.2-15) |
| 1.28-I | 82.7 (32-115) | 74.7 (28-100) | 43.9 (7-66) | 15.2 (5-29) | 15.6 (1-88) | 8.0 (3-15) |
| 1.28-II | 98.0 (36-228) | 90.0 (32-185) | 65.6 (20-162) | 15.3 (4-93) | 9.1 (2-34) | 8.0 (2-49) |
| 0.67-I | 120.9 (2-369) | 112.0 (2-352) | 84.6 (0.01-303) | 17.0 (0.6-64) | 10.4 (0.1-61) | 8.9 (0.3-34) |
| 0.67-II | 384.6 (265-511) | 362.4 (255-481) | 273.3 (162-380) | 42.3 (14-87) | 46.8 (13-156) | 22.2 (8-46) |
| 1.33 | 472.3 (325-576) | 454.5 (310-564) | 325.4 (212-426) | 33.8 (10-72) | 95.3 (55-200) | 17.8 (5-38) |
| PC ^a | 199.1 (2-576) | 186.8 (2-564) | 137.4 (0.01-426) | 23.4 (0.3-93) | 26.0 (0.1-200) | 12.3 (0.2-49) |

^a proceso completo; ^b sulfuro soluble ionizado; ^c Sulfuro soluble no ionizado; ^d sulfuro metálico; ^e sulfuro en estado de gas *dtos calculados por la ley de Henry, en base a la concentración de sulfuro soluble total, la temperatura y el pH.

4.3.2.4. Bioprecipitación de Cobre.

En esta etapa, el cambio en la concentración de cobre fue contemplado como sub-etapas. Cabe mencionar que el ión cúprico fue adicionado al reactor incrementando su concentración en porciones de 50 mg Cu²⁺/L. Además, se consideró como estado estacionario un período mínimo 5 días.

Durante la relación DQO/SO₄²⁻ estequiométrica de 0.67 (días 107 al 157), sub-etapas I a la V, se adicionaron concentraciones de cobre en el rango de 50 a 200 mg Cu²⁺/L (Figura 12, relación 0.67). La velocidad de carga del metal (VCM), correspondiente a un TRH de 1 día varió de 0.047 a 0.205 g Cu²⁺/Ld. El influente inicialmente estuvo constituido por el medio mineral adicionado con el ión cúprico (pH 6) y fue alimentado directamente en contacto con el lodo anaerobio. No se presentaron efectos inhibitorios bajo estas condiciones.

A pesar de lo anterior, a partir del día 19, el influente fue separado en dos partes. Una de las cuales contuvo la solución de cobre (pH de 4.5) y fue alimentada en la recirculación para evitar riesgos de saturación de la biomasa con altos niveles del ión metálico o con el sulfuro metálico. Como resultado bajo ambos arreglos experimentales se tuvo que en el sulfuro removió más de 199 mg Cu²⁺/L, dando un porcentaje de remoción superior al 98% (Figura 13, relación 0.67).

Los niveles de sulfuro removidos junto con el cobre fueron cercanos a 101 mg S²⁻/L. En este periodo no se logró alcanzar el 100% de eficiencia de remoción probablemente debido a que el cobre formó complejos solubles muy estables, ya sea con moléculas inorgánicas, con trazas de la fuente de carbono o bien con productos microbianos solubles (Zandvoort *et al.*, 2006). En consecuencia estos complejos pudieron ser movilizados en el efluente y cuantificados como cobre soluble (Gaszo, 2001). Por otro lado, pudo deberse a que parte del sulfuro de cobre haya permanecido en suspensión en las muestras cuantificadas.

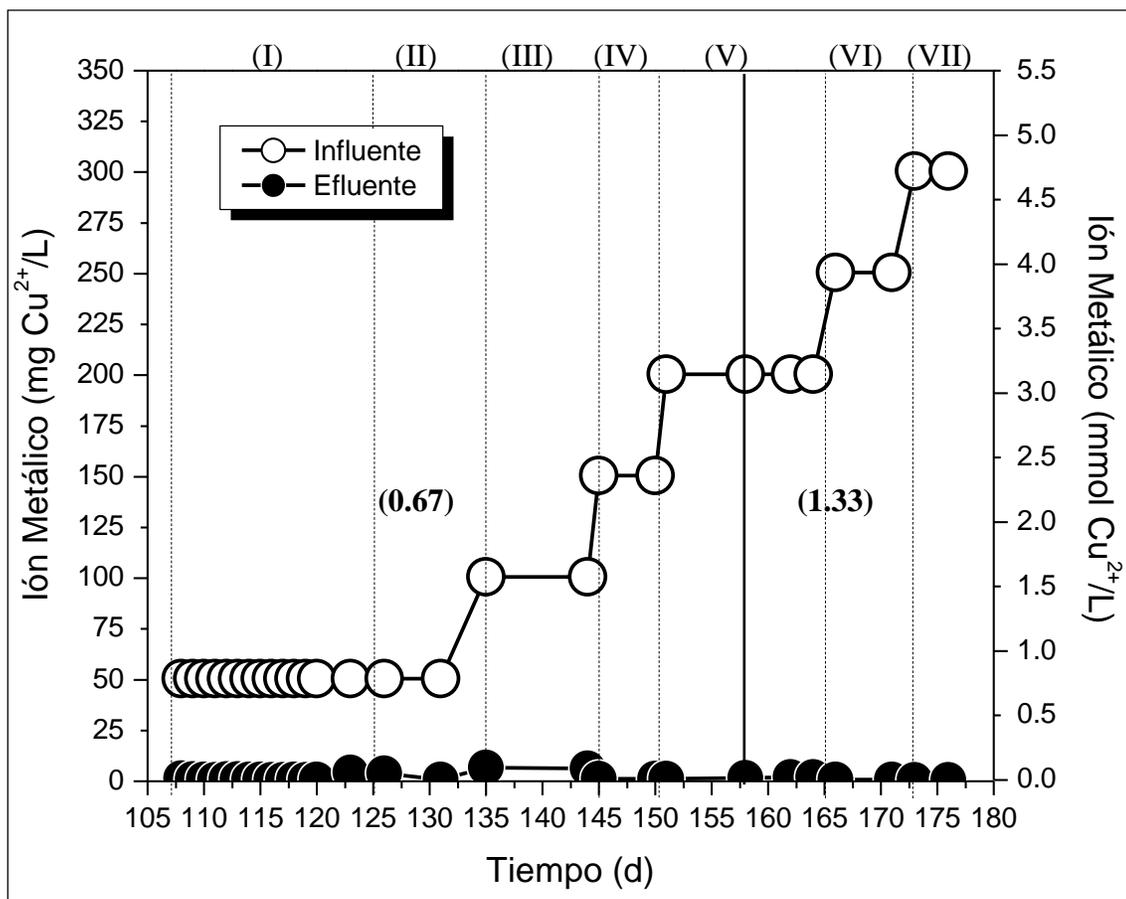


Figura 12. Remoción de cobre en la etapa de bioprecipitación.

Con línea sólida se indica el cambio en la relación DQO/SO_4^{2-} : Relaciones de 0.67 y 1.33. Con líneas a rayas se indica el cambio en las concentraciones de cobre (**mg/L**): I) 50-I, II) 50-II, III) 100, IV) 150, V) 200, VI) 250, VII) 300. Influyente = Concentración de cobre en el influente; Efluente = Concentración de cobre en el efluente.

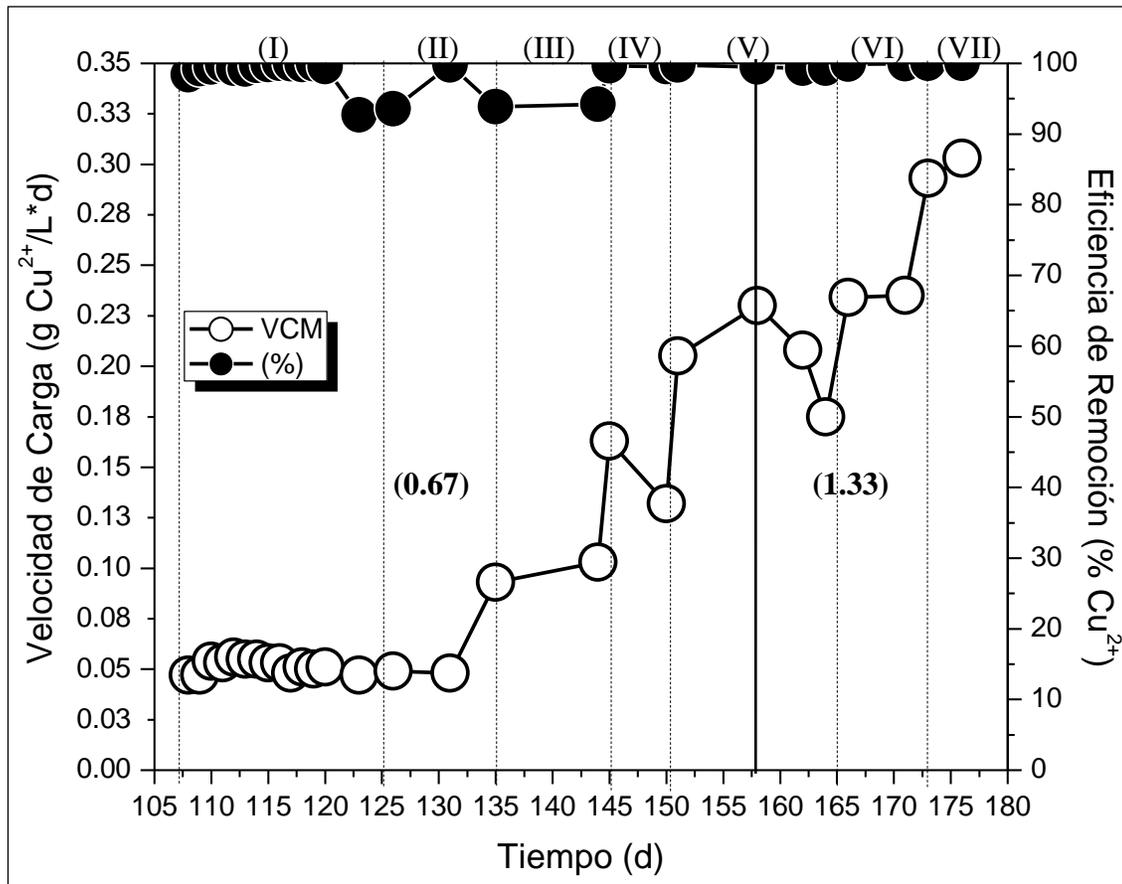


Figura 13. Eficiencia de remoción de cobre en la etapa de bioprecipitación.

Con línea sólida se indica el cambio en la relación DQO/SO_4^{2-} : Relaciones de 0.67 y 1.33.

Con líneas a rayas se indica el cambio en las concentraciones de cobre (mg/L): I) 50-I, II) 50-II, III) 100, IV) 150, V) 200, VI) 250, VII) 300. VCM= Velocidad de carga del metal.

El penúltimo día de la relación de 0.67 (día 156), se cambió nuevamente la configuración del sistema al colocar un sedimentador en la recirculación del reactor. El influente fue alimentado directamente en la entrada a este accesorio para que el sulfuro de cobre formado fuese separado del torrente y no se quedara en el bucle de la recirculación. En la relación de 1.33 (días 158 al 177), sub-etapas V a la VII, la concentración de cobre fue manejada de 200 a 300 mg Cu²⁺/L (Figura 12, relación 1.33). La VCM varió de 0.230 a 0.303 g Cu²⁺/Ld. Los altos niveles de sulfuro lograron remover hasta 299.98 mg Cu²⁺/L, dando una eficiencia de remoción cercana al 100% (Figura 13, relación 1.33). El sulfuro precipitado alcanzó niveles superiores a 151 mg S²⁻/L. El sedimentador logró clarificar el efluente removiendo la Covelita formada, con lo cual se mejoró la eficiencia de remoción del cobre y se evitó la posible inhibición de las bacterias. Además, se tiene que el bajo pH del influente (entre 4.0 y 4.5) no afectó el proceso, ya que fue amortiguado eficientemente. En la Tabla 9, se presenta un resumen de la etapa de bioprecipitación en donde la Covelita formada se calculó teóricamente.

4.3.2.5. Competencia entre Bacterias Metanogénicas y Sulfato-Reductoras.

Las bacterias sulfato-reductoras compiten con las metanogénicas por sustratos como los alcoholes y el acetato, durante el tratamiento anaerobio de aguas que contienen altos niveles de sulfato. El resultado de esta competencia es importante porque puede determinar el rendimiento de los productos finales, sulfuro y metano (Lens *et al.*, 2000).

Inicialmente, la actividad metanogénica fue ampliamente dominante. Lo cual pudo constatar, ya que para el día 71 con las relaciones DQO/SO₄²⁻ de 5.12 a 1.28, tan sólo se alcanzó un consumo de DQO de las bacterias sulfato-reductoras cercano al 25% (Figura 14, etapa II). Durante este periodo pudo observarse lo que probablemente fueron lapsos de adaptabilidad de las bacterias metanogénicas al sulfuro. Lo cual pudo ser visualizado como el aumento progresivo y la caída repentina de la eficiencia de consumo sulfato-reductora. Por otra parte, el día 72 decayó la remoción de la materia orgánica total debido a la falla del proceso y por consiguiente, también las eficiencias de consumo de DQO para ambos grupos bacterianos.

