



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA**

INSTITUTO DE INGENIERÍA

**TRATAMIENTO ÓPTIMO DE AGUAS RESIDUALES
CONTAMINADAS CON SULFATOS MEDIANTE UN
PROCESO DISCONTINUO ANAEROBIO-AEROBIO**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A :

M. en C. FRANCISCO JOSÉ TORNER MORALES

TUTOR:

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ



2010

JURADO ASIGNADO:

Presidente: **Dr. Bazúa Rueda Enrique Rodolfo**
Secretario: **Dra. Fernández Villagómez Georgina**
Vocal: **Dr. Buitrón Méndez Germán**
1^{er}. Suplente: **Dra. Meraz Rodríguez Mónica**
2^{do}. Suplente: **Dr. Moreno Pérez Jaime Alberto**

LUGAR DE DESARROLLO DE LA TESIS:

**Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas.
Instituto de Ingeniería. UNAM campus Juriquilla.**

TUTOR DE TESIS:

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Buitrón', is written over a horizontal line.

FIRMA

A mi familia

A Dios y a mis padres, hermanos y familia porque sin ellos no sería quien soy ni habría llegado a este momento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado el privilegio de formarme generosamente todos estos años.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, Coordinador del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, por darme la oportunidad de trabajar con él y con quien obtuve amistad, grandes aprendizajes y apoyo continuo para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM y la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM, por el apoyo y la beca otorgada durante el transcurso del posgrado. De igual forma a la DGAPA-UNAM y al CONACYT por el financiamiento al proyecto PAPIIT-IN104710 y 100298 respectivamente.

Al Dr. Alejandro Vargas Casillas, el Dr. Jaime Moreno Pérez, la Dra. María Elena Raynal y los compañeros estudiantes Jaime González Martínez, Gastón Martínez de Jesús, Jorge Lenin Ruíz, Dorian Prato García y Luis Daniel Vázquez Torres por sus contribuciones a este proyecto.

A los técnicos académicos, M. en C. Gloria Moreno Rodríguez, M. en B. Jaime Pérez Trevilla y M. en C. Leticia García Montes de Oca por su continua asistencia dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Mónica Meraz Rodríguez y el Dr. Enrique Bazúa Rueda por sus valiosas aportaciones como miembros del comité tutorial que evaluó este proyecto un semestre tras otro.

A los miembros del jurado asignado para revisar y evaluar esta tesis, por sus comentarios y observaciones.

A los compañeros del LIPATA por su amistad, su constante disposición de apoyo en el trabajo de laboratorio y por hacer de cada jornada un buen momento.

A la bella ciudad de Santiago de Querétaro por su excelente hospitalidad y las buenas amistades y experiencias que ha dejado para mi vida.

ÍNDICE

	Página
Índice de Figuras.....	13
Índice de Tablas.....	17
Nomenclatura.....	19
Resumen.....	21
Abstract.....	22
Introducción.....	23
 I. Antecedentes.....	 25
1.1 Problemática: Las aguas residuales contaminadas con sulfatos y su biotratamiento.....	27
1.2 El proceso sulfatorreductor.....	28
1.3 El proceso sulfuroxidante.....	34
1.4 La sulfuroxidación y la formación de azufre elemental.....	36
El azufre biológico y sus propiedades.....	37
El ciclo del azufre y sus equilibrios.....	39
1.5 Los procesos combinados y las propuestas de control.....	42
1.6 El modelado de los procesos biológicos.....	47
 II. Hipótesis y Objetivos.....	 53
Hipótesis.....	55
Objetivo general.....	55
Objetivos particulares.....	55
Alcance.....	56
 III. Metodología y Materiales.....	 57
3.1 Metodología.....	59
3.1.1 Caracterización cinética del proceso sulfatorreductor.....	59
3.1.2 Estudio de la cinética del proceso sulfuroxidante.....	61
Parametrización de la sulfuroxidación química.....	62

Relación entre la oxidación del sulfuro y el oxígeno disuelto en línea.....	63
3.1.3 Estudio de la colonización de un soporte plástico por parte de un consorcio sulfatorreductor.....	64
3.1.4 Operación y estrategia de control de un reactor discontinuo anaerobio-aerobio.....	66
Fase de estabilización biológica sulfatorreductora.....	66
Fase de seguimiento de variables en línea y aplicación de etapas sulfurooxidantes.....	67
Determinación del grado de sulfurooxidación química y/o biológica.....	68
3.2 Materiales y Técnicas Analíticas.....	69
3.2.1 Reactor y equipo accesorio.....	69
3.2.2 Reactivos y medios de cultivo.....	71
Medio mineral sulfurooxidante.....	71
Medio mineral sulfatorreductor.....	71
3.2.3 Preparación de disoluciones y técnicas analíticas.....	72
Determinación de biomasa.....	73
Cromatografía y cuantificación de sulfato, azufre y ácidos grasos.....	73
Cuantificación de carbono total.....	75
Cuantificación de sulfuro.....	76
Cuantificación de azufre elemental.....	76
Cuantificación de proteína.....	77
Calibración de sensores.....	77
3.2.4 Cálculo de demanda química de oxígeno teórica (DQO).....	78
IV. Resultados.....	79
4.1 Caracterización cinética del proceso sulfatorreductor.....	81
4.1.1 Estabilidad del proceso sulfatorreductor y reacción predominante.....	81
4.1.2 Aspectos inhibidores y variación de demanda química de oxígeno.....	85
4.1.3 Propuesta del modelo sulfatorreductor. Parametrización y validación.....	91
4.2 Estudio de la cinética del proceso sulfurooxidante.....	98
4.2.1 Parametrización de la sulfurooxidación química.....	98
4.2.2 Relación entre la oxidación del sulfuro y el oxígeno disuelto en línea.....	104

4.3 Colonización de un consorcio sulfatorreductor en un lecho móvil.....	111
4.4 Operación de un reactor anaerobio-aerobio y aplicación de una estrategia de control..	117
4.4.1 La estabilización del proceso biológico sulfatorreductor en el lecho móvil...	117
4.4.2 Estabilización del proceso combinado y estrategia de control.....	125
El potencial de óxido-reducción y el proceso sulfatorreductor.....	125
El proceso sulfuroxidante y sus variables en línea.....	129
Evaluación del pH como factor inhibidor de la sulfatorreducción.....	137
Optimización del proceso combinado por medio del potencial redox.....	138
Determinación del grado de sulfuroxidación química y biológica.....	152
V. Conclusiones.....	155
VI. Referencias.....	161
Anexo I (ajustes individuales de los modelos).....	167
Anexo II (resultados publicados).....	173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Predominio de especies del sulfuro de hidrógeno y regiones de máxima eficiencia de bacterias anaerobias (6-8) (región sombreada con diagonales) y de bacterias metanogénicas (6.5-7.5) (región oscura) como función del pH (Lens <i>et al.</i> , 1998)	31
1.2	Micrografía electrónica de barrido de azufre excretado por el género <i>Thiobacillus</i> . (Janssen <i>et al.</i> 1999)	38
1.3	Comparación de remoción de metales pesados usando azufre técnico y azufre producido biológicamente en un proceso de biolixiviación (Seidel <i>et al.</i> , 2006)	39
1.4	Ciclo del azufre de acuerdo con las reacciones de oxidación planteadas por Steudel (1996), junto con los procesos deseados y no deseados para la producción de azufre elemental	40
1.5	Diagrama de formación química y predominio de especies azufradas en un sistema acuoso en equilibrio a 30°C como función del pH y del potencial de óxido-reducción presente. (González-Sánchez y Revah, 2007)	41
1.6	Señal de potencial redox (POR) para controlar por medio de oxígeno las fluctuaciones de la carga de H ₂ S en un reactor sulfuroxidante continuo (Janssen <i>et al.</i> , 1998)	43
1.7	Variación de la señal del potencial redox (POR) propia del proceso de sulfatorreducción con la inyección de oxígeno. Esta inyección de oxígeno dosificada se lleva a cabo en este proceso con la intención de reducir la toxicidad por sulfuro en el reactor utilizado. (Khanal y Huang, 2003, 2006)	44
1.8	Gráficos del comportamiento de una tasa de crecimiento tipo Monod y Haldane como función de la concentración de sustrato.	49
3.1	Esquema del sistema de sulfatorreducción utilizado	60
3.2	Imagen del equipo de respirometría. A. Respirometro y parrilla de agitación, B. Transmisor de la señal de oxígeno disuelto, C. Registrador, D. Detalle del sensor de oxígeno usado en el respirómetro	62
3.3	Esquema del reactor de 2 L utilizado para las mediciones de oxígeno disuelto en los ciclos sulfuroxidantes para diferentes condiciones de aereación.	64
3.4	Imagen del reactor piloto construido. 1. Reactor principal, 2. Chaqueta para baño de agua, 3, 4. Entradas para sensores de pH y potencial de óxido-reducción (POR), 5. Zona de calentamiento del baño de agua, 6. Transmisores para señales de pH, POR y oxígeno disuelto, y tarjeta de adquisición de datos, 7. Computadora receptora de datos, 8. Bombas de carga y descarga, 9. Controlador de flujo másico para aire, 10. Tapa con entradas de mangueras y cople para sensor de oxígeno.	69