Tabla 9. Resumen de la etapa de bioprecipitación en el reactor de lodos granulares expandidos.

| Sub Etapas | Periodo de Aplicación | Duración | Entrada | | Salida | | Producto | | Eficiencia de Remoción |
|----------------|-----------------------|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|-----|------------------------|
| | | | Cobre Total | VCM ^c | Cobre Soluble | Cobre Precipitado * | Sulfuro Metálico * | (%) | |
| (#) | (d) | (d) | (mg Cu ²⁺ /L) | (g Cu ²⁺ /Ld) | (mg Cu ²⁺ /L) | (mg Cu ²⁺ /L) | (mg MS/L) | | (%) |
| (I) | 107-124 ^a | 18 | 50 ±2.1 | 0.051 ±0.003 | 0.47 ±0.9 | 49.53 ±0.94 | 74.53 ±1.4 | | 99.07 ±1.9 |
| (II) | 125-134 | 10 | 50 ±1.4 | 0.049 ±0.001 | 1.66 (0.1-3.2) | 48.34 ±2.2 | 72.73 ±3.3 | | 96.68 ±4.4 |
| (III) | 135-144 | 9 | 100 ±2.1 | 0.098 ±0.007 | 5.96 ±0.2 | 94.04 ±0.22 | 141.48 ±0.3 | | 94.04 ±0.2 |
| (IV) | 145-150 | 6 | 150 ±1.1 | 0.148 ±0.022 | 0.60 ±0.1 | 149.40 ±0.11 | 224.79 ±0.2 | | 99.60 ±0.1 |
| (V) | 151-164 ^b | 14 | 200 ±4.6 | 0.205 ±0.023 | 1.08 ±0.4 | 198.92 ±0.41 | 299.29 ±0.6 | | 99.46 ±0.2 |
| (VI) | 165-172 | 9 | 250 ±3.5 | 0.235 ±0.001 | 0.20 ±0.07 | 249.80 ±0.07 | 375.85 ±0.1 | | 99.92 ±0.03 |
| (VII) | 173-177 | 5 | 300 ±2.1 | 0.298 ±0.007 | 0.026 ±0.01 | 299.97 ±0.007 | 451.34 ±0.01 | | 99.99 ±0.002 |
| Etapa Completa | 107-177 | 71 | 114.3 (50-300) | 0.114 (0.047-0.303) | 0.992 (0-6.12) | 113.3 (46-299.98) | 170.5 (70-451.34) | | 98.76 (92.7-100) |

^a período en el que el reactor tuvo un solo influente de medio mineral y cobre. ^b período en el que se colocó el sedimentador (día 156). ^c velocidad de carga del ión metálico. * datos calculados en base a la remoción de cobre del efluente.

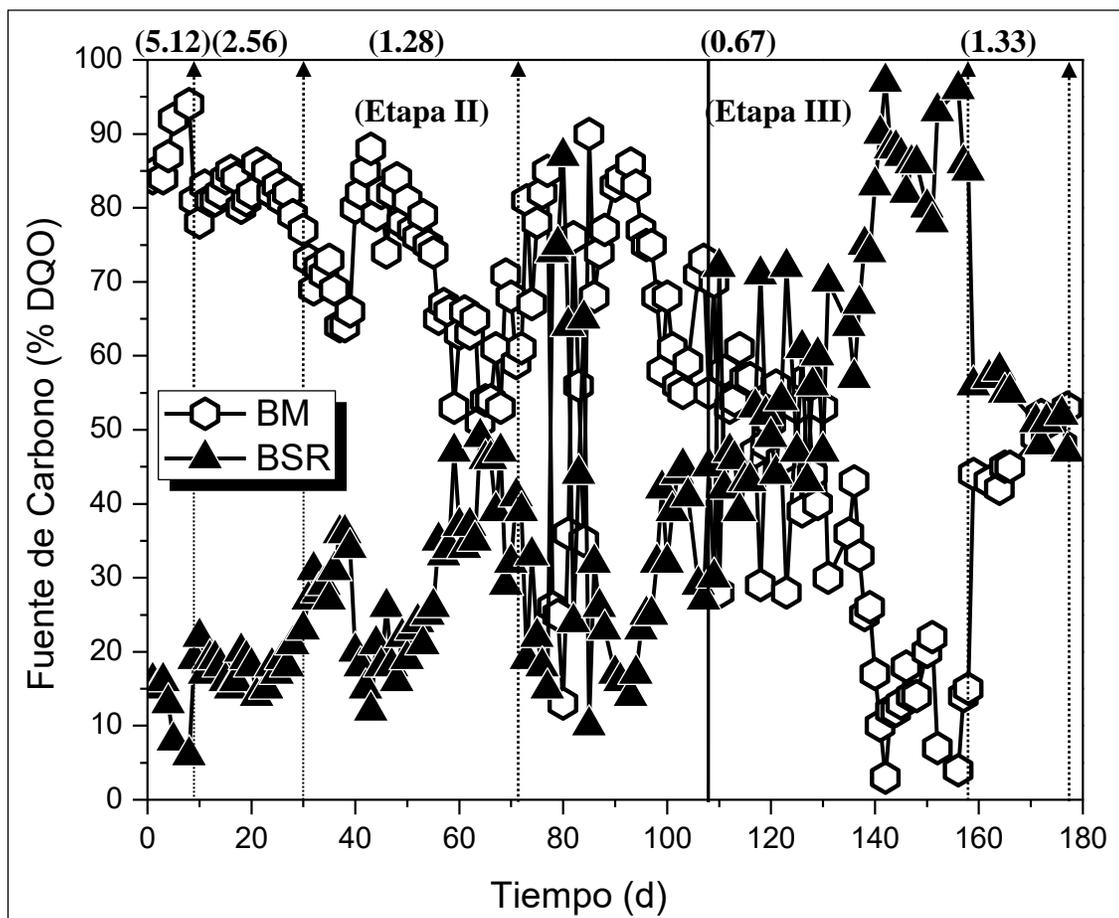


Figura 14. Competencia entre bacterias sulfato-reductoras y metanogénicas.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación. El cambio en las relaciones DQO/SO_4^{2-} se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33. BM = DQO consumida por las Bacterias metanogénicas, BSR = DQO consumida por las Bacterias sulfato-reductoras.

Durante los días de menor actividad (días 78 al 81), el proceso sulfato-reductor fue el predominante en el consumo de la DQO con un 75%. La recuperación de la actividad microbiológica total se consiguió luego de 18 días (día 90). Sin embargo, los demás días dominó ampliamente el proceso metanogénico. Por lo que de los días 72 al 106, la eficiencia de consumo sulfato-reductora apenas logró superar el 35%.

Luego, en la etapa de bioprecipitación (días 107 al 139), con la adición de cobre en concentraciones de 50 a 100 mg Cu^{2+} /L se observó un aumento considerable de más del 53% por parte de los microorganismo sulfato-reductores (Figura 14, etapa III). Con lo cual apenas lograron superar en la competencia a los metanogénicos. Así mismo, los últimos 18 días de la relación de 0.67 (días 140 al 157) se presentó un incremento aún mayor al 87%. Lo cual sucedió luego de aumentar la concentración del ión metálico de 100 a 200 mg Cu^{2+} /L. Esta mejoría en la actividad sulfato-reductora pudo deberse al efecto del cobre como fue mencionado en el apartado 4.3.2.2. Aun que también, pudo ser el efecto tardío de la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ estequiométrica; ya que al momento de adicionarse el cobre la tendencia se encontraba favoreciendo, aunque de manera inestable, a las bacterias sulfato-reductoras.

A continuación de los días 158 al 177, se aumentó la relación a 1.33 para tratar de incrementar la conversión del sulfato al 100%; lo cual se consiguió. Sin embargo, tuvo un efecto indeseado al aumentar la competitividad metanogénica. Por lo cual, la eficiencia de consumo sulfato-reductora decayó hasta el 53%. Este efecto se debió al exceso de materia orgánica, como se mencionó en el apartado 4.3.2.2. En general se puede concluir que la disminución progresiva de la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ consiguió aumentar el consumo de la DQO por las bacterias reductoras del sulfato. Además, la relación de 0.67 tuvo el efecto deseado de permitir el dominio del proceso sulfato-reductor; lo cual indicó que efectivamente el proceso de adaptación fue adecuado. En la Tabla 10, se presenta un resumen de la competencia de ambos grupos de bacterias por la fuente de carbono.

Tabla 10. Resumen de la competencia por el sustrato entre las bacterias sulfato-reductoras y las metanogénicas, en el reactor de lodos granulares expandidos.

| Relación DQO/SO ₄ ²⁻ | Consumo | | | Eficiencia de Consumo | |
|--|-------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Total | Metanogénesis ^b | Sulfato-Reducción ^b | Metanogénesis ^b | Sulfato-Reducción ^b |
| | (g DQO/L) | (g DQO/L) | (g DQO/L) | (%) | (%) |
| 5.12 | 0.816 ±0.08 | 0.708 ±0.09 | 0.108 ±0.02 | 87 (84-92) | 13 (8-16) |
| 2.56 | 0.843 ±0.06 | 0.698 ±0.06 | 0.145 ±0.03 | 83 (78-94) | 17 (6-22) |
| 1.28-I | 0.804 ±0.09 | 0.568 ±0.09 | 0.236 ±0.02 | 71 (64-77) | 29 (23-36) |
| 1.28-II | 0.843 ±0.09 | 0.589 ±0.09 | 0.253 ±0.10 | 70 (51-88) | 30 (12-49) |
| 0.67-I | 0.614 ±0.35 | 0.426 ±0.26 | 0.188 ±0.13 | 69 (13-90) | 31 (10-87) |
| 0.67-II | 0.893 ±0.09 | 0.317 ±0.19 | 0.577 ±0.18 | 35 (3-73) | 65 (27-97) |
| 1.33 | 1.742 ±0.08 | 0.819 ±0.10 | 0.923 ±0.04 | 47 (42-53) | 53 (47-58) |
| PC ^a | 0.865 ±0.31 | 0.509 ±0.23 | 0.357 ±0.26 | 59 (3-94) | 41 (6-97) |

^aproceso completo; ^bdatos calculados en base a la conversión del sulfato por las bacterias sulfato-reductoras (0.67 gDQO/1 g SO₄²⁻).

4.3.2.6. Amortiguamiento del pH.

La operación eficiente de un reactor anaerobio implica el control de una adecuada capacidad buffer del sistema que asegure el mantenimiento del pH en un rango óptimo para el desarrollo del consorcio microbiano. La relación de alcalinidades (α) es un parámetro de control de estabilidad rápido y confiable en el proceso anaerobio. El sistema será más estable conforme el valor de α sea más cercano a uno. En cambio, el pH proporciona información del comportamiento del reactor en estados más avanzados de desequilibrio, cuando la corrección del problema ya puede ser difícil de conseguir (Rojas-CH, 1987).

Los primeros 71 días de la etapa de adaptación, el pH del influente del medio mineral se mantuvo en 6.03 ± 0.1 . Este pH se eligió con la finalidad de estimular la producción de alcalinidad, por ser ligeramente ácido y por encontrarse en el rango de pH óptimo para el desarrollo de las bacterias sulfato-reductoras de entre 6.0 y 9.0 (Zehnder *et al.*, 1982).

Como resultado en el efluente se consiguió una adecuada alcalinización del medio, ya que el lodo anaerobio logró elevar el pH a 7.40 ± 0.3 y el valor de α fue de 0.83 ± 0.06 (Figura 15, etapa II). Sin embargo, el día 72 ocurrió la falla del proceso (acidificación). Por lo que se decidió aumentar el pH del influente a 7.12 ± 0.2 durante 22 días (78 al 99), con la finalidad de ayudar a la recuperación de la actividad microbológica.

En consecuencia de la estrategia anterior se consiguió elevar el pH del medio a 7.72 ± 0.2 y se logró aumentar la α a 0.74 ± 0.1 . Estas condiciones fueron adecuadas para que el consorcio bacteriano restaurara su actividad luego de 18 días de ocurrido el evento (día 90). Enseguida de la rehabilitación del proceso. En los últimos 7 días de la etapa de adaptación (100 al 106), se utilizó en el influente un pH de 6.21 ± 0.3 para estimular nuevamente la formación de bicarbonato y como preparación para la adición del ión metálico. El pH interno del reactor fue mantenido por los microorganismos en 7.52 ± 0.2 y la alcalinidad fue restablecida alcanzando un valor de 0.82 ± 0.03 .

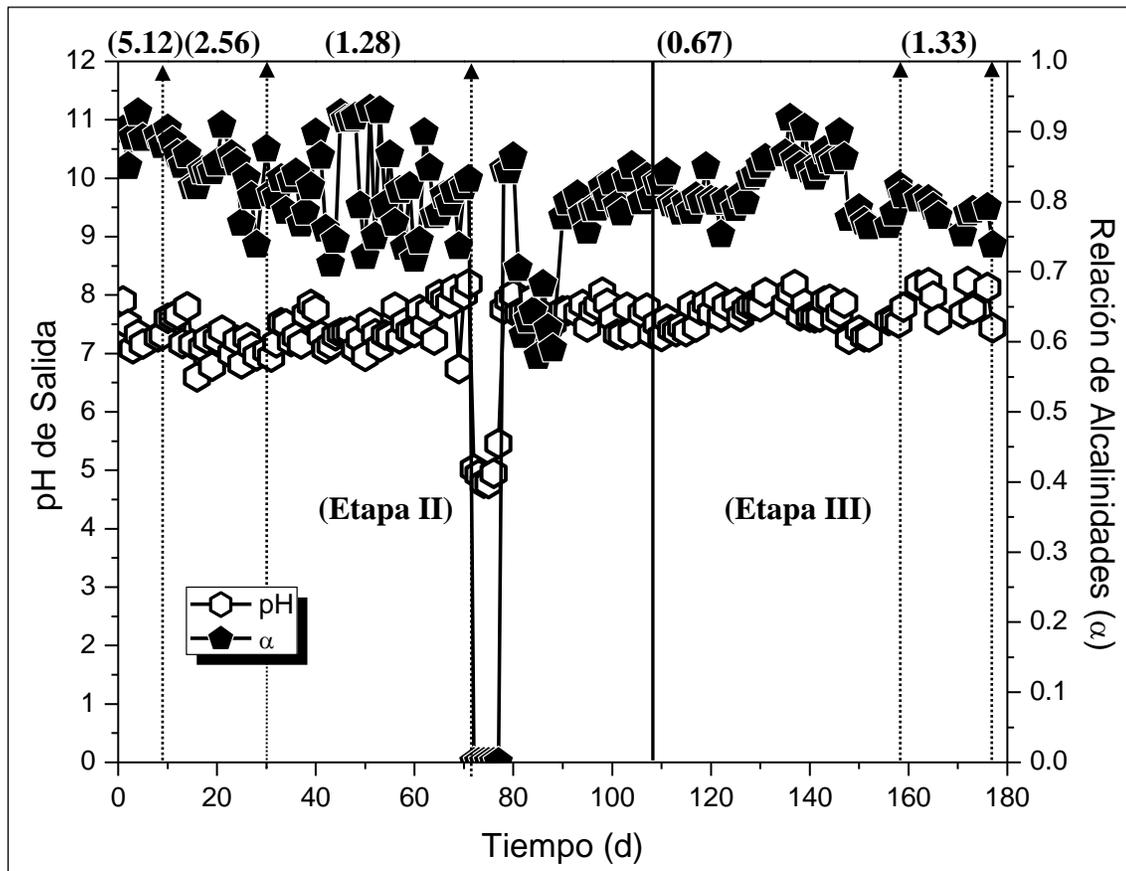


Figura 15. Amortiguamiento del pH en el reactor EGSB.

Las etapas se muestran divididas por la línea sólida: II) Adaptación y III) Bioprecipitación. El cambio en las relaciones $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ se indica con líneas punteadas: Relaciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.67 y 1.33.

Una vez revertidos los problemas del periodo de acidificación y alcanzadas concentraciones adecuadas de sulfuro biogénico, se procedió a la etapa de bioprecipitación. En donde los primeros 16 días (107 al 123) con concentraciones de 50 mg Cu²⁺/L y un pH en el influente de 6.17 ±0.2, se logró la alcalinización del medio elevando el pH a 7.59 ±0.2. Además, se consiguió mantener la relación de alcalinidades en 0.81 ±0.02 (Figura 15, etapa III). El contacto directo del metal y los sulfuros metálicos con la biomasa no afectaron el desempeño de los procesos anaerobios.

La reacción entre el metal y los sulfuros tampoco afectó el proceso, ya que los protones liberados durante esta “Ec. (6)” fueron correctamente neutralizados por el bicarbonato producido “Ec. (7)”. Los últimos 52 días de la etapa de bioprecipitación se utilizó un segundo influente conteniendo solamente al ión cúprico en concentraciones de 50 a 300 mg Cu²⁺/L y un pH de 4.48 ±0.1, para simular aguas ácidas de mina. Mientras que el primer influente contuvo sólo el medio mineral con un pH de 7.00 ±0.01, para ayudar a la amortiguamiento de la acidez del influente de cobre y los protones liberados por la reacción sulfuro-metal. Durante este periodo se instaló en la recirculación un sedimentador, al cual fue alimentado directamente el medio con cobre y en donde fueron retenidos los sulfuros metálicos formados. Como resultado, el pH del medio acuoso en el interior del reactor fue eficientemente amortiguado por el bicarbonato generado y la ayuda del pH del medio mineral, manteniéndose en un valor de 7.76. Además, la relación de alcalinidades permaneció sin ser afectada en un valor de 0.82 ±0.04.

4.4. Discusión de Resultados.

4.4.1. Estudios en Lote.

En nuestro estudio la concentración inhibitoria del 50% de la actividad metanogénica (CI₅₀) en un lodo granular anaerobio adaptado a condiciones sulfato-reductoras fue de 575.3 mg Cu²⁺/L. Mientras que en el estudio de Certucha-Barragán y *col.*, (2009), utilizando el mismo lodo pero bajo condiciones metanogénicas se encontró que la CI₅₀ fue de 280 mg Cu²⁺/L. Lo anterior demuestra un aumento en la tolerancia al cobre de

hasta 295.3 mg Cu²⁺/L en la presencia de sulfuro biogénico en una concentración máxima de 70.1 mg S²⁻/L. Esta concentración de sulfuro sólo alcanza para reaccionar con 138.9 mg Cu²⁺/L formando Covelita (CuS). Sin embargo, se sabe que cuando el cobre está en exceso en relación a la concentración molar de sulfuro se forma la otra especie de sulfuro de cobre llamada Calcocita (Cu₂S) (Gramp *et al.*, 2006); la cual secuestra una molécula adicional de cobre. Además, los metales también pueden ser removidos por adsorción en la superficie de los sulfuros metálicos producidos biológicamente (Jong & Parry, 2004; Watson *et al.*, 1995). Por el otro lado, en este estudio se encontró una CI₅₀ para la actividad sulfato-reductora de 115.2 mg Cu²⁺/L. Este valor fue cercano al obtenido en el estudio de Song y *col.*, (1998), donde se obtuvo una concentración de 100 mg Cu²⁺/L.

4.4.2. Estudio en Continuo.

En la competencia por la fuente de carbono entre los grupos bacterianos se encontró que el proceso anaerobio completo fue predominantemente metanogénico en un 59%. No obstante, la estrategia de adaptación del lodo granular a condiciones sulfato-reductoras; consistente en la disminución gradual de la relación DQO/SO₄²⁻ fue adecuada para conseguir un lodo predominantemente sulfato-reductor. Lo cual se consiguió durante la relación de 0.67-II. En donde las bacterias sulfato-reductoras alcanzaron el 65% del consumo (Tabla 10). La adición del cobre durante este periodo pudo favorecer a los sulfato-reductores, ya que los microorganismos estuvieron deficientes en este micronutriente durante la mayor parte de la operación del reactor. Con el aumento en la carga orgánica a 2 g DQO/Ld en la relación de 1.33, disminuyó la eficiencia de consumo de DQO por parte de las sulfato-reductoras hasta el 53%. A pesar de esto, la eficiencia de remoción total de la DQO aumentó del 86% en la relación de 0.67-II al 95% en la relación de 1.33 (Tabla 6). Igualmente, la eficiencia de conversión del sulfato se elevó del 61 al 97% respectivamente (Tabla 7). Lo anterior demuestra que la estrategia de aumento de la carga orgánica favoreció la conversión del sulfato casi en su totalidad.

En nuestro estudio, el tiempo necesario para conseguir la transformación del lodo metanogénico en sulfato-reductor fue de 117 días; alcanzado el 53% del consumo de la DQO y el 50% de conversión del sulfato. Sin embargo, restando los días que el proceso tardó en recuperarse de la acidificación (23 días) hasta llegar a la estabilización y el aumento constate de la actividad sulfato-reductora se calcula que el cambio poblacional podría haberse conseguido en 94 días. Lo anterior concuerda con la observación realizada por Espinosa-Chávez (2007), en la que se menciona que pese a todas las estrategias utilizadas para transformar un lodo metanogénico en sulfato-reductor; el tiempo requerido no fue menor a 100 días. Además, se encontró que en el estudio de Celis-García (2004), fue utilizada una estrategia de adaptación a condiciones sulfato-reductoras similar a la de este estudio. En donde también se presentó una falla en el proceso, sólo que la actividad sulfato-reductora no pudo recuperarse luego de 42 días. Por tal razón, fue preciso aplicar otra estrategia para incrementar la producción de sulfuro. El dominio de las bacterias sulfato-reductoras se consiguió luego de aproximadamente 140 días adicionales.

Por otro lado, el proceso anaerobio logró amortiguar correctamente el pH en el rango de 7.17 ± 1.1 a 7.86 ± 0.29 ; obteniendo relaciones de alcalinidades entre 0.61 ± 0.31 a 0.89 ± 0.03 . La capacidad de amortiguamiento del pH del lodo sulfato-reductor no se vio afectada por la presencia del cobre en concentraciones de 50 a 300 mg Cu^{2+} /L, ni por el bajo pH manejado para su solubilización en el agua residual sintética (4.0-4.5). La acidificación del sistema durante la etapa de adaptación a condiciones sulfato-reductoras probablemente se debió a un largo periodo de inactividad del reactor y a su arranque súbito bajo una elevada velocidad ascensional. Con respecto a esto Omil y *col.*, (1996), mencionaron que los microorganismos sulfato-reductores acetotróficos pueden ser selectivamente lavados del sistema con velocidades ascensionales superiores a 4.5 m/h. También existe la posibilidad que la acidificación se debiera a la acumulación de acetato. A cerca de esto Wu y *col.* (1991), mencionaron que el acetato puede acumularse como consecuencia de su baja velocidad de consumo en comparación con la del etanol.

Una consecuencia del descenso en el pH, es el cambio de la forma molecular del sulfuro. Referente a esto Moosa & Harrison (2006), mencionaron que la forma predominante del sulfuro a pH menores a 6.0 es la no ionizada (H_2S). En este estudio, el estado del sulfuro durante el periodo de acidificación del sistema (pH de 5.02) fue en un 98.4% en la forma de H_2S y su concentración fue de 38.3 mg S^{2-} /L. Tales niveles, aunque bajos, pudieron generar la inhibición; ya que a pH ácidos la toxicidad del sulfuro no ionizado aumenta considerablemente como fue mencionado por O'Flaherty y Colleran (1998). En contra parte, con la máxima concentración obtenida de H_2S de 92.6 mg S^{2-} /L y un pH de 6.74, no se presentó inhibición. En el estudio el nivel máximo de sulfuro disuelto total (SDT) fue de 564 mg S^{2-} /L en donde solamente se formaron 23.4 mg S^{2-} /L de sulfuro no disociado, gracias a que se contó con un pH de 7.98. Mientras que en el trabajo de Sierra-Alvarez y *col.* (2007), utilizando un arreglo experimental similar al de nuestro estudio y un pH en el rango de 7.6 a 8.1 obtuvieron un SDT de 1163.8 mg S^{2-} /L con niveles de H_2S entre 115-354 mg S^{2-} /L. Tales niveles no inhibieron la actividad microbiológica del lodo granular.

En este estudio no se realizaron ensayos de inhibición por sulfuro, pero en otras investigaciones en lodos granulares anaerobios, como la de Visser y *col.* (1996), se han reportado valores de 50% de inhibición de la actividad sulfato-reductora (CI_{50}) de 615 mg S^{2-} /L para el SDT y de 171 mg S^{2-} /L para el H_2S , en un rango de pH de 7.2 a 7.4; para un reactor operado en lote. Mientras que en botellas serológicas se encontraron valores de 521 mg S^{2-} /L para el SDT y de 231 mg S^{2-} /L para el H_2S , bajo un pH de 7.0. Por su parte O'Flaherty y *col.* (1998), obtuvieron en botellas serológicas un 50% de la inhibición del crecimiento de las bacterias bajo concentraciones de 374 mg S^{2-} /L para el SDT y de 196 mg S^{2-} /L para el H_2S , en un valor de pH de 6.8. Por último Kalyuzhnyi y *col.* (1997), demostraron que la inhibición del 100% de la actividad sulfato-reductora (CI_{100}) en un reactor UASB en lote alimentado con etanol, puede ocurrir bajo concentraciones extremas en el rango de 1700-9951 mg S^{2-} /L para el SDT y de 570-610 mg S^{2-} /L para el H_2S . En un intervalo de pH de 7.1 a 8.0.

La investigación de Sierra-Alvarez y *col* (2007), fue la única similar a la nuestra en cuanto a diseño experimental y tipo de reactor. Por tal razón, a continuación se hace una comparación entre ambos arreglos en sus condiciones operacionales y desempeño. En el estudio de Sierra-Alvarez y *col.*, las concentraciones de sulfato y DQO fueron casi el triple y por lo tanto la producción de sulfuro fue muy superior. Sin embargo, las eficiencias de remoción obtenidas en nuestro estudio fueron superiores. Con concentraciones más bajas de sulfato y DQO se consiguió una producción de sulfuro que removió fácilmente $0.3 \text{ g Cu}^{2+} / \text{L}$, pudiendo remover teóricamente hasta $1.12 \text{ g Cu}^{2+} / \text{L}$.