3.5	Empaques de polietileno utilizados como lecho móvil.	70
4.1	Consumo de sulfato para la biomasa para diferentes razones de alimentación DQO/sulfato de 1.77 (-■-), 2 (-□-), and 2.4 (-Δ-).	81
4.2	Concentraciones promedio para el ciclo normal de operación del reactor discontinuo secuencial sulfatorreductor para una relación de alimentación DQO/sulfato de 2; lactato (■), sulfato (▲), acetato (□) y carbono inorgánico total (CIT) (Δ)	83
4.3	Reducción de sulfato (A) y acumulación de sulfuro (B) a lo largo de un ciclo sulfatorreductor operado bajo cuatro diferentes condiciones: con una relación de alimentación DQO/SO ₄ ²⁻ de 2 (■) y de 6 (▲) y utilizando nitrógeno para lavar el sulfuro presente (□), (Δ)	86
4.4	Evolución del pH (A) potencial redox (B) a lo largo de un ciclo sulfatorreductor operado bajo cuatro diferentes condiciones: con una relación de alimentación DQO/SO ₄ ²⁻ de 2 (■) y de 6 (▲) y utilizando nitrógeno para lavar el sulfuro presente (□), (Δ)	88
4.5	Carbono orgánico total (COT) (A) y carbono inorgánico total (B) a lo largo de un ciclo sulfatorreductor operado bajo cuatro diferentes condiciones: con una relación de alimentación DQO/SO ₄ ²⁻ de 2 (■) y de 6 (▲) y utilizando nitrógeno para lavar el sulfuro presente (□), (Δ)	90
4.6	Resultados experimentales de consumo de ácido láctico en el reactor sulfatorreductor a una relación de alimentación DQO/SO ₄ ²⁻ de 2 (■) y datos simulados a partir de la ecuación 4.17 (--).	96
4.7	Consumo de oxígeno promedio por efecto de la sulfuroxidación química para una concentración inicial de sulfuro de 1mM. Datos experimentales (■), Ajuste del modelo (—). Se presentan igualmente los parámetros ajustados.	101
4.8	Consumo de oxígeno promedio por efecto de la sulfuroxidación química para diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0.1mM (*), 0.5mM (—□—), 1mM (Δ), 2mM (■) y 6 mM (▲)	103
4.9	Rapidez de consumo de oxígeno contra sulfuro inicial. Datos experimentales (■), Ajuste del modelo (—). Se presentan dentro de la gráfica los parámetros ajustados	103
4.10	Evolución del reactor sulfuroxidante de 1.5 L. Se muestra la producción de sulfato (mM d ⁻¹) (--■--), así como el sulfuro alimentado (mM d ⁻¹) (—■—) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) (-Δ-).	105
4.11	A: registro en línea de pH (—) y oxígeno disuelto (■) (mg/L) para un ciclo sulfuroxidante con suministro de aire de 266 ml/l min. Se señalan cuatro etapas distinguibles en el perfil de oxígeno disuelto. B: cuantificación de especies azufradas en el mismo ciclo.	107
4.12	A: registro en línea de pH (—) y oxígeno disuelto (■) (mg/L) para un ciclo sulfuroxidante con suministro de aire de 400 ml/l min. B: cuantificación de especies azufradas en el mismo ciclo.	107

4.13	A: registro en línea de pH (—) y oxígeno disuelto (■) (mg/L) para un ciclo sulfurooxidante con suministro de aire de 147 ml/l min. B: cuantificación de especies azufradas en el mismo ciclo.	108
4.14	Evolución del sulfato consumido y el sulfuro detectado en el efluente del reactor a lo largo de la operación del proceso sulfatorreductor. En la parte superior de la figura se presenta la duración de un ciclo la etapa de operación correspondiente.	111
4.15	Evolución de la tasa global de remoción de sulfato para el reactor sulfatorreductor (—Δ—), y de la biomasa suspendida como sólidos suspendidos volátiles (--■--).	112
4.16	A. Fotografía de las 7 bandas identificadas en el proceso de separación de ADN. Las bandas fueron cortadas y enviadas a secuenciar. Posteriormente la secuencia se comparó en un banco de secuencias. B. Micrografía de identificación de bacterias por tinción de Gram de biomasa proveniente del empaque colonizado.	113
4.17	Evolución de la tasa global de remoción de sulfato para el reactor sulfatorreductor (-■-) entre los días 250 y 320 de operación. Evolución de la tasa de remoción de sulfato del lecho móvil en proceso de colonización (--▲--).	114
4.18	% de remoción de sulfato y sulfuro del efluente en ciclos de 24 horas de un reactor de 1 litro operado con 500 empaques colonizados.	116
4.19	A. Evolución de la tasa global de consumo de sulfato para el reactor de 5 litros. B. Duración de los ciclos de alimentación en función del número de ciclos realizados. Al inicio con operación de ciclos variables y posteriormente ciclos fijos de 24 horas.	119
4.20	A Consumo específico de sulfato por hora por unidad de SSV (□) (eje izquierdo) y por unidad de proteína (■) (eje derecho) a lo largo de toda la operación del reactor combinado B. Consumo neto de sulfato mM/h para la biomasa suspendida (□) y para el empaque (■). C. Evolución de la cantidad de proteína presente por empaque. D. Evolución de la biomasa suspendida presente en el reactor.	120
4.21	Cinética promedio del reactor sulfatorreductor de 5 litros A. Concentración de sulfato y sulfuro. B. Consumo de ácido láctico y producción de ácido acético y carbono inorgánico.	122
4.22	A. Cinética del ciclo sulfatorreductor al día 195 de operación. Concentraciones de sulfato (--■--), sulfuro (-▲-), lactato (-□-), acetato (-Δ-), carbono inorgánico total (-*-) y pH (--○--) (eje derecho). B. Perfil de potencial redox en línea para el mismo ciclo.	126
4.23	Concentración de especies azufradas así como lactato y acetato de un ciclo sulfatorreductor así como su perfil de potencial redox en línea.	127
4.24	A. Predominio de especies azufradas en un ciclo sulfurooxidante de 30 horas para el reactor combinado B. Perfil de oxígeno disuelto y pH, C. Perfil de potencial redox. Se pueden observar 3 etapas (I, II, III).	131
4.25	A. Concentración de sulfuro mM (-Δ-), sulfato (--□--), oxígeno disuelto en mg/L (■) y azufre (-◆-) (eje derecho) para un ciclo completo anaerobio / aerobio (día 154 de operación), el cual se detuvo una vez que aumenta la señal de oxígeno y potencial redox. B. Perfil del potencial redox (mV).	134

4.26	A. Concentración mM de sulfuro (-Δ-), sulfato (--□--), azufre (-♦-) y pH (-*-) para un ciclo completo anaerobio / aerobio el día 168 de operación, el cual se detuvo una vez que aumenta la señal de potencial redox. B. Perfil del potencial redox (mV) para el mismo ciclo. C. Comparación de obtención de azufre (mM) (--Δ--) en un ciclo con pH controlado (-□-) y el azufre (--▲--) en un ciclo sin control de pH(-■-).	135
4.27	A. Comparación de la sulfatorreducción a pH inicial 7 y 8. Concentraciones de sulfuro y sulfato promedio para experimentos por triplicado. B. Concentraciones de lactato y acetato. C. Concentraciones de carbono inorgánico total. D. Evolución del pH cuando el inicial es 8.	138
4.28	Perfil del potencial redox para parte de un ciclo anaerobio previo (□), un ciclo oxidativo (—) y otro ciclo anaerobio posterior en el cual se añadió sulfuro inicial en una concentración de 3.4 mM (□). Se observa una recuperación lenta del valor original del potencial redox en el ciclo anaerobio previo.	140
4.29	Perfil del potencial redox para un ciclo aerobio (—) y sus ciclos anaerobios previo y posterior (□). El ciclo aerobio es terminado en cuanto el sulfuro deja de detectarse y antes de que el potencial redox suba.	141
4.30	Especies azufradas a lo largo de los ciclos continuos llevados a cabo entre los días 334 y 348 de operacion.	143
4.31	Evolución de la tasa global de consumo de sulfato del reactor a lo largo de toda su operación.	144
4.32	A. Especies azufradas durante una etapa sulfurooxidante acoplada en el proceso combinado operado bajo el control de pH y el seguimiento del potencial redox. B. Evolución de las especies carbonadas en los mismos ciclos.	144
4.33	A. Perfil redox de dos ciclos continuos aerobios (—) y anaerobios (□). B. Evolución de la concentración de las especies azufradas para dichos ciclos. C. Evolución de la concentración del lactato y acetato.	146
4.34	A. Perfil redox de dos ciclos continuos aerobios (—) y anaerobios (□). B. Evolución de la concentración de sulfato y sulfuro para dichos ciclos. C. Evolución de la concentración del lactato y acetato.	149
4.35	Apariencia secuencial del reactor en el ciclo oxidativo, desde el inicio (izquierda) hasta su término en el cual se obtiene el azufre elemental (derecha).	151
4.36	Consumo de oxígeno en un respirómetro por un proceso de sulfurooxidación química (■) y en presencia de empaques colonizados (Δ) y biomasa suspendida (*).	152

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Condiciones de descarga de aguas residuales industriales y la relación gDQO/gSO ₄ ²⁻ (Fernández Polanco y García Encina, 2006)	28
1.2	Reacciones del proceso sulfatorreductor y metanogénico y su energía libre de Gibbs. (Lens <i>et al.</i> , 1998)	29
1.3	Condiciones de inhibición de algunos procesos sulfatorreductores. (Kaksonen <i>et al.</i> , 2004)	30
1.4	Algunos reactores sulfatorreductores a escala de laboratorio cuyos resultados han sido publicados.	32
1.5	Algunos reactores sulfuroxidantes y aspectos relevantes de su operación.	35
1.6	pK de formación de polisulfuros (Kamyshny <i>et al.</i> , 2006)	42
3.1	Condiciones experimentales para el sistema sulfatorreductor	61
3.2	Elementos del medio mineral sulfuroxidante	71
3.3	Compuestos del medio mineral sulfatorreductor	72
4.1	Características de consumo y producción del proceso sulfatorreductor	82
4.2	Sumario de eficiencia sulfatorreductora bajo las cuatro condiciones experimentales	87
4.3	Valores de la constante cinética de dos modelos ajustados a los resultados del proceso sulfatorreductor alimentado bajo un relación DQO/sulfato de 6.	94
4.4	Resultados generales de los ciclos sulfuroxidantes de acuerdo con las variaciones en el suministro de aire.	109
4.5	Comparativo de tasas globales de remoción de sulfato de algunos reactores sulfatorreductores.	121
4.6	Resumen de resultados del sistema sulfatorreductor en un ciclo.	124
4.7	Comparación de variaciones publicadas de concentración de sulfuro y potencial redox.	129
4.8	Tasa de remoción de sulfato obtenida para la etapa anaerobia tras las diversas condiciones de operación de un ciclo sulfuroxidante en el mismo reactor discontinuo a 100 mL L ⁻¹ min ⁻¹ de aire.	140

4.9	Resumen de cifras de consumo y producción para las etapas anaerobia y aerobia combinadas en el reactor sulfatorreductor / sulfuroxidante discontinuo secuencial bajo la estrategia de control de pH y POR con una duración de la etapa anaerobia de 20 horas y de 4 horas aproximadas de la etapa aerobia.	145
4.10	Tasas de consumo de oxígeno para cada prueba de respirometría a 30°C.	153