En cuanto a la configuración del equipo, ambos diseños presentan un sistema de separación de sulfuros metálicos. Sin embargo, el nuestro tiene la ventaja en que la Covelita no se adhiere a una matriz y por lo tanto puede ser fácilmente extraíble, facilitando la recuperación del cobre. Otra característica destacable de nuestra investigación, que supera al otro sistema, es la capacidad de tratamiento de un efluente ácido. Lo cual se consiguió, en parte, gracias a la alta tasa de dilución generada por una mayor tasa de recirculación. La principal desventaja que presenta nuestro diseño es que el tiempo de residencia hidráulico (TRH) fue más prolongado, requiriéndose un tiempo de tratamiento del agua residual hasta 3 veces mayor. Por otro lado, en nuestro trabajo utilizamos una fuente de carbono sencilla, mientras que en el otro se utilizaron varias; algunos de los cuales fueron más complejos.

En la Tabla 11, se muestra la comparación entre ambos estudios en la etapa de bioprecipitación para la mayor concentración de cobre alimentada. Debido a que el TRH del estudio de Sierra-Álvarez y *col.*, fue mucho menor al nuestro se requirió calcular las velocidades de carga de DQO, Sulfato, Cobre y la velocidad de producción de Sulfuro para poder hacer una comparación más adecuada en relación al desempeño real del reactor EGSB. El resultado fue que nuestro estudio presentó una mayor capacidad de tratamiento de un efluente ácido alimentado en altas velocidades de carga del ión metálico. Además de alcanzar superiores eficiencias de remoción de la DQO, el sulfato y el mismo metal.

| Tabla 11. Comparación de estudios en reactores de lodos granulares expandidos utilizados para la remoción de metales por sulfato-reducción. | | | | |
|---|--|-----------|--|-----------|
| CARACTERÍSTICAS | Sierra-Alvarez <i>et al.</i> (2007) | | Este Estudio | |
| Volumen/Altura | 2.9 L/1.10 m | | 3.4 L/1.2 m | |
| Sistema de separación de sulfuros metálicos | Cristalizador con arena de cuarzo | | Sedimentador sin materiales de retención | |
| Fuentes de DQO | Etanol Isopropanol PEG Ácido Cítrico | | Etanol | |
| Temperatura | 30°C ±2 | | 35°C ±2 | |
| TRH ^a | 0.35 d ±0.08 | | 0.98 d ±0.04 | |
| TR ^b | 15 | | 51 | |
| pH de influente | MM ^c =ARS ^d | 7.60-8.10 | MM ^c | 5.98-7.03 |
| | | | ARS ^d | 4.00-4.55 |
| pH de efluente | 7.40-8.0 | | 7.24-8.23 | |
| VCO ^e | 9.08 g DQO/Ld ±0.95 | | 1.90 g DQO/Ld ±0.1 | |
| VCS ^f | 14.23 g SO ₄ ²⁻ /Ld ⁱ | | 1.37 g SO ₄ ²⁻ /Ld ±0.06 | |
| VPS ^g | 1.96 g S ²⁻ /Ld ⁱ | | 0.44 g S ²⁻ /Ld ±0.1 | |
| VCM ^h | 0.190 g Cu ²⁺ /Ld ⁱ | | 0.298 g Cu ²⁺ /Ld ±0.01 | |
| Remoción de DQO | 68.6% ±5.0 | | 95.0% ±2.4 | |
| Remoción de SO ₄ ²⁻ | 41.3% ⁱ | | 99.0% ±0.6 | |
| Remoción de Cu ²⁺ | 99.8% ±0.1 | | 99.99% ±0.002 | |
| <i>^atiempo de residencia hidráulica; ^btasa de recirculación; ^cmedio mineral; ^dagua residual sintética; ^evelocidad de carga orgánica; ^fvelocidad de carga de sulfato; ^gvelocidad de producción de sulfuro; ^hvelocidad de carga del ión metálico; ⁱdatos calculados teóricamente en base a las concentraciones y el tiempo de residencia hidráulico del experimento.</i> | | | | |

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

La estrategia de adaptación del lodo anaerobio a condiciones sulfato-reductoras favoreció a las bacterias sulfato-reductoras en el consumo de la fuente de carbono en la competencia con las bacterias metanogénicas.

Las concentraciones de cobre utilizadas en el estudio en continuo de hasta 300 mg Cu²⁺/L, no inhibieron el proceso anaerobio a pesar de los datos arrojados por las pruebas en lote, los cuales indicaron que a concentraciones de 115.2 mg Cu²⁺/L inhiben el 50% de la ASR y que niveles de 200 mg Cu²⁺/L o superiores disminuyen la actividad biológica total. Esto se debió a que la concentración molar de sulfuro fue ampliamente superior a la del cobre, precipitándolo totalmente y reduciendo su toxicidad.

El sistema de separación por sedimentación pudo remover eficazmente el sulfuro metálico formado, impidiendo la dilución del lodo granular anaerobio con el material inerte y evitando la posible inhibición por acumulación en las superficies celulares.

El proceso anaerobio en el reactor EGSB fue capaz de tratar un efluente ácido gracias a la alta tasa de dilución y a la producción de alcalinidad suficiente para amortiguar el pH. Según las pruebas en lote, el lodo granular anaerobio puede amortiguar pH ácidos desde 3.0 y básicos de hasta 8.0 (datos no mostrados).

Las eficiencias de remoción máximas obtenidas en el estudio para la DQO, el SO₄²⁺ y Cu²⁺ fueron de 98, 99 y 100% respectivamente. La cantidad máxima de sulfuro total producida fue de 576 mg S²⁻/L (17.96 mmol S²⁻/L). La concentración de sulfuro

disuelto total (SDT) fue de 564 mg S^{2-} /L (17.6 mmol S^{2-} /L). La mayor concentración alcanzada de sulfuro no-disociado (H_2S) fue de 98 mg S^{2-} /L. No se presentó inhibición por sulfuro bajo estas concentraciones.

Por último, se concluye que el proceso es capaz de remover simultáneamente y casi en su totalidad la materia orgánica, los sulfatos, los iones metálicos y la acidez del efluente sintético. Además, el proceso es apto para el tratamiento de concentraciones de metales pesados divalentes en el rango de 0.05 a 17.6 mmol M^{2+} /L.

5.2. Recomendaciones.

En la remoción de metales de un efluente industrial por el proceso de sulfato-reducción, es recomendable utilizar cargas orgánicas adecuadas para producir cantidades de sulfuro biogénico equimolares o ligeramente superiores a las concentraciones de los metales presentes en el efluente. Con esto se puede economizar en el uso fuentes de DQO o de carbono externas y se puede ahorrar la necesidad de realizar un tratamiento extra para remover el sulfuro excedente.

Por otro lado, si lo que se quiere es remover el sulfato, se deberían utilizar cantidades de la fuente de carbono en relaciones DQO/ SO_4^{2-} de 1.0 o ligeramente superiores para conseguir su completa remoción. Además se puede añadir al proceso una etapa de precipitación con algún metal económico reutilizable.

Se aconseja la utilización de aguas residuales con materia orgánica soluble como fuentes de DQO externas, para reducir gastos de operación.

Por último, es recomendable el monitoreo constante del pH ya que provee un importante indicador del estado de un reactor sulfato-reductor.

ANEXOS

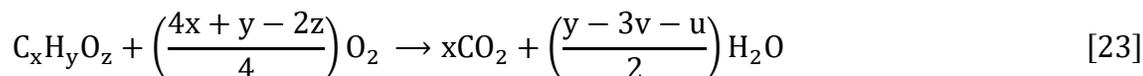
Anexo A. Preparación del Medio Mineral.

| Tabla 12. Componentes del Medio Mineral | | | |
|---|--------|--|--------|
| Macronutrientes | | Elementos Traza | |
| Compuesto | (mg/L) | Compuesto | (mg/L) |
| NH ₄ Cl | 1045 | FeCl ₂ •4H ₂ O | 2000 |
| KCl | 270 | MnCl ₂ •4H ₂ O* | 786 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | EDTA•2H ₂ O* | 554 |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 185 | SeO ₂ * | 64 |
| CaCl ₂ •2H ₂ O | 50 | H ₃ BO ₃ | 50 |
| NaHCO ₃ | 125 | ZnCl ₂ | 50 |
| Extracto de Levadura | 20 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O | 50 |
| Soln. Elementos Traza | 1 mL/L | AlCl ₃ •6H ₂ O* | 91 |
| <i>Ajustar al pH deseado con Bicarbonato de Sodio (NaHCO₃)</i> | | NiCl ₃ * | 30 |
| | | CoCl ₂ •6H ₂ O* | 72 |
| | | HCl Concentrado | 1 mL/L |

Nota: La solución de elementos traza normalmente contiene CuCl₂•2H₂O (50 mg/L), para este experimento fue necesario eliminarlo para evitar interferencias con las pruebas posteriores con cobre. Los compuestos marcados con un asterisco (*) en la solución de elementos traza son diferentes al medio original, pero tienen el balance correcto en su componente principal (Visser, 1995).

Anexo B. Determinación del Equivalente Teórico de la DQO.

Se calculó el equivalente de la DQO para cada uno de los compuestos utilizados como fuente de carbono, como se muestra a continuación, según la reacción estequiométrica de la combustión de compuestos orgánicos “Ec. (23)”, reportada por Kleerebezem & Macarie, (2003).



$$\text{Etanol (C}_2\text{H}_6\text{O); PM} = 46.07 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Usando la ecuación del oxígeno requerido para degradar el compuesto “Ec. (23)” tenemos:

$$DQO_{\text{Etanol}} = \frac{4x + y - 2z}{4} = \frac{4(2) + 1(6) - 2(1)}{4} = 3 \text{ mol } O_2$$

$$3 \text{ mol } O_2 = 96 \text{ g } O_2$$

$$(96 \text{ g } O_2 / 46.07 \text{ g Etanol})(1 \text{ g Etanol}) = 2.084 \text{ g } O_2 / \text{g Etanol} = 2.084 \text{ g DQO} / \text{g Etanol}$$

$$(1 \text{ g Etanol} / 2.084 \text{ g DQO})(1 \text{ g DQO}) = 0.48 \text{ g Etanol} / \text{g DQO}$$

Para calcular la cantidad necesaria de etanol al elaborar los medios minerales se necesitó de su porcentaje de pureza y densidad. Usando la densidad del etanol ($\rho = 0.81 \text{ g/mL}$) y un porcentaje de pureza del 99.97% se tiene lo siguiente:

$$(1.0 \text{ mL Etanol} / 0.81 \text{ g Etanol})(0.48 \text{ g Etanol}) = 0.5926 \text{ mL Etanol}$$

$$(100 \text{ mL Etanol}_i / 99.97 \text{ mL Etanol}_p)(0.5926 \text{ mL Etanol}_{\text{puro}}) = 0.5928 \text{ mL Etanol}_i$$

⇒ Por cada 0.593 mL ó 593 μL de Etanol con 99.97% de pureza se tiene 1 g DQO.

Anexo C. Técnica de Relación de Alcalinidades.

Determinación de la relación de alcalinidad (α).

Tomar 25 mL de muestra y depositarla en un vaso de precipitados de 100 mL. Colocar en agitación constante sobre una placa magnética e inmediatamente medir el pH inicial. Enseguida titular con una solución 0.02N de H₂SO₄ previamente normalizada. Adicionar el ácido lentamente hasta llevar a un pH de 5.75 (promedio al que se titulan el 80% de los carbonatos). Seguir adicionando el ácido hasta llegar a un pH de 4.30 (promedio al

que se titulan los AGV). Registrar los volúmenes de ácido gastados y calcular la relación de alcalinidad en base a la “Ec. (24)” (Standard Methods, 1999).

$$\alpha = \left(V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ pH}_i \rightarrow \text{pH}_{5.75}} / V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ pH}_i \rightarrow \text{pH}_{4.30}} \right) \quad [24]$$

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ pH}_i \rightarrow \text{pH}_{5.75}}$ = Volmen de H_2SO_4 gastado para llevar de pH_0 a $\text{pH}_{5.75}$

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ pH}_0 \rightarrow \text{pH}_{4.30}}$ = Volmen de H_2SO_4 gastado para llevar de pH_0 a $\text{pH}_{4.30}$

Preparación de la solución de H_2SO_4 para determinar alcalinidad.

$$\text{Peq}_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \text{PM}/\# \text{ eq} = (98.08 \text{ g/mol}) / (2 \text{ eq/mol}) = 49.04 \text{ g/eq} \quad [25]$$

$$m_{\text{H}_2\text{SO}_4} = (0.02 \text{ eq/L})(1\text{L})(49.04 \text{ g/eq}) = 0.9808\text{g} \quad [26]$$

$$(1 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 / 1.80 \text{ g H}_2\text{SO}_4)(0.9808 \text{ g H}_2\text{SO}_4) = 0.545 \text{ mL H}_2\text{SO}_4$$

$$\left(\frac{100 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \text{ impuro}}{97.0 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \text{ puro}} \right) (0.545 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \text{ puro}) = 0.562 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \text{ impuro}$$

Tomar 0.562 mL de H_2SO_4 y aforar a 1L con agua destilada.