NOMENCLATURA

ADN	Ácido Ácido
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
[<i>B</i>]	Concentración de biomasa
CAS	Número de registro en el Chemical Abstract
CLAP	Cromatografía de líquidos a alta presión
COT	Carbono Orgánico Total
DGGE	Electroforesis en Gradiente de Gel Desnaturalizante
DIF	Detector de ionización de flama
DQO	Demanda química de oxígeno (medida de la cantidad de materia orgánica)
[H_2S] [HS^-]	Concentración de sulfuro no disociado y disociado
<i>I</i>	Concentración de la especie considerada como inhibidor
<i>k</i>	Constante cinética genérica
K_2 , K_{100}	Concentración de <i>I</i> a la cual la tasa de crecimiento ha descendido 2 y 100 veces
K_d	Coeficiente de decaimiento de la biomasa
K_I	Constante de inhibición producida por el sustrato.
$k_L a$	Coeficiente de transferencia del oxígeno
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_S	Constante genérica de afinidad del sustrato. Usada también para el lactato.
K_{SO_4}	Constante de afinidad del sulfato
[<i>L</i>]	Concentración de lactato
μ	Tasa de crecimiento específica

$\mu_{\max}$	Tasa máxima de crecimiento específica
$[O_2]$	Concentración de oxígeno
O_{sat}	Concentración máxima de saturación del oxígeno en el agua
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
POR	Potencial de óxido-reducción o potencial redox
r_B	Tasa de crecimiento bacteriano
RLF	Reactor de lecho fluidizado
$[S]$	Concentración genérica del sustrato
$[S^{\circ}]$	Concentración de azufre elemental
SBR	Reactor discontinuo secuencial
$[SO_4^{2-}]$	Concentración de sulfato
SSV	Sólidos suspendidos volátiles (medida de la cantidad de biomasa)
S_t	Umbral mínimo de concentración consumible de sustrato de Ribes <i>et al.</i>
UASB	Reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente
v_o	Rapidez inicial de la reacción
$v_{\max}$	Rapidez máxima de consumo de sustrato
Y	Coeficiente de producción máxima

RESUMEN

Se estudió la factibilidad de operar y controlar un proceso de tratamiento de un agua residual sintética contaminada con sulfato y materia orgánica, buscando transformar el sulfato en azufre elemental mediante un proceso combinado sulfatorreductor y sulfuroxidante en un reactor discontinuo secuencial. Para ello en un inicio se estudiaron ambos procesos por separado. Se desarrolló y caracterizó cinéticamente un consorcio sulfatorreductor alimentado con lactato, encontrando la reacción predominante del proceso y logrando obtener un modelo simplificado con el que se obtuvieron los parámetros cinéticos. Igualmente, se identificó al potencial redox como un factor para mantener o inhibir el proceso mientras se descartó al sulfuro como agente inhibidor. Se implementó así mismo un reactor en lote sulfuroxidante con el que se determinó que las etapas de oxidación del sulfuro a azufre y posteriormente a sulfato eran separables y distinguibles por sensores en línea de oxígeno disuelto y potencial redox. Adicionalmente se determinaron los parámetros cinéticos de la sulfuroxidación química.

Paralelamente se determinó la viabilidad de un soporte plástico para ser colonizado por un consorcio bacteriano sulfatorreductor. Los resultados fueron positivos y se eligió dicho soporte para ser utilizado en la operación de un reactor combinado.

Finalmente un reactor de 5 litros inoculado con biomasa suspendida sulfatorreductora se operó durante 350 días. En los primeros 120 se colonizaron 2500 empaques que sirvieron de soporte para la biomasa. Posteriormente se buscaron las mejores condiciones para operar el reactor en ciclos continuos anaerobio/aerobio. Se encontró que el control de los niveles de potencial redox en la etapa oxidativa permitieron la continuidad de los ciclos, minimizando la inhibición del consorcio anaerobio. Al final se obtuvieron ciclos continuos combinados que operaron una etapa anaerobia biológica y una etapa aerobia predominantemente química con una eficiencia de conversión de sulfato a sulfuro del 76% y de sulfuros a azufre cercana al 100% por lo que la conversión global de sulfato a azufre fue del $66 \pm 10\%$.

Se encontró que el control de la etapa anaerobia por separado se puede llevar por el potencial redox, y que el control óptimo para el reactor combinado requiere de un sensor de sulfuro disuelto junto con un seguimiento del potencial redox como variable de observación y un control de pH para maximizar la producción de azufre elemental.

ABSTRACT

It was studied the feasibility of operating and controlling a treatment process of a synthetic wastewater containing sulfate and organic matter, in order to transform the sulfate into elemental sulphur by a combined sulfate-reducing and sulfide-oxidizing process in a sequencing batch reactor. To achieve this, both processes were studied separately at the beginning. A sulfate-reducing consortium fed with lactate was developed and kinetically characterized, finding the main process reaction and obtaining a simplified model. The redox potential was identified as a contributing factor to keeping or inhibiting the process while sulfide was discarded as an inhibitory agent.

A batch sulfide-oxidizing reactor was implemented and it was found that the oxidizing stages of sulfide to sulphur and to sulfate were separable and distinguishable by on-line dissolved oxygen and redox potential signals. Furthermore, the kinetic parameters of the chemical sulfide-oxidation were determined.

At the same time it was studied the feasibility of colonization of plastic packing particles by a sulfate-reducing consortium. The results were positive and this plastic particles were chosen to be used in the operation of a combined process reactor.

Finally, a 5 liter reactor seed with sulfate-reducing suspended biomass was in operation for 350 days. During the first 120 days, 2500 packing particles were colonized. Afterwards the best operating conditions to operate continuous anaerobic/aerobic cycles were sought. It was found that controlling the redox potential levels during the oxidizing stage allowed the process stability, minimizing the inhibition of the anaerobic bacteria. At the end, the process operated with continuous cycles combining a biological anaerobic stage and an aerobic stage that turned out to be predominantly chemical. The conversion efficiency from sulfate to sulfide was of 76% whereas the conversion from sulfide to elemental sulphur was near to 100%. So the global conversion from sulfate to sulphur was of $66 \pm 10\%$.

It was found that the sole anaerobic stage can be controlled by the redox potential, however, the optimum control for the combined reactor would require an on-line dissolved sulfide signal along with the use of the redox potential and the pH control to maximize the sulphur production.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos azufrados y la materia orgánica son contaminantes muy comunes en los efluentes industriales. De los primeros, los sulfatos son la forma predominante en que éstos se pueden encontrar, y provienen de las industrias alimentaria y de fermentación, de la minería y del papel principalmente. Las concentraciones de sulfato en corrientes de desecho van, por ejemplo, desde los 300 mg/L en el caso de la industria de la papa y el almidón (Nanninga *et al.*, 1986), hasta varios gramos por litro en industrias del aceite comestible o plantas farmacéuticas (Nacheva *et al.*, 2006). Igualmente, se les puede encontrar en filtrados de desperdicios ricos en azufre presentes en rellenos sanitarios o en los efluentes de desulfuración de corrientes de gas (Fernández Polanco y García Encina, 2006).

La alta concentración de sulfatos en el agua afecta el ciclo natural del azufre, causando problemas alimenticios y de sabor en el agua para beber (Janssen *et al.*, 1999); en las aguas residuales lleva a su eventual transformación, bajo condiciones anaerobias, en sulfuros y ácido sulfhídrico (H_2S), que resultan altamente dañinos por su toxicidad, por el mal olor que generan, así como por la naturaleza corrosiva del H_2S , tanto en su forma disuelta como gaseosa.

Actualmente ya se han generado diversas alternativas especialmente de tipo fisicoquímico para el tratamiento de los efluentes que contienen este tipo de compuestos, sin embargo, muchos de esos tratamientos implican altos costos, dada la necesidad de un post-tratamiento por el tipo de agentes químicos utilizados (Visser *et al.*, 1997). Se ha visto que una opción de menor costo y que podría llevar a resultados satisfactorios es el tratamiento del efluente contaminado a través de un proceso biológico, aprovechando la capacidad de diversas bacterias para metabolizar estos compuestos azufrados, buscando llegar hasta la formación de azufre elemental (S^0), por tratarse de una especie que puede ser separada físicamente del efluente.

Los tratamientos biológicos mencionados involucran la existencia de una fase anaerobia, en la que el sulfato es reducido a sulfuro, y una fase aerobia, en la que el sulfuro pueda ser oxidado a azufre elemental. En el presente estudio se busca desarrollar un proceso discontinuo de tratamiento de agua residual rica en sulfatos y materia orgánica que comprenda tanto una fase

anaerobia como una fase aerobia buscando los parámetros y la estrategia de operación y control óptimos para la eliminación máxima tanto de los sulfatos, como de los sulfuros producidos durante la fase anaerobia, y llevando a una maximización en la obtención de azufre como un valor agregado del proceso de tratamiento del agua residual.

I. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

1.1 Problemática: Las aguas residuales contaminadas con sulfatos y su biotratamiento

El tratamiento biológico de efluentes ricos en sulfatos implica la participación de bacterias sulfatorreductoras, las cuales reducen el sulfato (SO_4^{2-}) a sulfuro (HS^-), al utilizar a los primeros como aceptores de electrones. Esta reducción biológica de sulfatos se lleva a cabo bajo condiciones anaerobias, y requiere la presencia de un donador de electrones, que suele ser un compuesto orgánico presente en el mismo efluente. La cantidad de materia orgánica disponible para tal fin se mide en términos de la demanda química de oxígeno (DQO). Aquellas corrientes contaminantes ricas en materia orgánica poseerán una DQO alta, mientras que aquellas que carezcan de altas concentraciones de materia orgánica tendrán una DQO baja. Es posible pues encontrar efluentes ricos en sulfatos pero con una DQO baja (drenajes de minas e industrias que utilizan ácido sulfúrico en sus procesos) o con una DQO alta (industria alimentaria, papel, aceite comestible, etc.) (Drury *et al.*, 1999). Cuando la DQO es baja es necesario adicionar a la corriente un compuesto orgánico que funja como donador de electrones, o cosustrato, para poder llevar a cabo el proceso de tratamiento de los sulfatos. Sustancias como propionato, benzoato o butirato han sido utilizadas para este fin (Buitrón *et al.*, 2003).

Así pues, la relación DQO/sulfato es un parámetro de importancia, dependiendo del tipo de tratamiento que se llevará a cabo sobre el agua de desecho, es decir, si la finalidad es la remoción de materia orgánica, o la remoción de los sulfatos, o ambas, ya que, por ejemplo, para una relación DQO/sulfato mayor a 0.67 se ha visto que en algunos casos se tiene suficiente materia orgánica para que las bacterias sulfatorreductoras lleven a cabo su acción (Omil *et al.*, 1996). A un valor más pequeño de esta relación, será necesario agregar ciertas cantidades de donadores de electrones extra para llevar a cabo el proceso.

Sin embargo, si la intención además es la remoción total de la materia orgánica, deberá considerarse hasta qué punto la sulfatorreducción es suficiente. En caso de no serlo, será quizá factible un proceso posterior a través de bacterias metanógenas o productoras de metano (Fernández Polanco y García Encina, 2006). Esto sin considerar que el producto de la sulfatorreducción es el sulfuro, el cuál también ha de ser eliminado, pues resulta justamente la especie menos deseada del proceso, dada su toxicidad. En la tabla 1.1 se presentan las

características típicas de algunas aguas de desecho industriales ricas en sulfatos así como la relación DQO/sulfato correspondiente, y en donde se puede observar que las variaciones entre giros industriales pueden ser amplias.

Tabla 1.1. Condiciones de descarga de aguas residuales industriales y la relación gDQO/ gSO₄²⁻ (Fernández Polanco y García Encina, 2006)

Giro industrial	DQO (mg/L)	Sulfato (mg S/L)	DQO / Sulfato
Fermentación	44,800-55,600	2500-3450	4.3 – 7.4
Procesamiento de productos del mar	10,000-50,000	600-2700	1.2 – 27.8
Industria de la papa y almidón	17,500-18,000	320	18.2 – 18.8
Curtiduría	2900-8200	750-1250	0.8 – 3.6
Desperdicio de destilería	95,000	6000	5.3
Refinería de aceite comestible	1000-8200	3100-7400	0.05 – 0.9
Planta farmacéutica	28,500	14,800	0.6
Pulpa y papel (proceso termomecánico)	2000-5000	200-700	0.9 – 8.3
Pulpa y papel (proceso químico-termomecánico)	7500-10,400	1200-1500	1.7 – 2.9

1.2 El proceso sulfatorreductor

La sulfatorreducción es un proceso que se lleva a cabo bajo condiciones anaerobias por grupos de bacterias que utilizan al sulfato como aceptor de electrones, dentro de la cadena de reacciones bioquímicas que permiten a dichas bacterias oxidar la materia orgánica (fuente de carbono) hasta convertirla en acetato o CO₂ y siendo a su vez el sulfato reducido hasta sulfuro. En la tabla 1.2 se presentan algunas reacciones de sulfatorreducción, dependiendo de qué compuesto funge como fuente de carbono. Las bacterias sulfatorreductoras pueden utilizar ácidos orgánicos, tales como acetato, propionato, butirato o lactato, como fuentes de carbono por lo que, junto con el etanol, han sido usados para alimentar consorcios bacterianos en diversos reactores de laboratorio. Sin embargo, no todas las especies de bacterias sulfatorreductoras consumen con la misma eficiencia los diversos tipos de compuestos orgánicos.

Las especies capaces de utilizar el acetato, por ejemplo, son menos abundantes que las especies que utilizan ácidos grasos superiores. Esto de acuerdo con resultados obtenidos tanto en

este proyecto como con trabajos publicados, donde el proceso sulfatorreductor se ha visto inhibido por exceso de acetato (Kaksonen *et al.*, 2004). También se ha reportado que el lactato es preferido por ciertos consorcios de bacterias sulfatorreductoras (Celis García, 2004) por encima de otros compuestos.

Tabla 1.2. Reacciones del proceso sulfatorreductor y metanogénico y su energía libre de Gibbs. (Lens *et al.*, 1998)

	ΔG° (kJ/mol)
Reacciones sulfato-reductoras	
$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-38.1
$Acetato^- + SO_4^{2-} \rightarrow HS^- + 2HCO_3^-$	-47.6
$Propionato^- + 3/4SO_4^{2-} \rightarrow 3/4HS^- + Acetato^- + HCO_3^- + 1/4H^+$	-37.7
$Propionato^- + 7/4SO_4^{2-} + 1/4H_2O \rightarrow 7/4HS^- + 3HCO_3^- + 1/2H^+ + 1/4OH^-$	-88.9
$Butirato^- + 1/2SO_4^{2-} \rightarrow 1/2HS^- + 2Acetato^- + 1/2H^+$	-27.8
$Butirato^- + 5/2SO_4^{2-} + 1/4H_2O \rightarrow 5/2HS^- + 4HCO_3^- + 3/4H^+ + 1/4OH^-$	NR
$Lactato^- + 1/2SO_4^{2-} \rightarrow Acetato^- + HCO_3^- + 1/2HS^- + 1/2H^+$	-189
$Lactato^- + 3/2SO_4^{2-} \rightarrow 3HCO_3^- + 3/2H^+ + 3/2HS^-$	-255.3
Reacciones metanogénicas	
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-33.9
$Acetato^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0

En los biorreactores utilizados para el tratamiento de agua residual no se tienen generalmente poblaciones uniformes de bacterias sino que se desarrolla una cierta diversidad de especies. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de operación, puede darse un proceso de selección, llevando al predominio de cierto tipo de especies sobre otras. Lo anterior se ve reflejado en el hecho de que existen condiciones que favorecen la actividad de las bacterias sulfatorreductoras y que en cambio inhiben la actividad de otros grupos bacterianos, como las bacterias metanogénicas o productoras de metano.

Se ha reportado (Lens *et al.*, 1998) que bajo altas concentraciones de sulfato las bacterias sulfatorreductoras tienden a predominar en los procesos anaerobios, no solamente porque sus procesos metabólicos llegan a ser termodinámicamente más espontáneos sino porque la gradual producción de sulfuro afecta primeramente a otras poblaciones bacterianas antes que a las sulfatorreductoras.

Sin embargo, también se ha determinado que estas últimas se ven afectadas por la acumulación de sulfuro, aunque el umbral de concentración inhibidor reportado varía considerablemente (Kaksonen *et al.*, 2004), por lo que en gran medida parece depender del tipo de consorcio y de la aclimatación de la población bacteriana a los niveles de sulfuro. En la tabla 1.3 se presentan algunas cifras reportadas de inhibición por sulfuro del proceso sulfatorreductor.

Tabla 1.3. Condiciones de inhibición de algunos procesos sulfatorreductores.
(Kaksonen *et al.*, 2004)

Sustrato	Condiciones	Sulfuro disuelto (mg S/L)	Inhibición
Etanol	Botellas séricas. Lodo anaerobio. pH 6.8	500-561	50%
Etanol	UASB, pH 7.1 - 8	1700	100%
Etanol	RLF, pH 6.9 - 7.3	248	
Acetato	Reactor en lote	521	50%
Acetato	Botellas séricas. Lodo UASB, pH 7.2 – 7.4	615	50%
Acetato	RLF, pH 6.9 - 7.3	356	

De acuerdo con estudios previos (Kaksonen *et al.*, 2004), se ha establecido que la inhibición por sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico depende del grado de disociación del ácido, el sulfuro puede presentar tres formas dependiendo del pH imperante, a saber, H_2S , HS^- y S^{2-} . De estos tres, el H_2S es el que se considera el agente con mayor capacidad tóxica por ser la especie que puede atravesar la membrana de las bacterias más fácilmente, por lo que en algunos reportes se ha llegado a recomendar que las condiciones de operación estén cercanas a pH 8 (Janssen *et al.*, 1998), donde se tiene un predominio de HS^- de alrededor del 90% lo que genera un ambiente menos tóxico para los diferentes grupos bacterianos especialmente si se trata de un proceso metanogénico.

En la figura 1.1 se presenta el esquema de predominio de especies del sulfuro de hidrógeno en función del pH y las regiones de máxima eficiencia tanto de las bacterias sulfatorreductoras anaerobias en general como de las productoras de metano, se puede observar que las bacterias metanogénicas (región más oscura de la figura) presentan un rango de pH más reducido que otras bacterias anaerobias como las sulfatorreductoras (región sombreada por líneas

diagonales), lo que lleva a que los procesos metanogénicos, bajo ciertas condiciones de operación lleguen a ser desplazados por un consorcio sulfatorreductor.

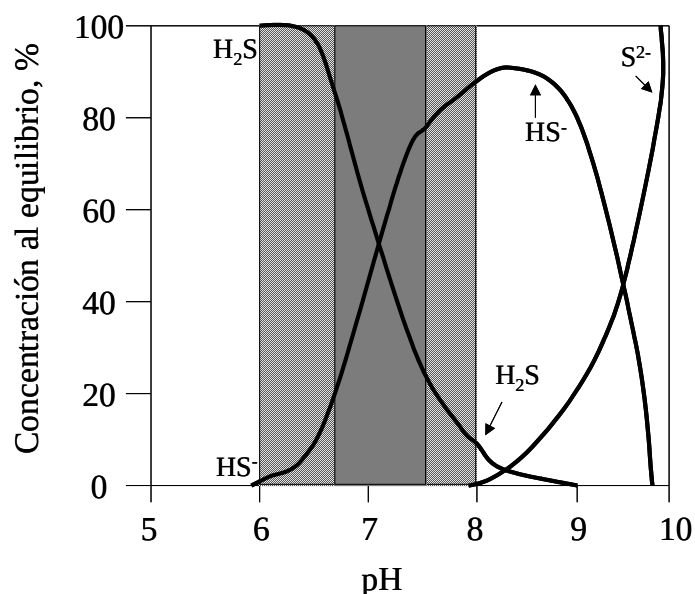


Figura 1.1. Predominio de especies del sulfuro de hidrógeno y regiones de máxima eficiencia de bacterias anaerobias (6-8) (región sombreada con diagonales) y de bacterias metanogénicas (6.5-7.5) (región obscura) como función del pH (Lens *et al.*, 1998)

Si bien las bacterias sulfatorreductoras pueden predominar en un proceso anaerobio, su permanencia y supervivencia en el mismo necesita de condiciones que favorezcan su actividad tales como un proceso de aclimatación de los lodos con sulfato y materia orgánica, así como condiciones de pH y temperatura adecuados (Visser *et al.*, 1993).