Normalización de la solución para determinación de alcalinidad.

Secar 1.06g de Na_2CO_3 a 140°C , durante 1h en un horno. Enseguida colocar el carbonato en un desecador con sílica gel y dejar enfriar. Rápidamente disolver 0.1g de Na_2CO_3 en agua destilada y aforar a 100 mL. Repartir la solución en 3 alícuotas de 25 mL, en matraces Erlenmeyer de 50mL. Agregar 1 gota de indicador Naranja de Metilo a cada matraz y colocar en agitación magnética. Valorar con la solución de H_2SO_4 . El volumen gastado de ácido es utilizado para determinar su concentración con la “Ec. (27)”, en base a la concentración y el volumen conocidos de carbonato (Standard Methods, 1999).

$$\text{Peq}_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = \text{PM}/\# \text{ eq} = (106 \text{ g/mol}) / (2 \text{ eq/mol}) = 53 \text{ g/eq} \quad [27]$$

$$N_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = \frac{m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{(P_{\text{eq Na}_2\text{CO}_3})(V_{\text{Na}_2\text{CO}_3})} = \frac{0.1 \text{ g}}{(53 \text{ g/eq})(0.1\text{L})} = 0.01887 \text{ eq/L} \quad [28]$$

$$N_{\text{H}_2\text{SO}_4} = (N_{\text{Na}_2\text{CO}_3})(V_{\text{Na}_2\text{CO}_3})/(V_{\text{H}_2\text{SO}_4}) \quad [29]$$

Anexo D. Técnica de DQO.

Preparación de las Muestras.

Tomar 10mL de muestra del influente con concentración conocida y preparar 2mL de dilución con agua destilada, para una concentración ≤ 0.5 g DQO/L. Colectar 10mL de muestra de efluente y airear durante 15min con una bomba Elite 799 para pecera (Hagen. QC. CAN) para oxidar el sulfuro biogénico. Para determinar la DQO soluble, filtrar 5mL de la muestra de efluente aireado con filtros de jeringa estériles (Millex-GV, 0.22 μ m, PVDF, 33mm, Millipore Corp. MA. USA) o centrifugar a 3000rpm durante 15min y tomar el sobrenadante. Para el DQO total utilizar la muestra sin filtrar. De ser necesario preparar 2mL de dilución de la muestra de efluente. No diluir las muestras cuando la concentración sea ≤ 0.5 g DQO/L.

Determinación de DQO.

Tomar 2mL de las muestras (con o sin dilución) y colocarlas en los tubos hach (HACH Company. Loveland, CO., USA). Enseguida, adicionar lentamente 1mL de solución digestora y 2mL de solución de ácido sulfúrico. Tapar los tubos firmemente y homogenizar suavemente. Finalmente, colocar los tubos en el digestor DRB200: Digital Reactor Block (HACH Co.) durante 2h a 150°C. Transcurrido este tiempo, dejar enfriar las muestras para después leer sus absorbancias a 620_{nm} en un espectrofotómetro. Utilizando celdas de vidrio o cuarzo o directamente los tubos Hach (si se tiene el espectrofotómetro de Hach). Comparar las absorbancias obtenidas contra una curva estándar de DQO (Standard Methods, 1999).

Preparación de reactivos para la determinación de DQO.

Solución Digestora (Solución I).

Pesar 50g de $K_2Cr_2O_7$ y secar en horno durante 2h a $103^\circ C$. Enfriar en desecador con sílica gel y pesar 42.256g. Disolver en un matraz volumétrico de 1L con 500mL de agua destilada. Pesar 33.3g de $HgSO_4$ y disolver en la solución anterior.

Nota: Pesar y secar el dicromato en material de vidrio. Los reactivos deben agregarse con cuidado por partes, evitando que se adhieran a las paredes del matraz. No se disolverán totalmente, se prosigue al siguiente paso.

Colocar el matraz con la solución en un baño de agua con hielo. Adicionar a la solución muy lentamente en pequeños chorros, 167mL de H_2SO_4 puro. Una vez disuelto el ácido, colocar con cuidado un agitador magnético y terminar de disolver los reactivos en una placa de agitación. Una vez disueltos, dejar enfriar en el baño con hielo. Por último dejar al matraz llegar a temperatura ambiente y aforar a 1L.

Solución de Ácido Sulfúrico con Sulfato de Plata (Solución II).

Pesar 5.5g de Ag_2SO_4 por cada kg de H_2SO_4 . Para calcular la cantidad exacta considere la pureza y la densidad del H_2SO_4 .

Para H_2SO_4 al 97%, $\rho = 1.8 \text{ g/mL}$

$$(1.8 \text{ g } H_2SO_4 / 1 \text{ mL } H_2SO_4)(2000 \text{ mL } H_2SO_4) = 3600 \text{ g } H_2SO_4$$

$$(3600 \text{ g } H_2SO_4 / 100\%)(97\%) = 3492 \text{ g } H_2SO_4 = 3.492 \text{ kg } H_2SO_4$$

$$(5.5 \text{ g } Ag_2SO_4 / 1 \text{ kg } H_2SO_4)(3.492 \text{ kg } H_2SO_4) = 19.206 \text{ g } Ag_2SO_4$$

Colocar 2L de H_2SO_4 en un frasco ámbar de 3L y agregar el Ag_2SO_4 en pequeñas porciones, evitando las paredes del recipiente. Una vez depositado todo el reactivo, tapar

y dejar solubilizar en reposo durante 2 o 3 días, en un cuarto temperado a 37°C. Mezclar suavemente cada 24h (Standard Methods, 1999).

Nota: Debido a las proporciones que se utilizan de los reactivos, deberán prepararse dos litros de la solución II por cada litro de solución I. Colocar los reactivos en frascos ámbar con tapa y parte de estos en frascos dispensadores más pequeños, para realizar las determinaciones y evitar la contaminación por pipeteo.

Preparación del estándar de DQO.

Pesar 0.047g de glucosa anhidra y disolverlos en 20mL de agua destilada, en un matraz volumétrico de 50mL y aforar. Realizar una curva estándar de DQO por triplicado con diluciones seriadas del estándar de glucosa, utilizando concentraciones en el rango de 0 a 1000 mg/L. Graficar los datos de la absorbancia contra la concentración como se muestra en la figura 16.

Anexo E. Técnica de Sulfatos.

Preparación de las Muestras.

Colectar rápidamente 10mL de muestra de efluente en un tubo con tapa de rosca y cerrar. Colocar 150µL de solución 2N de acetato de zinc en un tubo de ensayo clínico con tapón de caucho. Tomar 3mL de la muestra y mezclar inmediatamente con la solución de acetato de zinc. Tapar fuertemente y homogenizar en vórtex o manualmente. Dejar sedimentar durante 10 a 20min o centrifugar a 3000rpm durante 5min. Si se dejó sedimentar, tomar el sobrenadante y filtrarlo con unidades de filtración en jeringa estériles Millex-GV, 0.22µm, PVDF, 33mm (Millipore Corp. MA. USA). Si se centrifugó no es necesario filtrar. Para la determinación del SO_4^{2-} en el influente no se dio tratamiento ya que no hay presentes sustancias que causen interferencias.

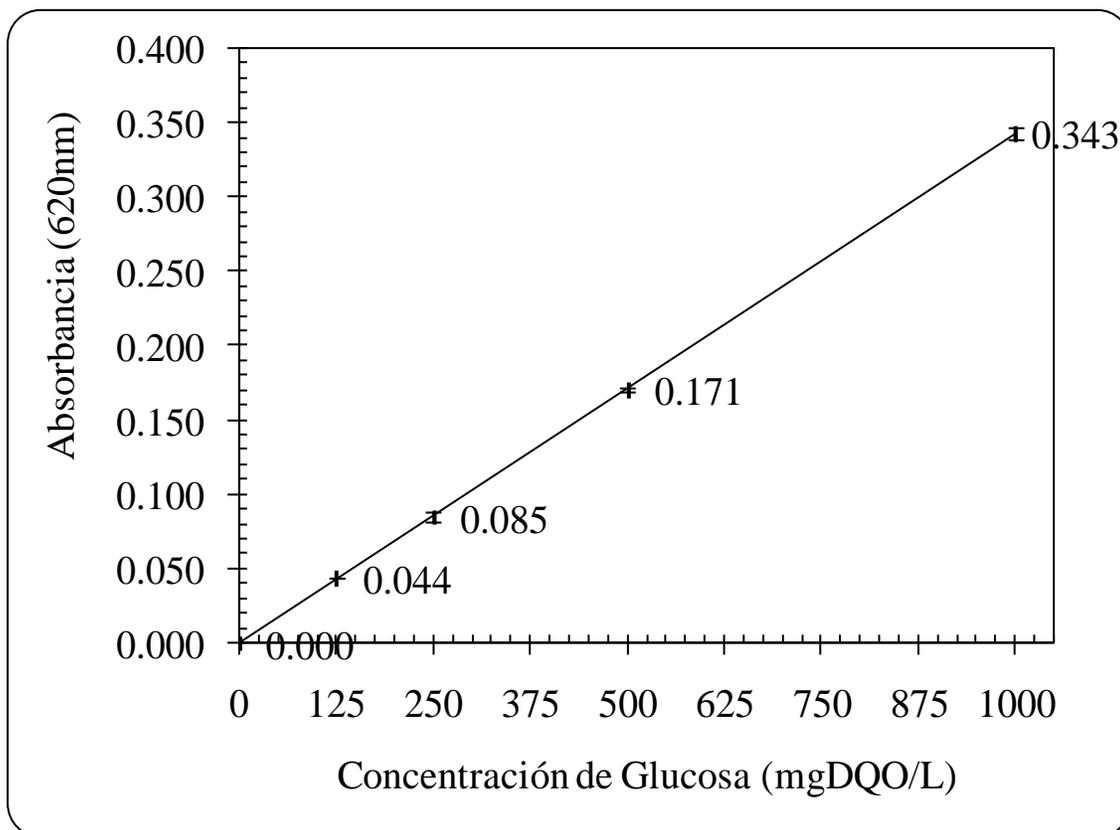


Figura 16. Curva estándar promedio de la DQO.

La relación entre la concentración de DQO y las absorbancias promedio a una longitud de onda de 620nm fue descrita por una ecuación lineal de la forma $y = 0.000343x + 0.000125$; con una $R^2 = 0.999973$. Los valores de la desviación estándar son muy pequeños.

Determinación de sulfatos.

Tomar 2.5mL de la muestra de influente o efluente tratado (con o sin dilución), colocándolas en tubos con tapa. Adicionar 2.5mL del reactivo acondicionador, tapar y mezclar unos segundos. Adicionar 0.1768g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60mg de BaCl_2). Tapar firmemente y mezclar en vórtex a máxima velocidad, durante 30 segundos. Inmediatamente, transferir las mezclas individualmente a una celda de vidrio o cuarzo para su lectura espectrofotométrica. Comparar las absorbancias con una curva estándar de Na_2SO_4 (Kolmert *et al.*, 2000).

Preparación del Reactivo Acondicionador.

Pesar 150g de NaCl y colocarlos en un matraz volumétrico de 1L. Tomar con una probeta de vidrio 100mL de glicerol puro (126g) y adicionarlos a la sal. Medir 200mL de etanol (95%) y lavar con pequeñas porciones la probeta con glicerol. Verter los lavados y el etanol restante en la mezcla de sal-glicerol. Adicionar 300mL de agua deionizada y 60mL de HCl (12.1M). Disolver los componentes y aforar a 1L con agua deionizada (Kolmert *et al.*, 2000).

Preparación de Estándar de Sulfato 1000 mg SO_4^{2-} /L.

Pesar 0.1478g de Na_2SO_4 y colocarlos en matraz volumétrico de 100mL. Adicionar 50mL de agua deionizada, disolver y aforar a 100mL. A partir del estándar realizar una curva de Na_2SO_4 por triplicado con diluciones seriadas, utilizando concentraciones en el rango de 0 a 600 mg SO_4^{2-} /L. Graficar los datos de la absorbancia contra la concentración como se muestra en la Figura 17.

Anexo F. Técnica de Sulfuros.

Tratamiento de la Muestra.

Colocar una gota de NaOH (6N) en un tubo de 2cm de diámetro con tapa y coleccionar rápidamente 10mL de muestra en el mismo tubo. Cerrar firmemente y mezclar por inversión.