Algunas especies identificadas de bacterias sulfatorreductoras son *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Desulfovibrio salexigens*, *Desulfovibrio postagei*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter* y *Desulfotomaculum* (Fernández Polanco y García Encina, 2006), cada una de las cuales llega a tener preferencias propias de consumo en cuanto a la fuente de carbono, por lo que en algunos casos la utilización de una cepa pura puede llevar a maximizar la eficiencia de remoción de una cierta fuente de carbono (Herrera *et al.*, 1993; Krishnakumar *et al.*, 2005).

La mayoría de las cepas utilizadas en procesos sulfatorreductores llevados a cabo en reactores a nivel laboratorio o de mayor tamaño, son consorcios bacterianos que contienen no una sino múltiples especies, lo cual, si bien aumenta la complejidad de la mezcla reaccionante, resulta

mucho más conveniente si se busca obtener resultados que se puedan aplicar más directamente al tratamiento de aguas residuales a escala industrial, donde la fuente de carbono es muy variable. La tabla 1.4 presenta algunos procesos sulfatorreductores a nivel laboratorio publicados junto con aspectos relevantes en cuanto a su operación.

Tabla 1.4. Algunos reactores sulfatorreductores a escala de laboratorio cuyos resultados han sido publicados.

Autor	Tipo de reactor	Remoción de sulfato	Aspectos relevantes
Celis-García <i>et al.</i> , 2007	De lecho fluidizado de flujo descendente	57 mmol/L día	$DQO/SO_4^{2-} = 1.67 - 0.67$
Herrera <i>et al.</i> , 1993a	Reactor en lote (fermentador 1 L)	29 mmol/L día	pH= 7. Cepa pura. <i>Desulfovibrio des.</i>
Venkata Mohan <i>et al.</i> , 2005	Reactor en lote de biopelícula	32 mmol/L día	La carga orgánica determina la predominancia de especies sulfatorreductoras o metanogénicas
Jong y Parry, 2006	De flujo ascendente, lecho empacado	1.05 mmol/L día	Condiciones ácidas pH 4-6
Khanal y Huang, 2003, 2006	Filtro anaerobio de flujo ascendente, sulfatorreductor y metanogénico	92-98%	POR (utilizado para controlar entrada de oxígeno y bajar la toxicidad por sulfuro)
Kaksonen <i>et al.</i> , 2004	Reactor continuo de lecho fluidizado	NR	pH= 6.9-7.3 inhibición de BSR por sulfuro 248 mg/L. El acetato también puede ser inhibidor.

La mayoría de los reactores piloto de laboratorio para este tipo de procesos han sido continuos. Todos los reactores de la tabla 1.4 excepto el de Herrera *et al.* (1993) fueron operados con consorcios sulfatorreductores mixtos y se puede observar que los resultados de la remoción de sulfato son variados así como las diferencias en cuanto a la configuración del reactor y las condiciones de operación.

Celis-García *et al.* (2007) reportan una remoción considerable de sulfato mediante la operación del reactor a una relación DQO/SO_4^{2-} de 0.66, es decir, bajo concentraciones estequiométricas de mineralización total entre la fuente de carbono (lactato) y el sulfato presentes en el influente.

Por su parte, utilizando reactores discontinuos, Herrera *et al.* (1993a) y Venkata Mohan *et al.* (2005) muestran una remoción de sulfato a una relación similar en magnitud aunque menor en números reales que el reactor continuo de flujo ascendente reportado por Celis-García (2004). Herrera *et al.* (1993a) operaron el reactor discontinuo con una cepa pura de *desulfovibrio desulfuricans* y Venkata Mohan *et al.* (2005) estudiaron la comparación de factores críticos (pH, temperatura, alimentación de sulfato, alimentación de la carga orgánica (DQO)) para reducir o aumentar la eficiencia de los ciclos anaerobios, llegando a la conclusión de que la carga orgánica determina el predominio de especies de bacterias sulfatorreductoras o de bacterias productoras de metano, aspecto que ya había sido observado con anterioridad y por lo cual reactores continuos como el de Celis-García *et al.* (2007) buscaron una baja relación DQO/sulfato por favorecer el predominio de las bacterias sulfatorreductoras.

Una remoción de sulfato considerablemente más baja es obtenida por Jong y Parry (2006), aunque logran demostrar que bajo condiciones ácidas (pH 4-6) las bacterias sulfatorreductoras, si bien reducen su actividad, no la detienen del todo, sino que conforme se les somete a condiciones más alejadas de su umbral de actividad óptimo necesitan un mayor tiempo de aclimatación para llevar a cabo su actividad.

Adicionalmente, Kanksonen *et al.* (2004) realizan un estudio de toxicidad del sulfuro para la sulfatorreducción (ver tabla 1.3) obteniendo una inhibición del proceso sulfatorreductor a una concentración de 248 mg/L de sulfuro disuelto (cifra que varía bastante entre un autor y otro) así como encontrando evidencias de inhibición del proceso por acumulación de acetato, lo que les lleva a concluir que la eficiencia del proceso sulfatorreductor es sensible a sus propios productos, situación que favorece el uso de un reactor continuo por encima del reactor discontinuo que no cuenta con un control de dichos eventos en la operación.

Por otro lado, Khanal y Huang (2006) obtienen una eficiencia de remoción de sulfato de entre el 92 y el 98% mediante la contención de la toxicidad del sulfuro controlando la entrada de oxígeno mediante el seguimiento del potencial de óxido reducción (POR) del proceso.

De acuerdo con lo anterior, para el modelado y operación del proceso planteado en esta tesis, se deben estudiar y determinar los aspectos de operación relativos a la relación de alimentación DQO/sulfato, el pH del proceso y su evolución, así como factores como la producción de sulfuro y ácido acético que pudieran afectar el desempeño de la actividad sulfatorreductora que se busca estabilizar y operar en un reactor discontinuo.

Si bien la operación del reactor discontinuo plantea condiciones cambiantes del proceso, puede igualmente permitir que el consorcio bacteriano se aclimate de manera más especializada al proceso sulfatorreductor y sus productos.

1.3 El proceso sulfuroxidante

Se ha encontrado que diversos organismos, como la bacteria de azufre incolora, puede oxidar el sulfuro a azufre en condiciones aerobias (Janssen *et al.*, 1995) bajo un ambiente limitado de oxígeno (<0.1 mg/L). Las bacterias sulfuroxidantes, la mayoría de las cuales son litoautótrofas, utilizan al sulfuro como donador de electrones y carbonatos como fuente de carbono y requieren de un medio mineral más simple para su subsistencia que las bacterias anaerobias (Visser *et al.*, 1997). En su proceso metabólico el oxígeno es usado como aceptor final de electrones, dando un proceso químico descrito por las ecuaciones (1.1) y (1.2) donde el producto del proceso sulfatorreductor puede ser azufre o sulfato, dependiendo de la cantidad de oxígeno disponible.

El mecanismo por medio del cual se llevan a cabo las dos reacciones aquí planteadas se discutirá en la próxima sección.



Algunas especies de bacterias sulfuroxidantes identificadas son *Thiobacillus spp* (pH óptimo 7.5-8) (Krishnakumar *et al.*, 2005), *Thioalkalivibrio* y *Thioalkalimicrobium* (pH 8-10) (Sorokin y Kuenen, 2005), *Arcobacter sp.* (Wirsén *et al.*, 2002), entre otros.

Por otro lado, la sulfuroxidación también se lleva a cabo espontáneamente por un proceso de mera oxidación química. Entre los procesos no biológicos de remoción de sulfuro se encuentran el lavado directo con aire, la precipitación química y la oxidación con permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, aereación, cloración, ozonación, etc. (Janssen *et al.*, 1999) Estos métodos tienen altos costos químicos y de disposición de desechos, por lo que el uso de un bioproceso sulfuroxidante ha tenido ya aplicación variada con la intención de eliminar el sulfuro de corrientes tanto líquidas como gaseosas. En la aplicación de un bioproceso sulfuroxidante,

generalmente se obtiene como producto principal el sulfato al ser el sulfuro oxidado bajo condiciones de exceso de oxígeno.

Diversos trabajos realizados con reactores piloto sulfurooxidantes han tenido como objetivo la conversión del sulfuro a azufre elemental y otros se han centrado en el estudio del proceso sulfurooxidante y reportado la obtención de azufre elemental bajo condiciones de operación definidas.

En la tabla 1.5 se mencionan algunos reactores continuos sulfurooxidantes que han sido publicados. Celis García (2004) alimentó un reactor a partir del efluente de un proceso sulfatorreductor, obteniendo una conversión del 73% del sulfuro a azufre elemental manteniendo un pH de 8 constante, mientras que Krishnakumar *et al.* (2005) reportan una conversión mayor, a las mismas condiciones de pH, gracias a la regulación de la entrada de aire controlada mediante el potencial de óxido-reducción (POR).

Tabla 1.5. Algunos reactores sulfurooxidantes y aspectos relevantes de su operación.

Autor	Tipo de reactor	Conversión a S°	Aspectos relevantes
Celis García, 2004*	Continuo con aereación separada y recirculación	73%	pH = 8 con sistema para agregar HCl. Descarga de S° parte inferior del tanque. <i>Thiobacillus</i>
Velasco <i>et al.</i> , 2004	Continuo con aereación separada y recirculación	~100%	Oxidación parcial de tiosulfato a S°. pH= 5. <i>Thiobacillus</i>
Krishnakumar <i>et al.</i> , 2005	Fluidificado con recirculación	90-100%	pH = 8. POR con controlador conectado a compresor de aire
González-Sánchez y Revah, 2007	Continuo con aereación separada y recirculación	10%	Gran conversión a sulfato (no control) pH=10 Consortio alcalinofílico
Janssen <i>et al.</i> , 1998	Continuo de flujo de aire ascendente	80-85% 15% de SO_4^{2-} 0-5% de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	pH = 8 Set point POR 135 mV Relación $\text{O}_2/\text{H}_2\text{S}$ = 0.35-0.4

* Trabajo de tesis

Janssen *et al.* (1998) han reportado la posibilidad de obtener conversiones altas de azufre elemental a pH 8 con un control de oxígeno igualmente basado en potencial redox y operando a una relación $\text{O}_2/\text{sulfuro}$ de entre 0.35 y 0.4. La operación de la mayoría de los reactores a un pH de 8 obedece a la búsqueda de condiciones que favorezcan la actividad del consorcio de bacterias

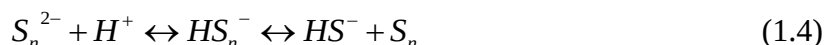
sulfuroxidantes además de que permiten mantener bajos niveles de H_2S disuelto, que es susceptible de transferirse a la fase gaseosa generando corrosión y contaminación fuera del reactor.

Dado lo anterior, la obtención predominante de azufre elemental por encima de sulfato en el proceso de oxidación aerobia de sulfuros y la integración del proceso de reducción de sulfato, requiere de una metodología de control de la cantidad de oxígeno a través del monitoreo de los eventos ocurridos en el proceso.

1.4 La sulfuroxidación y la formación de azufre elemental

La formación de azufre elemental por vía química o biológica ha sido caracterizada a partir de la oxidación de sulfuro bajo condiciones de limitación de oxígeno tal y como se plantea en la ecuación química (1.1). Estudios de espectroscopia de UV, de resonancia de espín electrónico y magnética nuclear realizados en diversos trabajos, han llevado a proponer los mecanismos a través de los cuales la oxidación de sulfuro tiene lugar en medio acuoso y cómo se forma el azufre elemental y otros compuestos azufrados.

De acuerdo con una revisión publicada por Steudel (1996) el proceso de oxidación del sulfuro comienza por la sustracción de un electrón y la formación de un radical libre ($HS^\bullet$) (ecuación 1.3). En presencia de más moléculas de sulfuro, el radical libre formado genera una reacción en cadena donde participan el disulfuro (H_2S_2), el dianión disulfuro (S_2^{2-}) y el anión disulfuro como radical libre ($S_2^{\bullet-}$). Estas dos últimas especies, en presencia de más sulfuro y en conjunción con la continuidad de la reacción planteada en la ecuación (1.3), culminan en la formación de polisulfuros (S_6^{2-} , S_7^{2-} , S_8^{2-} , S_9^{2-} , ..., S_n^{2-}) (ecuación 1.4), los cuales, bajo condiciones de acidez, son susceptibles de formar azufre, donde el anillo de ocho átomos de azufre es la especie más estable (S_8).



El planteamiento de la reacción (1.3) implica la existencia de un aceptor de electrones. Generalmente en este proceso interviene un metal capaz de fluctuar fácilmente entre dos estados de oxidación, el cual, tras reducirse, vuelve a oxidarse en presencia de oxígeno volviendo a su

estado de oxidación original, de tal suerte que la reacción global resultante es la expresada por la ecuación (1.1). Metales como V(V), Cu(II), Fe(III), Mn(III) y Co(III) se consideran catalizadores de reacciones de oxidación (Steudel, 1996).

A nivel biológico intervienen catalizadores más complejos como el citocromo *c* cuya posición dentro o fuera del citoplasma determina la formación de azufre intra o extracelular (Kleinjan, 2003), lo que lleva a que el azufre producido biológicamente pueda ser acumulado dentro o excretado fuera de la pared celular. En algunos estudios se afirma que el azufre acumulado intracelularmente le sirve a la bacteria como reserva de energía para momentos de carencia de sulfuro (generalmente en bacterias fotótrofes). Sin embargo, de acuerdo con Kleinjan (2003), la mayoría de las bacterias utilizadoras de compuestos de azufre excretan el azufre en vez de acumularlo en su interior (especialmente las quimiótrofas).

El azufre biológico y sus propiedades

Se ha encontrado que el azufre producido biológicamente tiene propiedades diferentes al azufre inorgánico típico, ya que presenta propiedades hidrofílicas, en contraposición con el azufre elemental inorgánico que tiende a ser hidrofóbico. Se ha reportado que en general los glóbulos de azufre producidos por las bacterias (figura 1.2) presentan propiedades coloidales y se ha sugerido que deben su carácter hidrofílico a que en su superficie suelen adsorberse proteínas que estabilizan a la partícula coloidal.

Coloides como los tipo sol de Weimarn tienen características hidrofóbicas y sin embargo se ha encontrado que pueden ser estabilizados por biopolímeros (Steudel, 2003a). La estabilización se logra gracias a las cargas negativas de los tensoactivos que se colocan en la superficie de la partícula coloidal permitiendo no sólo interactuar de manera más estable con el agua sino evitar la fusión de las partículas gracias a la repulsión coulombica entre ellas lo cual llevaría a la eventual precipitación.

Sobre las partículas de azufre en concreto, algunos estudios han mostrado que ciertas partículas de azufre biológico pueden estar conformadas por politionatos en su superficie ($\text{O}_3\text{S-S}_{n-2}\text{-SO}_3^- = \text{S}_n\text{O}_6^{2-}$) lo que podría igualmente explicar su hidrofiliidad (Steudel, 1996).

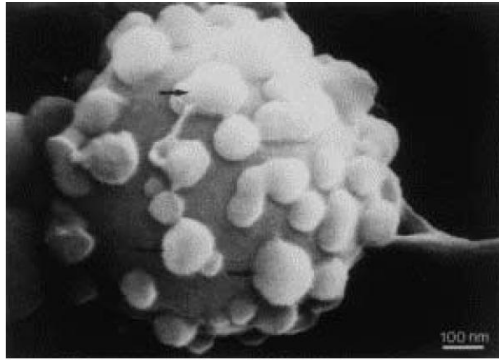
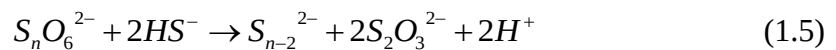


Figura 1.2. Micrografía electrónica de barrido de azufre excretado por el género *Thiobacillus*. (Janssen *et al.* 1999)

Los politionatos forman parte de los equilibrios de especies azufradas en un proceso sulfuroxidante, pudiéndose descomponer y o formar a partir de polisulfuros y tiosulfato (ecuación 1.5); estos compuestos son estables bajo condiciones ácidas por lo que una partícula de azufre estabilizada por éstos, puede precipitar por acción de un nucleófilo como hidróxido, amoníaco, sulfuro, etc.



Coloides de azufre tipo sol de Raffo o LaMer son preparados mediante la formación de politionatos (Steudel, 2003a). Si la cantidad de politionato disminuye, ocurre la cristalización y precipitación.

Si bien el origen de la estabilidad y la conformación de las partículas de azufre biológico está aún a discusión, la obtención de dicho tipo de azufre ha probado tener aplicaciones significativas como producto funguicida, nutriente para las plantas (Janssen *et al.*, 2009, Kleinjan *et al.*, 2003) y en la limpieza de sedimentos contaminados con metales pesados por biolixiviación.

Seidel *et al.*, (2006) reportan el efecto comparativo en la biolixiviación de metales pesados (ver figura 1.3) cuando se utiliza azufre inorgánico y cuando se utiliza azufre producido biológicamente. Se obtiene que el azufre biológico sin purificar tiene efectividad comparable con la del azufre técnico para eliminar los metales, además de mostrar cierta superioridad en la eliminación de manganeso, cobalto, cromo y plomo.

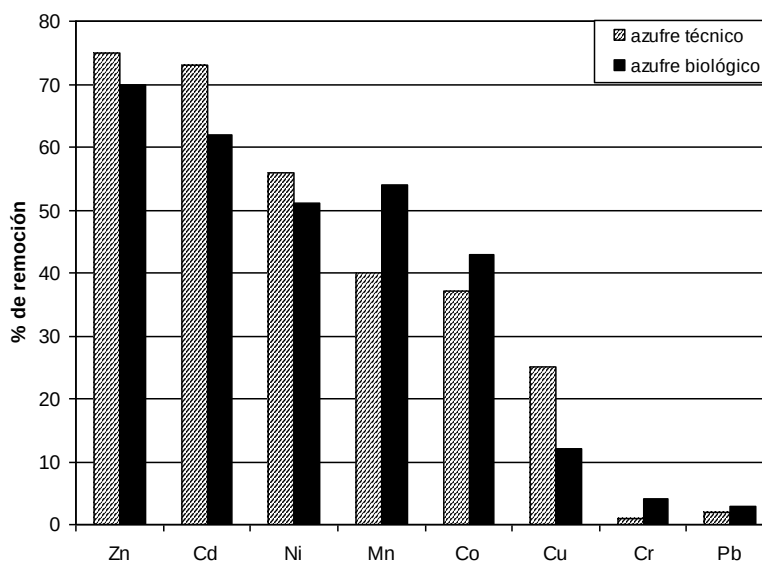


Figura 1.3 Comparación de remoción de metales pesados usando azufre técnico y azufre producido biológicamente en un proceso de biolixiviación (Seidel *et al.*, 2006)

En el caso de la biolixiviación el azufre biológico no sólo es mejor opción que el azufre inorgánico por la efectividad de remoción mostrada sino también por tratarse de azufre biológico desechado de un proceso sulfuroxidante sin ninguna purificación lo cual implica una reducción considerable en los costos respecto al uso de azufre inorgánico. La efectividad del azufre biológico en el proceso descrito se ha relacionado con sus propiedades hidrofílicas (Seidel *et al.*, 2006).

El ciclo del azufre y sus equilibrios

Siendo los polisulfuros los precursores del azufre, si los niveles de oxígeno son mayores a los necesarios para la producción de azufre elemental, se producen otras especies más oxidadas previas a la formación de sulfato, tales como los politionatos, el tiosulfato y el sulfito (SO_3^{2-}), los cuales igualmente se producen por reacción de aniones radicales libres con oxígeno. También se puede obtener sulfato y tiosulfato a partir de la hidrólisis de los politionatos (Barrett y Clark, 1987).

Dada la complejidad del proceso oxidativo del azufre, su formación en el tratamiento de aguas residuales implica llevar a cabo ciertos procesos del ciclo del azufre y evitar otros. La

figura 1.4 establece los principales equilibrios del ciclo del azufre y las rutas deseadas y no deseadas en el proceso que esta tesis plantea.