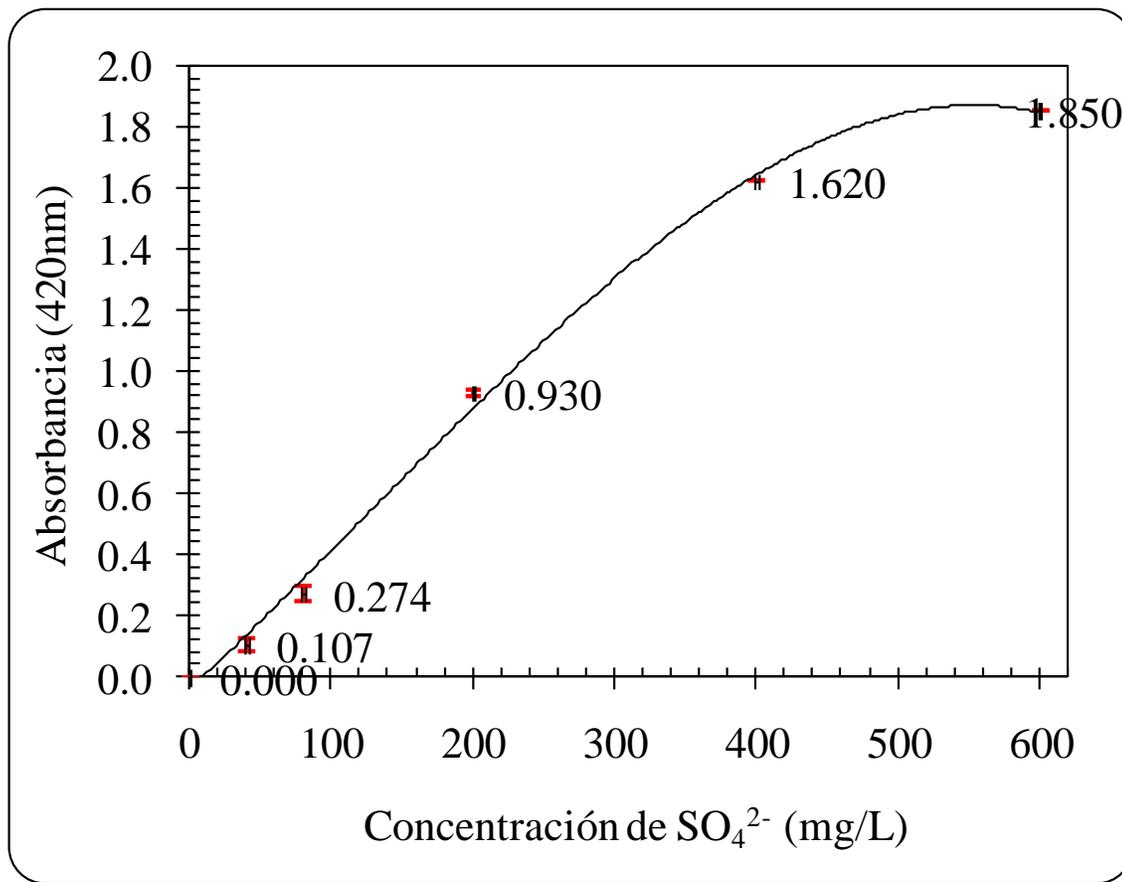


Figura 17. Curva estándar promedio de sulfato.

La relación entre la concentración de sulfato y las absorbancias promedio a una longitud de onda de 420nm fue descrita por una ecuación polinomial de 3^{er} orden de la forma $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$. Los valores de los coeficientes fueron: $y = -8.491\text{E}^{-09}x^3 + 3.196\text{E}^{-06}x^2 + 4.281\text{E}^{-03}x - 3.916\text{E}^{-02}$, con un valor de $R^2 = 0.9976$. Se observa una desviación estándar muy pequeña.

Inmediatamente aspirar 3mL de muestra con una jeringa y filtrar con unidades de filtración Millex. Colocar el filtrado en un tubo clínico, tapar e inmediatamente proceder a la determinación. Para conservar la muestra, adicionar 350 μ L de acetato de zinc 2N a 7mL de la muestra, cerrar el tubo rápidamente y mezclar por inversión. Dejar sedimentar por 10 minutos. Para la determinación se deben remover 350 μ L del sobrenadante y reemplazar con la misma cantidad de HCl 4M. Cerrar el tubo nuevamente y mezclar vigorosamente durante 1 a 2 min o hasta la disolución total del sulfuro. Enseguida se procede a la determinación.

Determinación de sulfuro.

Tomar rápidamente 125 μ L de la muestra y mezclar con 5mL del reactivo de cobre en un tubo con tapa. Cerrar el tubo inmediatamente y mezclar en vórtex a máxima velocidad por 5 segundos. Traspasar el contenido a una celda y leer a 480_{nm} y comparar las absorbancias con una curva patrón de sulfuro de sodio (Cord-Ruwisch, 1985).

Preparación del Reactivo de cobre 5mM de CuSO₄ y 50mM de HCl.

Pesar 0.798g de CuSO₄ anhidro y disolverlos en 500mL de agua deionizada. Adicionar 4.153mL de HCl (37.2%), mezclar y aforar a 1L.

Preparación del Reactivo de HCl 4M.

Diluir 33.22mL de HCL (37.2%) en 50mL de agua destilada y aforar a 100mL.

Preparación del Acetato de zinc 2 N.

Pesar 22g de Zn(C₂H₃O₂).2H₂O y deposítelos en un matraz volumétrico de 100mL. Disolver en 50mL de agua destilada y aforar a un litro.

Preparación del NaOH (6N).

Pesar 12g de NaOH y colocarlos en un matraz volumétrico de 50mL. Disolver con 20mL de agua deionizada previamente hervida y aforar a 50mL.

Preparación del Estándar de sulfuro 1000 mg/L de Na₂S*9H₂O (98%).

Hervir 300mL de agua deionizada por 5min y enfriar rápidamente con hielo. Evite la agitación y el contacto del agua con el aire. Disolver 0.1031g de NaOH (0.05M) en el agua deionizada hervida y aforar a 50mL. Pesar 0.7643g de Na₂S*9H₂O como se explica a continuación. No use espátulas de metal. Tomar cristales individuales y rápidamente colocarlos en un matraz de 100mL previamente tarado, conteniendo 10mL de la solución de NaOH y pesar por diferencia. Repetir hasta obtener el peso exacto. Agregar la solución de NaOH restante, tapar el matraz y disolver mezclando suavemente. Aforar a 100mL con el agua deionizada hervida. Colocar en un recipiente cerrado herméticamente. Valorar el estándar por el método yodimétrico de Day & Underwood, 1989 (Datos no mostrados). Prepare una curva por triplicado con diluciones seriadas, utilizando concentraciones en el rango de 0 a 1000 mg SO₄²⁻/L. Graficar los datos de la absorbancia contra la concentración como se muestra en la Figura 18.

Anexo G. Estimación de la Especiación del Sulfuro.

La concentración de sulfuro en el gas se calculó utilizando la ley de Henry de la siguiente forma (Celis-García, 2004 y Villa-Gómez, 2006):

$$H_2S_{gas} \leftrightarrow H_2S_{liq} \quad \alpha = \frac{[H_2S]_{liq}}{[H_2S]_{gas}} \quad \Rightarrow \quad [H_2S]_{gas} = \frac{[H_2S]_{liq}}{\alpha} \quad [30]$$

$$H_2S_{liq} \leftrightarrow HS^- + H^+ \quad K_{H_2S} = \frac{[HS^-][H^+]}{[H_2S]_{liq}} \quad [31]$$

$$SDT = [H_2S]_{liq} + [HS^-] \quad \Rightarrow \quad [HS^-] = SDT - [H_2S]_{liq} \quad [32]$$

SDT = Sulfuro Disuelto Total

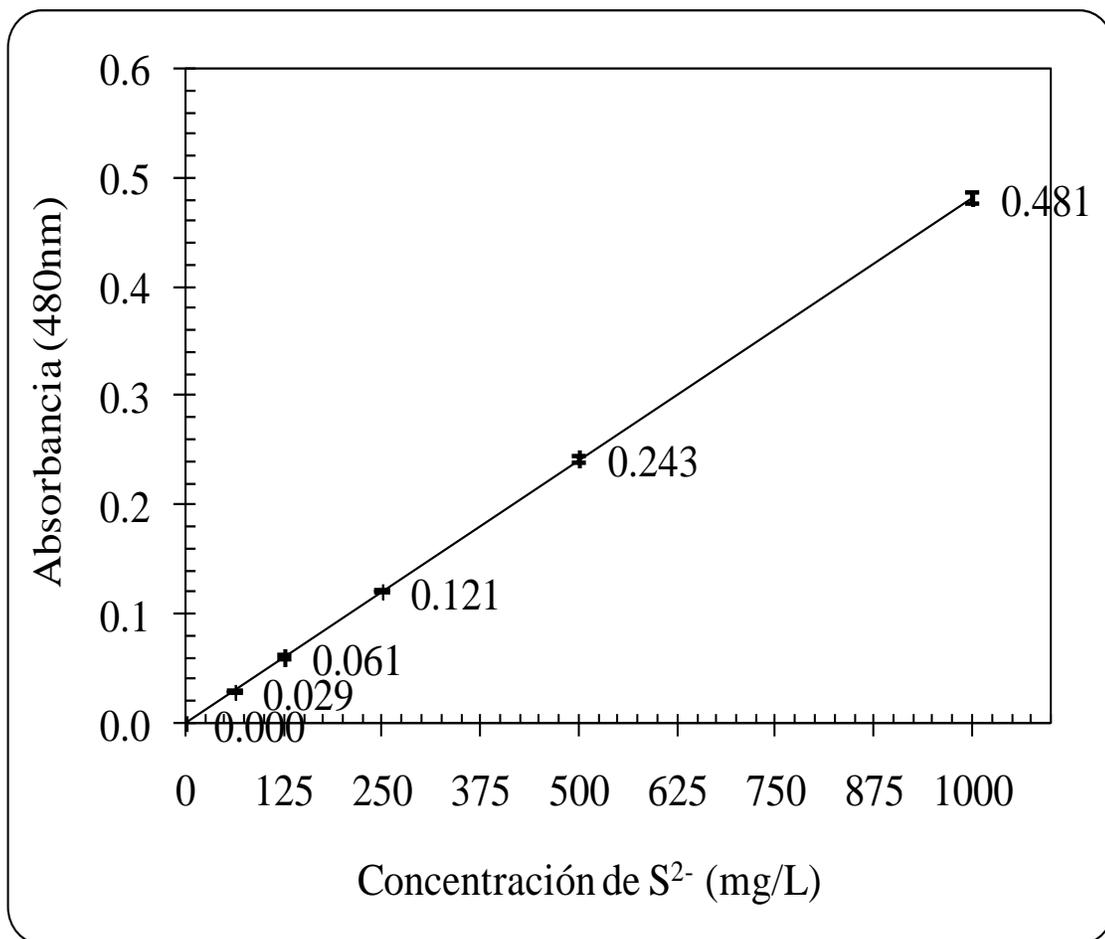


Figura 18. Curva estándar promedio de sulfuros.

Se obtuvo una $R^2 = 0.99997$. Se puede observar la desviación estándar. La concentración se obtiene con la siguiente ecuación proveniente de la ecuación lineal $y = 0.00048x - 0.00004$.

Combinando (31) y (32) se tiene (33):

$$[H_2S]_{liq} = \left[\left(1 + \frac{K_{H_2S}}{[H^+]} \right)^{-1} SDT \right] = \left[(1 + K_{H_2S} 10^{pH})^{-1} SDT \right] \quad [33]$$

Combinando (30) y (33) se obtiene (34):

$$[H_2S]_{gas} = \left(\frac{f}{\alpha} \right) (SDT) \quad [34]$$

Donde:

f = Fracción de sulfuro disuelto no ionizado en el SDT

T = Temperatura en grados celcius ($^{\circ}C$)

$$K_{H_2S} = [0.382(T) + 1.892] 10^{-8} \quad [35]$$

$$f = (1 + K_{H_2S} 10^{pH})^{-1} \quad [36]$$

$$\alpha = 3.442 - 0.044(T) \quad [37]$$

Anexo H. Determinación de Cobre.

Previamente al tratamiento de las muestras, lavar todo el material de vidrio y plástico con NaHClO al 2% y detergente neutro líquido. Enjuagar con agua potable. Colocar durante 2h en una solución de HNO₃ al 3.5% en agua deionizada. Enjuagar con agua deionizada. Secar el material de vidrio en un horno de laboratorio Econotherm modelo 1025/6530 (Thermo Scientific. OH. USA) a 100 $^{\circ}C$ y el de plástico a 50 $^{\circ}C$. Dejar enfriar el material y utilizarlo para las determinaciones de cobre.

Para la determinación de cobre coleccionar aproximadamente 40mL de muestra del efluente en una probeta de 100mL. Airear las muestras durante 1h con una bomba Elite 799 y filtrarlas con fibra de vidrio Whatman GF/C. Tomar 29.4mL de muestra del filtrado y adicionarle 0.6mL de HNO₃ para una concentración de HNO₃ al 2%. Las

concentraciones del influente son conocidas, por lo que deben ser diluidas con agua deionizada a 1 mg/L, aproximadamente, adicionándolas con suficiente HNO₃ para dar una concentración de 2%. Conservar ambas muestras en botellas de plástico opaco de 30mL con tapa, para su posterior determinación de cobre. Las concentraciones de cobre (Cu²⁺) en las muestras de influente y efluente se determinaran multiplicando el valor de absorbancia dado por el equipo de EAA para cada muestra por su factor de dilución. Los resultados se expresan en mg/L.