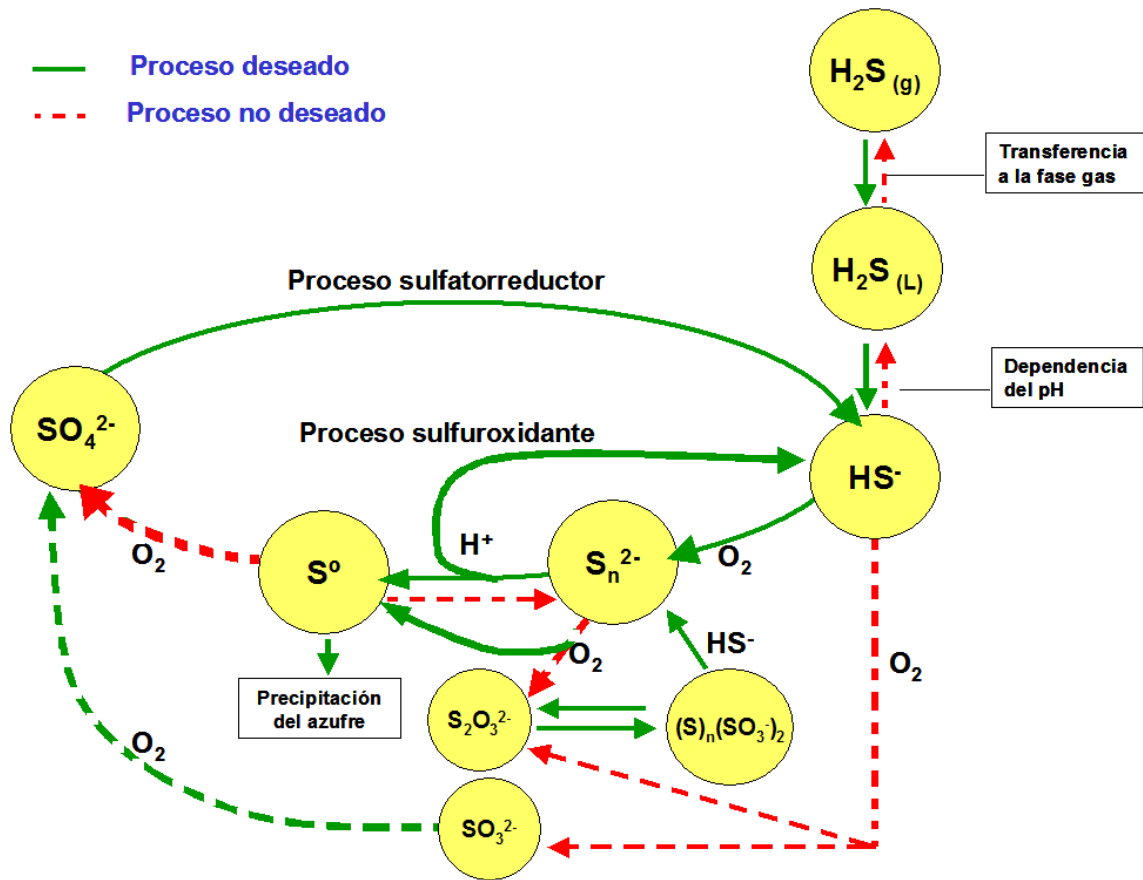


Figura 1.4. Ciclo del azufre de acuerdo con las reacciones de oxidación planteadas por Steudel (1996), junto con los procesos deseados y no deseados para la producción de azufre elemental

De acuerdo con la figura 1.4, para el tratamiento de una corriente rica en sulfatos, se debe buscar un proceso sulfatorreductor acoplado a un proceso sulfuroxidante para llevar la oxidación hasta azufre elemental buscando minimizar las pérdidas por transferencia del sulfuro producido al ambiente. Esto implica determinar las mejores condiciones de operación considerando al pH como un factor principal. Así mismo, la obtención del azufre elemental no sólo depende de los niveles de oxígeno sino también de otros factores.

Un estudio cinético y con mediciones experimentales de potencial redox y apoyado en la generación de diagramas de zonas de predominio de especies azufradas (González-Sánchez y Revah, 2007), ha mostrado que el azufre elemental, bajo un esquema meramente químico y bajo

condiciones de equilibrio termodinámico, únicamente es estable a valores de pH menores a 8 (figura 1.5) y en intervalos redox definidos.

Si bien este tipo de diagramas no son concluyentes para un sistema dinámico y donde el factor biológico está involucrado, sí dan una idea de la influencia del pH y el potencial redox como variables que inciden en el predominio de una u otra especie azufrada.

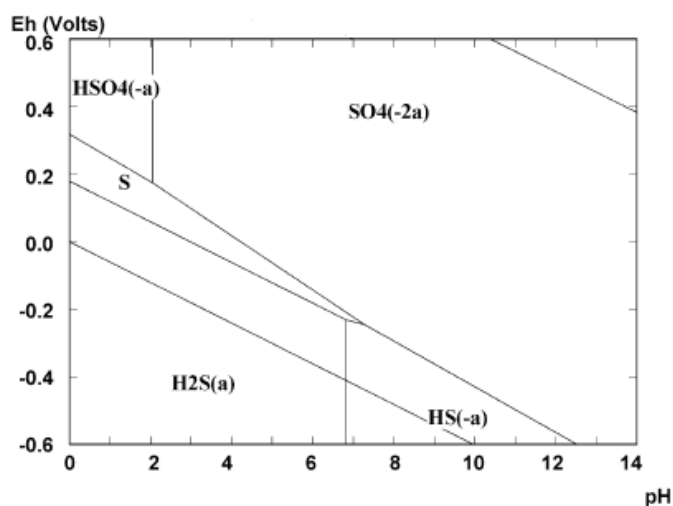


Figura 1.5. Diagrama de formación química y predominio de especies azufradas en un sistema acuoso en equilibrio a 30°C como función del pH y del potencial de óxido-reducción presente. (González-Sánchez y Revah, 2007)

De la ecuación (1.4) por ejemplo, se puede igualmente inferir que a valores de pH alcalinos la presencia del azufre decaería a favor de la formación de polisulfuros. Esto se refuerza por estudios que han probado el predominio de los polisulfuros a pH alcalinos.

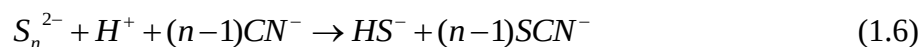
En la tabla 1.6 se presentan los resultados de los pK de formación obtenidos por Kamyshny *et al.* (2006) y un comparativo con los citados en trabajos previos. El pK corresponde a la función logarítmica del equilibrio planteado por la ecuación (1.4) para cada tipo de polisulfuro. Esta tabla permite apreciar como el equilibrio de los polisulfuros se presenta más bien a valores de pH alcalinos. El polisulfuro que aparentemente tiene el pK más bajo de acuerdo con estos hallazgos, correspondería al pentasulfuro que ya se ha reportado como predominante bajo condiciones alcalinas (González-Sánchez y Revah, 2007).

Actualmente, son pocos y complicados los métodos para la determinación de polisulfuros (Kariuki *et al.*, 2001). El método más utilizado sigue siendo por vía indirecta transformando los polisulfuros en azufre elemental mediante la adición de ZnCl_2 , y midiendo el azufre elemental por el método de Bartlett y Skoog (1954) donde se convierte al azufre en tiocianato bajo

condiciones ácidas, tal como lo muestra la ecuación (1.6) para posteriormente detectar el tiocianato por colorimetría mediante su acomplejamiento con cloruro de hierro.

Tabla 1.6. pK de formación de polisulfuros (Kamyshtny *et al.*, 2006)

Longitud del polisulfuro (n)	pK (-log de la cte. de formación)	Otros pK reportados
2	11.46	12.16-14.43
3	10.44	10.85-13.19
4	9.7	9.35-10.07
5	9.47	9.18-9.52
6	9.66	9.43-9.79
7	10.24	ND
8	10.79	ND



Las transformaciones potenciales de las especies azufradas del proceso sulfuroxidante hacen vislumbrar la necesidad de encontrar condiciones de operación que desplacen los equilibrios a favor de la formación de azufre elemental mediante un esquema de control que tenga en cuenta no sólo la aereación sino factores como el ambiente redox y el pH.

1.5 Los procesos combinados y las propuestas de control

La mayor parte de los procesos sulfatorreductores o sulfuroxidantes a nivel de laboratorio se han llevado a cabo en continuo y suelen involucrar solamente una etapa, ya sea la etapa aerobia (oxidación de sulfuro) o anaerobia (reducción de sulfato). En 1997 Van den Ende *et al.* llevaron a cabo pruebas en lote y en continuo de consorcios mixtos a pH 7.8 y a relación O₂/sulfuro de 0.5 obteniendo resultados positivos en cuanto a la factibilidad de mezclar ambos tipos de poblaciones bacterianas, encontrando de hecho que algunas bacterias sulfatorreductoras llegan a utilizar el azufre elemental, o el tiosulfato producidos en la sulfuroxidación, como aceptores de electrones y

que bajo condiciones de aereación las sulfatorreductoras pueden mantener su actividad en presencia de las bacterias sulfuroxidantes.

Diversas investigaciones utilizan técnicas analíticas o sensores para la cuantificación de las especies químicas involucradas (cuantificación de carbono orgánico, carbono inorgánico, ácidos grasos volátiles, sólidos suspendidos, sulfuro, sulfato, azufre elemental, tiosulfato) y de las variables de operación (pH, temperatura, potencial redox, etc.), sin embargo, sólo algunos trabajos plantean un seguimiento en línea de dichas variables con fines de control del proceso, el cual, junto con el diseño de los reactores, representa el medio por el cual es posible llevar al proceso a su optimización en términos de eficiencia de producto. El control de un proceso requiere contar con una o más variables de salida que proporcionen información lo más certera posible sobre la evolución del mismo, de tal modo que se desencadenen las acciones para mantener el proceso en el estado de operación deseado.

Janssen *et al.* (1998) han mostrado que el potencial redox es una variable utilizable para dar seguimiento a un proceso sulfuroxidante, situando el valor óptimo del potencial entre -147 y -135 mV (valores normalizados respecto al electrodo de hidrógeno) para la obtención de azufre elemental en un reactor continuo. En la figura 1.6 se muestra la variación del potencial redox con el tiempo para un reactor continuo con una carga variable de sulfuro y donde se aprecian lapsos de oxigenación.