BIBLIOGRAFÍA

- Almendáriz-Tapia F.J. (2005). Tratamiento de sosas gastadas en un reactor de lecho expandido de lodos granulares anaerobios (EGSB). Tesis de Doctorado en Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. *Universidad Autónoma Metropolitana*, Unidad Iztapalapa. 98p.
- Altaş L. (2008). Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. *Journal of Hazardous Materials*. Article in press. 6p. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.048.
- Alvarez M.T., Crespo C. & Mattiasson B. (2007). Precipitation of Zn(II), Cu(II) and Pb(II) at bench-scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids. *Chemosphere*. 66(9), pp. 1677-1683.
- Badmus M.A.O., Audu T.O.K. & Anyata B.U. (2007). Removal of heavy metal from industrial wastewater using hydrogen peroxide. *African Journal of Biotechnology*. 6(3), pp. 238-242.
- Barnes L.J., Shereen J., Janssen F.G., Scheeren P.J.H., Versteegh J.H. & Koch R.O. (1991). Simultaneous microbial metal removal of sulphate and heavy metals from wastewater. In *Non-Ferrous Metallurgy-Present and Future: Proceedings of EMC'91 Conference*, Belgium. pp. 391-401.

- Baskaran V.K. (2005). Kinetics of anaerobic sulphate reduction in immobilised cell bioreactors. Thesis of degree of master of sciences. College of graduate studies and research. Department of chemical engineering. *University of Saskatchewan*, Saskatoon, SK, Canada. 148p.
- Bhagat M., Burgess J.E., Antunes A.P.M., Whiteley C.G. & Duncan J.R. (2004). Precipitation of mixed metal residues from wastewater utilising biogenic sulphide. *Minerals Engineering*. 17(7-8), pp. 925-932.
- Bijmans M.F.M. (2008). Sulfate reduction under acidic conditions for selective metal recovery. Ph.D. Thesis. *Wageningen University*, Wageningen, The Netherlands. 156p.
- Bina B., Kermani M., Movahedian H. & Khazaei Z. (2006). Biosorption and recovery of copper and zinc from aqueous solutions by nonliving biomass of marine brown algae of *Sargassum* sp. *Pak. J. Biol. Sci.*, 9(8), pp. 1525-1530.
- Bridge T.A.M., White C. & Gadd G.M. (1999). Extracellular metal-binding activity of the sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus multivorans*. Sulphate-reducing bacterial metal-binding compound. *Microbiology*. (145), pp. 2987–2995.
- Briones-Méndez R., Aguilar-López G. & Kuppusamy-Ammal I. (2002). Biodegradacion de un efluente textil mediante un reactor anaerobio tipo EGSB. *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS*. Cancún, México, 27 al 31 de octubre, 2002. 8p.
- Carrillo-Moreno J.L. (1986). Estudio técnico-económico para el control de contaminación de la cuenca del Río San Pedro con aguas industriales de la compañía minera de Cananea. Tesis de Licenciatura de Ingeniería Civil. Departamento de Ingeniería Civil. *Universidad de Sonora*. 130p.
- Celis-García M.L.B. (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis de Doctorado en Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. *Universidad Autonoma Metropolitana*. Iztapalapa. México, D.F. 123p.
- Certucha-Barragán M.T., Acedo-Félix E., Monge-Amaya O., Valenzuela-García J.L., Almendáriz-Tapia F.J. & Leal-Cruz A.L. (2009). Copper bioaccumulation in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Chemical Speciation and Bioavailability*. 21(3), pp. 161-164.

- Chen B.Y., Utgikar V.P., Harmon S.M., Tabak H.H., Bishop D.F. & Govind R. (2000). Studies on biosorption of zinc(II) and copper (II) on *Desulfovibrio desulfuricans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* (46), pp. 11-18.
- Chen C., Ren N., Wang A., Yu Z. & Lee D-J. (2008). Microbial community of granules in expanded granular sludge bed reactor for simultaneous biological removal of sulfate, nitrate and lactate. *Environmental Biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (79), pp. 1071-1077.
- Choi E. & Rim J.M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water. Sci. Technol.* (23), pp. 1259-64.
- Christensen B., Laake M. & Lien T. (1996). Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria: Results from a bench scale experiment. *Water Res.* (30), pp. 1617-1624.
- Colleran E., Finnegan S. & Lens P. (1995). Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie Leeuwenhoek.* 67(1), pp. 29-46.
- Colussi I., Cortesi A., Della-Vedova L., Gallo V. & Cano-Robles F.K. (2009). Start-up procedures and analysis of heavy metals inhibition on methanogenic activity in EGSB reactor. *Bioresource Technology.* (100), pp. 6290-6294.
- Cord-Ruwisch R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods.* (4), pp. 33-36.
- Day R.A. & Underwood A.L. (1989). Aplicaciones de las titulaciones de oxidación-reducción. En: Química analítica cuantitativa. 5ª ed. Ed. *Prentice-Hall Hispanoamericana*. México. pp. 359-365.
- De Lima A.C.F., Gonçalves M.M.M., Granato M. & Leite S.G.F. (2001). Anaerobic sulphate-reducing microbial process using UASB reactor for heavy metals decontamination. *Environmental Technology.* (22), pp. 261-270.
- De Smul A. & Verstraete W. (1999). Retention of sulfate-reducing bacteria in expanded granular-sludge-blanket reactors. *Water Environ. Res.* 71(4), pp. 427-431.

- De Smul A., Goethals L. & Verstraete W. (1999). Effect of COD to sulphate ratio and temperature in expanded-granular-sludge-blanket reactors for sulphate reduction. *Process Biochemistry*. 34(4), pp. 407-416.
- Diels L., van der Lelie D., Gemoets J., Springael D., Geets J., Vos J. & Bastiaens L. (2001). In situ bioprecipitation of heavy metals in groundwater. In *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development*; Ciminelli, V. S. T.; Garcia Jr., O., Eds.; Process Metallurgy Series; Elsevier Science: New York, volume 11B, pp 503-511.
- Dries J., de Smul A., Goethals L., Grootaerd H. & Verstraete W. (1998). High rate biological treatment of sulphate-rich wastewater in an acetate fed EGSB-reactor. *Biodegradation*. 9(2), pp. 103-111.
- Drury W.J. (1999). Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid-substrate reactors. *Water. Environment. Research*. 71(6), pp. 1244-1250.
- Duarte-Rodríguez G.R. (2009). Bioadsorción y bioacumulación de cobre utilizando lodos anaeróbicos metanogénicos. Tesis de Licenciatura de Ingeniería Química. División de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Metalúrgica. *Universidad de Sonora*. Hermosillo, Sonora, México. 51p.
- Ertugay N. & Bayhan Y.K. (2008). Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by biomass of *Agaricus bisporus*. *Journal of Hazardous Materials*. 154(1-3), pp. 432-439.
- Espinosa-Chávez B. (2007). Evaluación del desarrollo de la actividad sulfatorreductora en un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños. Tesis de maestría en ciencias aplicadas. División de ciencias ambientales. *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.* San Luis Potosí, S.L.P. 101p.
- Esposito G., Veeken A., Weijma J. & Lens P.N.L. (2006) Effect of the use of biogenic sulphide on ZnS precipitation under different process conditions. *Sep. Purif. Technol.* (51), pp. 31-39.
- Gaszo L. (2001). Removal of toxic metals and radionuclides from the environment: Complexation. *Environment Protection and Biotechnology (EPBT): Innovative Aspects*. Vocational Training In Biotechnology Innovation And Environment

- Protection. National Bank For Industrial Microorganisms And Cell Cultures. Editor-in-chief: Anna Kujumdzieva. The Sofia University, Sofia, Bulgaria. *BioINEP Published Series*. pp. 36-44.
- Glombitza F. (2001) Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction. *Waste Management*. (21), pp. 197-203.
- Gómez-Álvarez A. (2001). Evaluación de la calidad física y química del agua y sedimento del Río San Pedro, Sonora, México, durante el período 1997-1999. Tesis de maestría en ciencias de la ingeniería. Departamento de Ingeniería química y metalurgia. *Universidad de Sonora*, Mexico. 238p.
- Gómez-Álvarez A., Villalba-Atondo A., Acosta-Ruíz G., Castañeda-Olivares M. & Kamp D. (2004). Metales pesados en el agua superficial del río San Pedro durante 1997 y 1999. Universidad Nacional Autónoma de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 20(1), pp.1-8.
- González-Silva B.M. (2007). Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor. Tesis de maestría en ciencias aplicadas. División de ciencias ambientales. *Instituto Potosino De Investigación Científica Y Tecnológica, A.C.* San Luis Potosí, S.L.P. 61p.
- Gramp J.P., Sasaki K., Bigham J.M., Karnachuk O.V. & Tuovinen O.H. (2006). Formation of covellite (CuS) under biological sulfate-reducing conditions. *Geomicrobiology Journal*. (23), pp. 613-619.
- 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), pp. 781-793.
- Hao O.J., Chen J.M., Huang L. & Buglass R.L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* (26), pp. 155-187.
- Harada H., Uemura S. & Momonoi K., (1994). Interaction between sulfate reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Wat. Res.* (28), pp. 355-367.

- Hulshoff-Pol L.W., Lens P., Stams A.J.M. & Lettinga G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewater: microbial and process technological aspects. *Biodegradation*. (9), pp. 213-224.
- Isaksen M.F. & Jørgensen B.B. (1996). Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate- Reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(2), pp. 408-414.
- Jenkins S.R., Morgan J.M. & Sawyer C.L (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *J. Water. Pollut. Control Fed.* 55(5), pp. 448-453.
- Jong T. & Parry D.L. (2004). Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), and As(V) on bacterially produced metal sulfides. *Journal of Colloid and Interface Science*. (275), pp. 61-71.
- Jong T. & Parry D.L. (2005). Evaluation of the stability of arsenic immobilized by microbial sulfate reduction using TCLP extractions and long-term leaching techniques. *Chemosphere*. 60(2), pp. 254-265.
- Kaksonen A.H., Riekkola-Vanhanen M.L. & Puhakka J.A. (2003). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Research*. 37(2), pp. 255-266.
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D. & Puhakka, J.A. (2004). Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 86(3), pp. 332-343.
- Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Riekkola-Vanhanen M., Franzmann P.D. & Puhakka J.A. (2006). The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Hydrometallurgy*. 83(1-4), pp. 204-213.
- Kaksonen A.H. & Puhakka J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. Review. *Eng. Life Sci.* 7(6), pp. 541-564.

- Kalyuzhnyi D.V., Fragoso L.C. & Martinez R.J. (1997). Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with ethanol as the electron donor. *Microbiology*. (66), pp. 674-680.
- Karri S., Sierra-Alvarez R. & Field J.A. (2006). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. Short Communication. *Chemosphere*. 62(1), pp. 121-127.
- Kleerebezem R. & Macarie H. (2003). Treating industrial wastewater anaerobic digestion: Comes of age. *Chem. Eng.* 110(4), pp. 56-64.
- Kolmert Å., Wikström P. & Hallberg K.B. (2000). A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods*. 41(3), pp. 179-184.
- Kolmert A. & Johnson D.B. (2001). Remediation of acidic wastewaters using immobilized, acidophilic sulfate-reducing bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (76), pp. 836-843.
- Koster I.W., Rinzema A., de Vegt A.L. & Lettinga G. (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. *Wat Res.* 20(12), pp. 1561-1567.
- La H-J., Kim K-H., Quan Z-X., Cho Y-G. & Lee S-T. (2003). Enhancement of sulfate reduction activity using granular sludge in anaerobic treatment of acid mine drainage. *Biotechnology Letters*. (25), pp. 503-508.
- 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(1), pp. 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.
- Lens P.N.L. & Kuenen J.G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*. 44(8), pp. 57-66.
- Lens P.N.L., Meulepas R.J.W., Sampaio R., Vallero M. & Esposito G. (2008). Microbial sulfur metabolism. En: *Bioprocess engineering of sulfate reduction for environmental*

- technology*. Chapter 22. Christiane Dahl & Cornelius G. Friedrich (Editors). *Springer-Verlag*. Berlin Heidelberg, New York. ISBN-13 978-3-540-72679-1. pp. 285-295.
- Lettinga G., van Velsen A.F.M., Hobma S.W., Zeeuw W. & Klapwijk A. (1980). Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* (22), pp. 699-734.
- Lettinga G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek.* (67), pp. 3-28.
- Lettinga G. (2001). Digestion and degradation, air for life. *Water Science and Technology.* 44(8), pp. 157-176.
- Liamleam W. & Annachatre A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. Research review paper. *Biotechnology Advances.* 25(5), pp. 452-463.
- Lopes S.I.C. (2007) Sulfate reduction at low pH in organic wastewaters. Doctoral Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. ISBN: 978-90-8504-763-6. 248p.
- Marques P.A.S.S., Rosa M.F. & Pinheiro H.M. (2000). pH effects on the removal of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} from aqueous solution by waste brewery biomass. *Bioprocess Engineering.* 23(2), pp. 135-141.
- McMahon M.J.L. (2007). Development of a sulfate reducing packed bed bioreactor for use in a sustainable hydrogen production process. Thesis for the degree of Master of Science (Engineering). Department of Chemical Engineering. *Queen's University*. Kingston, Ontario, Canada. 164p.
- Moosa S. & Harrison S.T.L. (2006). Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for treatment of acid mine drainage. *Hydrometallurgy.* (86), pp. 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), pp. 534-543.
- Neculita C-M., Zagury G.J. & Bussière B. (2007). Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *J. Environ. Qual.* (36), pp. 1-16.

- O'Flaherty V. & Colleran E. (1998). Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: process disturbance and remediation. *Bioresource Technology*. (68), pp. 101-107.
- O'Flaherty V., Mahony T., O'Kennedy R. & Colleran E. (1998). Effect of pH on growth kinetics and sulfide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulfate-reducing bacteria. *Process. Biochem.* 33(5), pp. 555-569.
- Okabe S., Nielsen P.H., Jones W.L. & Characklis W.G. (1995). Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Res.* (29), pp. 571-578.
- Omil F., Lens P., Hulshoff-Pol L. & Lettinga G. (1996). Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* (31), pp. 699-710.
- Omil F., Lens P., Hulshoff-Pol L.W. & Lettinga G. (1997a). Characterization of biomass from a sulfidogenic, volatile fatty acid-degrading granular sludge reactor. *Enzyme Microb. Technol.* (20), pp. 229-236.
- Omil F., Visser A., Hulshoff-Pol L. & Lettinga G. (1997b). Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido en sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares. *Revista Afinidad*, Tomo LIV, 471.
- Omil F., Oude-Elferink S.J.W.H., Lens P., Hulshoff-Pol L. & Lettinga G. (1997c). Effect of the inoculation with *Desulforhabdus amnigenus* and pH or O₂ shocks on the competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in an acetate fed UASB reactor. *Bioresource Technol.* (60), pp. 113-122.
- Omil F., Bakker C.D., Hulshoff-Pol L.W. & Lettinga G. (1997d). Effect of pH and low temperature shocks on the competition between sulphate reducing bacteria and methane producing bacteria in UASB reactors. *Environ. Technol.* (18), pp. 255-264.
- 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. *Biotech. Bioeng.* (57), pp. 676-685.
- Omil F., Garrido J.M., Arrojo B. & Méndez R. (2003). Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. *Water Research*. (37), pp. 4099-4108.

- O'Reilly C. & Colleran E. (2006). Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on mesophilic anaerobic reactor biomass populations: physico-chemical and microbiological properties. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56(1), pp. 141-153.
- Orellana-Jaramillo D.A. (2009). Precipitación de metales pesados provenientes de un efluente de una planta de beneficio, del Rio Guanache y del Rio Siete del Distrito Minero Bella Rica utilizando un consorcio de bacterias sulfato-reductoras del mismo Distrito. Tesis de Grado. Universidad Técnica Particular de Loja. 56p.
- Oude-Elferink S.J.W.H., Visser A., Hulshoff-Pol L.W. & Stams A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS. Microbiol. Rev.* (15), pp. 119-136.
- Parawira W. (2004). Anaerobic treatment of agricultural residues and wastewater: Application of high-rate reactors. Doctoral dissertation. Department of Biotechnology. Faculty of Engineering. *Lund University*. Sweden. ISBN: 91-89627-28-8. 53p.
- Patidar S.K. & Tare V. (2005). Anaerobic degradation of sulfate laden organics employing different reactor system configurations. *J. Environ. Eng.* 131(2), pp. 216-224.
- Picavet M., Dijkman H. & Buisman C. (2003). Development of a novel efficient bioreactor for sulphate reduction. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2(2), pp. 297-302.
- Pizarro-Torres C., Larenas-Ramírez M., Guerrero-Saldes L., Jeison-Núñez D. & Chamy-M R. (2002). Evaluación de reactores anaeróbicos granulares en la remoción conjunta de materia orgánica y sulfatos. <http://www.bvsde.paho.org/bvsAIDIS/PuertoRico29/vivan.pdf>
- Postgate J.R. (1984). The sulphate-reducing bacteria. London: Cambridge University Press.
- Rebac S., Visser A., Gerbens S., van-Lier J.B., Stams A.J.M. & Lettinga G. (1996) The effect of sulphate on propionate and butyrate degradation in a psychrophilic anaerobic expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Environ. Technol.* (17), pp. 997-1005.
- Rebac S., Van Lier J.B., Lens P., van Cappellen J., Vermeulen M., Stams A.J.M., Dekkers F., Swinkels K.T.M. & Lettinga G. (1998). Psychrophilic (6-15°C) high-rate anaerobic treatment of malting wastewater in a tw-module expanded granular sludge bed system. *Biotechnol. Progr.* 14(6), pp. 856-864.

- Rintala J. & Lettinga G. (1992). Effects of temperature elevation from 37 to 55°C on anaerobic treatment of sulfate rich acidified wastewaters. *Environ. Technol.* (43), pp. 249-258.
- Rinzema A. & Lettinga G. (1988). Anaerobic treatment of sulphate-containing wastewater. En: *Biotreatment Systems*. (D.L. Wise, Ed.) *CRC Press*, Boca Ratón. (3), pp. 65-109.
- Rittman B.E. & McCarty P.L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. *McGraw Hill Inc.* New York.
- Rojas-CH O. (1987). Relación alcalinidad-ácidos grasos volátiles. Arranque y Operación de Sistemas de Flujo Ascendente con Manto de Lodo - UASB - Manual del Curso. Universidad del Valle, Colombia; Corporación Autónoma Regional del Cauca; Universidad Agrícola de Wageningen. pp.1-31.
- Romero-Aguilar M., Colín-Cruz A., Sánchez-Salinas E. & Ortiz-Hernández M.L. (2009). Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: evaluación de la remoción de la carga orgánica. Universidad Autónoma del Estado de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(3), pp. 157-167.
- Sahinkaya E., Özkaya B., Kaksonen A.H. & Puhakka J.A. (2007). Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* (96), pp. 1064-1072.
- Sampaio R.M.M., Timmers R.A., Xu Y., Keesman K.J. & Lens P.N.L. (2009). Selective precipitation of Cu from Zn in a pS controlled continuously stirred tank reactor. *Journal of Hazardous Materials.* 165(1-3), pp. 256-265.
- 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), pp. 4765-4772.
- Seghezzi L., Zeeman G., van-Lier J.B., Hamelers H.V.M. & Lettinga G. (1998). A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology.* (65), pp. 175-190.
- Shayegan J., Ghavipanjeh F., Mirjafari P. (2005). The effect of influent COD and upward flow velocity on the behavior of sulphate-reducing bacteria. *Process Biochem.* (40), pp. 2305-2310.

- Sierra-Alvarez R., Karri S., Freeman S. & Field J.A. (2006). Biological treatment of heavy metals in acid mine drainage using sulfate reducing bioreactors. *Water Science & Technology*. 54(2), pp. 179-185.
- Sierra-Alvarez R., Hollngsworth J. & Zhou M.S. (2007). Removal of copper in an integrated sulfate reducing birreactor-crystallization reactor system. *Environ. Sci. Technol.*, 41(4), pp. 1426-1431.
- Sirianuntapiboon S., Chairattanawan K. & Rarunroeng M. (2008). Biological removal of cyanide compounds from electroplating wastewater (EPWW) by sequencing batch reactor (SBR) system. *Journal of Hazardous Materials*. 154(1-3), pp. 526-534.
- Song Y-C., Piak B-C., Shin H-S. & La S-J. (1998). Influence of electron donor and toxic materials on the activity of sulfate reducing bacteria for the treatment of electroplating wastewater. *Water Science and Technology*. 38(4-5), pp. 187-194.
- Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters. (1999). 20th ed. Clescerl L, Greenberg A, Eaton A. (eds.). Ed. *American Public Health Association (APHA)*. Washington DC, USA; 1325 p.
- Tomko J., Bačkor M. & Štofko M. (2006). Biosorption of heavy metals by dry fungi biomass. *Acta Metallurgica Slovaca*. (12), pp. 447-451.
- Tuppurainen K.O., Väisänen A.O. & Rintala J.A. (2002). Zinc removal in anaerobic sulphate-reducing liquid substrate process. *Minerals Engineering*. 15(11), pp. 847-852.
- Utgikar V.P., Chen B.Y., Chaudhary N., Tabak H.H., Haines J.R. & Govind R. (2001). Acute toxicity of heavy metals to acetate-utilizing mixed cultures of sulfatereducing bacteria: EC100 and EC50. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(12), pp. 2662-2669.
- 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), pp. 3652-3658.
- Valdés F., Muñoz E., Chamy R., Ruiz G., Vergara C. & Jeison D. (2006). Effect of sulphate concentration and sulphide desorption on the combined removal of organic matter and sulphate from wastewaters using expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(4), pp. 370-378.

- Van Lier J.B., Tilche A., Ahring B.K., Macarie H., Moletta R., Dohanyos M. & Hulshoff-Pol L.W. (2001a). New perspectives in anaerobic digestion. *Wat. Sci. Technol.* 43(1), pp. 1-18.
- Van Lier J.B., Van Der Zee F.P., Tan N.C.G., Rebac S. & Kleerebezem R. (2001b). Advances in high rate anaerobic treatment: staging of reactor systems. *Wat. Sci. Technol.* (44), pp. 15-25.
- Velasco A., Ramírez M., Volke-Sepúlveda T., González-Sánchez A. & Revah S. (2007). Evaluation of COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological sulfide production and lead precipitation. Manuscript draft in review. *Journal of Hazardous Materials.* 24 p.
- Villa-Gómez D.K. (2006). Arranque de un reactor de lecho fluidicado inverso (LFI) para la producción biológica de H₂S. Tesis de Maestría. División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales. *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.* 91p.
- Visser A., Beeksmá I., Van der Zee F., Stams A.J.M. & Lettinga G. (1993a). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Applied. Microbiol. Biotechnol.* (40), pp. 549-556.
- Visser A., Alpheenar P.A., Gao Y., van Rossum G. & Lettinga G. (1993b). Granulation and immobilization of methanogenic and sulfate-reducing bacteria in high rate anaerobic reactors. *Appl. Microbiol. Biot.* (40), pp. 575-581.
- Visser A., Gao Y. & Lettinga G. (1993c). Effects of short-term temperature increases on the mesophilic anaerobic breakdown of sulfate containing synthetic wastewater. *Wat. Res.* (27), pp. 541-550.
- Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holanda.
- Visser A., Hulshoff-Pol L.W. & Lettinga G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Wat. Sci. Technol.* (33), pp. 99-110.
- Watson J.H.P., Ellwood D.C., Deng Q., Mikhalovsky S., Hayter C.E. & Evans J. (1995). Heavy metal adsorption on bacterially produced FeS. *Minerals Engineering.* (8), pp. 1097-1108.

- Weijma J., Stams A.J.M., Hulshoff-Pol L.W. & Lettinga G. (2000a). Thermophilic sulfate reduction and methanogenesis with methanol in a high rate anaerobic reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 67(3), pp. 354-363.
- Weijma J., Hulshoff-Pol L.W., Stams A.J.M. & Lettinga G. (2000b). Performance of a thermophilic sulfate and sulfite reducing high rate anaerobic reactor fed with methanol. *Biodegradation.* (11), pp. 429-439.
- White C. & Gadd G.M. (1996). A comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metals as sulphides. *J. Ind. Microbiol.* (17), pp. 116-123.
- Widdel F. (1988) Microbiology and ecology of sulphate- and sulphur- reducing bacteria. In: *Biology of anaerobic microorganisms.* Zehnder, A.J.B. (Ed.). *Wiley & Sons Inc.* New York. pp. 469-585.
- Wu W-M., Hickey R.F. & Zeikus J.G. (1991). Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 57(12), pp. 3438-3449.
- Yi Z.-J., Tan K.-X., Tan A.-L., Yu Z.-X. & Wang S.-Q. (2007). Influence of environmental factors on reductive bioprecipitation of uranium by sulfate reducing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation.* Article in press. 9p. doi:10.1016/j.ibiod.2007.04.001.
- Yoochatchaval W., Ohashi A., Harada H., Yamaguchi T. & Syutsubo K. (2008). Characteristics of granular sludge in an EGSB reactor for treating low strength wastewater. *Int. J. Environ. Res.* 2(4), pp. 319-328.
- Zandvoort M.H., van Hullebusch E.D., Feroso F.G. & Lens P.N.L. (2006). Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: Bioavailability and dosing strategies. Trace metals in anaerobic reactors. *Eng. Life Sci.* 6(3), pp. 293-301.
- Zehnder A.J.B., Ingvorsen K. & Marti T. (1982) Microbiology of methane bacteria. En: *Anaerobic Digestion 1981* (Hughes, D.E., Stafford, D.A., Wheatley, B.I., Baader, W., Lettinga, G., Nyns, E.J., Verstraete, W. and Wentworth, R.L., Eds.). *Elsevier Biomedical.* New York. pp. 45-68.
- Zoutberg G.R. & Eker Z. (1999). Anaerobic treatment of potato processing wastewater. *Water Science and Technology.* (40), pp. 297-304.