El potencial de óxido-reducción es una medida de la tendencia de las soluciones a donar o aceptar electrones. Un ambiente muy oxidante produce un valor de potencial redox mayor, generalmente positivo, y un ambiente muy reductor produce un POR menor y tiende a valores negativos.

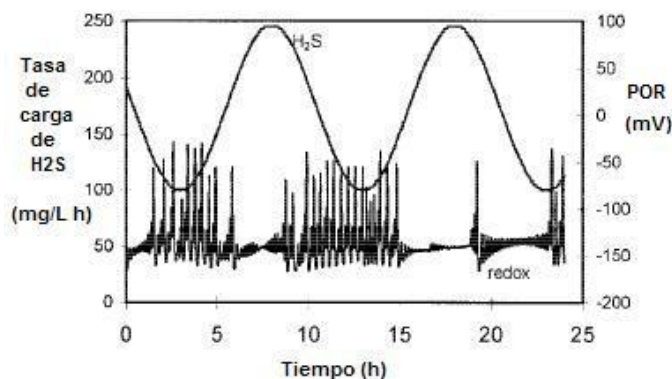


Figura 1.6. Señal de potencial redox (POR) para controlar por medio de oxígeno las fluctuaciones de la carga de H_2S en un reactor sulfuroxidante continuo (Janssen *et al.*, 1998)

Concretamente en los procesos del ciclo del azufre, los dos fenómenos más importantes de cambios redox están dados por los cambios en las especies del azufre y por la presencia del oxígeno. Sin embargo, es el cambio en las especies del azufre el que parece tener dominio en la señal de potencial redox tal como lo muestran Khanal y Huang (2006) (figura 1.7) al controlar la entrada de oxígeno por medio de la perturbación que se produce en el potencial redox del proceso sulfatorreductor, cuyo valor entre -290 y -300 mV, en gran medida impuesto por la presencia de sulfuro, se ve perturbado por +25 mV con la presencia de oxígeno.

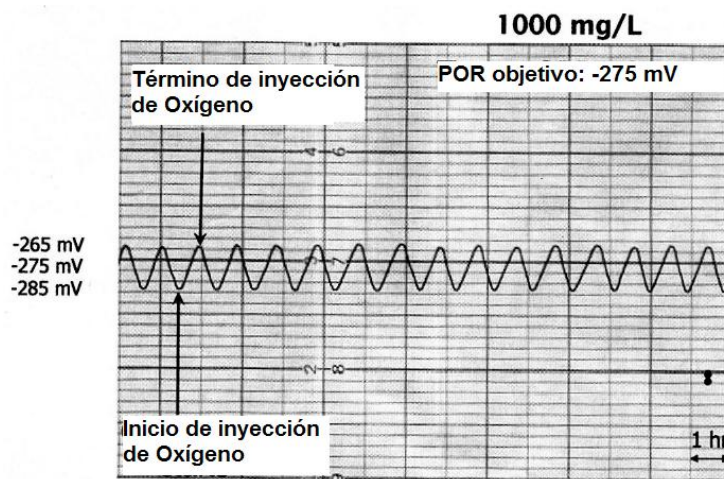


Figura 1.7. Variación de la señal del potencial redox (POR) propia del proceso de sulfatorreducción con la inyección de oxígeno. Esta inyección de oxígeno dosificada se lleva a cabo en este proceso con la intención de reducir la toxicidad por sulfuro en el reactor utilizado. (Khanal y Huang, 2003, 2006)

Es pues que el potencial redox podría ser utilizado como una variable de control para ambos procesos en virtud de su sensibilidad concretamente a la presencia del sulfuro, hecho que ya ha sido corroborado con resultados del presente trabajo.

Jong y Parry (2006) han usado el potencial redox en el proceso sulfatorreductor encontrando un rango de operación del proceso de entre -235 mV y -253 mV y correlacionando los cambios de pH, de potencial redox y de conductividad con la actividad bacteriana, encontrando que la conductividad presenta la mejor correlación, sin embargo, sus resultados no demostraron una ventaja significativamente clara de esta variable.

En otro tipo de procesos, ya se ha aplicado el potencial de óxido-reducción como variable de control (Buitrón *et al.*, 2003), combinando ambas etapas anaerobia y aerobia en un reactor discontinuo. Se desarrolló un algoritmo de control para monitorear el potencial redox y conocer el momento de la terminación de la etapa anaerobia en la que el *p*-nitrofenol se reduce a *p*-aminofenol. Dicho control mostró resultados satisfactorios y al final se logró una transformación del 80% de *p*-nitrofenol para después continuar el proceso con la etapa aerobia.

Otro proceso donde se utilizó el potencial redox como variable de control única fue en la degradación anaerobia y aerobia de un colorante azo (AO7) en un reactor discontinuo (Buitrón *et al.*, 2006). El algoritmo de control permitió detectar eficientemente el final de la etapa anaerobia llevando a una remoción del 90% del carbono orgánico total y del 85% del colorante azo presente. Se concluyó adicionalmente que sería posible igualmente controlar la etapa aerobia del proceso mediante el seguimiento del potencial redox.

Velasco *et al.* (2004) han planteado un proceso continuo sulfuroxidante con un sistema de aereación separada del reactor, y miden el oxígeno disuelto en línea en la entrada y salida del reactor así como en la salida del recipiente de aereación de tal modo que determinan el consumo de oxígeno y evalúan la cantidad de sulfuro a ser administrado para mantener la eficiencia en la obtención de azufre elemental. González-Blanco (2007) utiliza el oxígeno disuelto en línea como monitoreo del proceso pero sin un control formal. Krishnakumar *et al.* (2005) controlan la aereación para mantener el potencial redox en un nivel determinado para un proceso sulfuroxidante en continuo en un reactor de ciclo reverso fluidizado.

Así pues, el potencial redox, la conductividad, el oxígeno disuelto, el pH o alguna otra variable podrían utilizarse como variables de control, sin embargo, es necesario correlacionarlas experimentalmente con la evolución del proceso.

Los reactores discontinuos por su parte, por su naturaleza periódica, permiten una manipulación selectiva de diversas variables ambientales sobre los microorganismos, de tal suerte que la actividad de los mismos puede ajustarse de forma dinámica a condiciones cambiantes en la corriente que será tratada (Buitrón *et al.*, 2003). El tratamiento eficiente de contaminantes a través de biorreactores discontinuos implica no sólo encontrar las condiciones de operación idóneas para que las etapas del proceso tengan lugar, sino tener parámetros de operación que permitan establecer los tiempos de duración de cada etapa y la dirección de modificación de

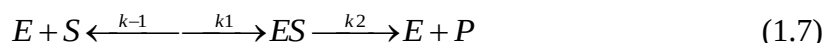
variables de proceso, tanto para las diferentes etapas como para el ajuste del proceso, debido a las condiciones cambiantes a las que las corrientes de entrada puedan estar sujetas. Por tanto, la optimización de un proceso de tratamiento implica el desarrollo de estrategias de control que permitan que el reactor continúe su funcionamiento a pesar de las variaciones que se pueden presentar en la corriente y que pueden llevar a la inhibición microbiana.

Por ejemplo, Buitrón *et al.* (2005) realizaron la evaluación de dos estrategias de control, una que lleva a cabo el llenado de un reactor discontinuo y realiza el monitoreo del final de la degradación de sustrato para detener la fase de reacción (estrategia VTC) y otra (estrategia OB-TOC) que va llenando el reactor discontinuo con la cantidad de contaminante necesaria únicamente para mantenerlo en el punto de máxima degradación de sustrato, alimentándolo gradualmente mientras se lleva a cabo la reacción hasta que se alcance el llenado máximo. Los resultados arrojaron que el control OB-TOC permite que el reactor continúe operando normalmente cuando una alta concentración de contaminante, presumiblemente proveniente de una fluctuación en las condiciones del influente, es introducida en el reactor, mientras que el control VTC deja al reactor vulnerable a caer en la inhibición de la actividad metabólica, o incluso a la desaparición de la misma cuando se le somete súbitamente a una concentración de contaminante alejada de las condiciones promedio de operación. Una estrategia de control similar a la de OB-TOC pero basada únicamente en el seguimiento de la rapidez de consumo de oxígeno y llamada ED-TOC fue desarrollada por Betancur *et al.* (2004) y utilizada por Moreno-Andrade *et al.* (2006) y mostró ser una estrategia muy robusta para mantener la degradación de 4-clorofenol en el punto máximo de eficiencia a múltiples condiciones de alimentación para un reactor discontinuo de alimentación gradual (Fed-Batch).

Es pues que el control de un proceso de tratamiento implica un conocimiento adecuado de lo que ocurre en el reactor, el cual debe llevar a poder definir cómo se comporta el proceso mediante parámetros medibles, y que puedan ser incluidos en un modelo del proceso a ser utilizado como referencia para predecir su comportamiento. Es por esto que parte del control del proceso requiere de su parametrización y modelado.

1.6 El modelado de los procesos biológicos

La mayoría de las reacciones que ocurren en los seres vivos, incluyendo las bacterias, son catalizadas por enzimas. La cinética enzimática (rapidez de las reacciones catalizadas por enzimas) ha sido tradicionalmente abordada bajo el modelo de Michaelis-Menten donde la enzima (E) se combina reversiblemente con su sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES) que posteriormente se disocia para dejar libre el producto (P) de la acción enzimática tal como lo muestra la ecuación (1.7).



donde k_{-1} , k_1 y k_2 son las constantes de rapidez asociadas a cada reacción. Bajo la consideración de que la concentración de la enzima generalmente es muy pequeña con respecto a la del sustrato (se asume una concentración constante del complejo ES mientras la reacción se está llevando a cabo) y tomando en cuenta la rapidez de la reacción como la rapidez inicial ejercida por la enzima inmediatamente después de que ésta se ha puesto en contacto con el sustrato, la ecuación de Michaelis-Menten tiene la forma:

$$v_o = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.8)$$

donde v_o es la rapidez inicial de la reacción, $v_{\max}$ es la rapidez máxima que se puede alcanzar en el consumo de sustrato, $[S]$ es la concentración del sustrato y K_m es la constante de Michaelis-Menten que es igual a $(k_1 + k_2)/k_1$, y que representa la afinidad de la enzima por el sustrato S y que es independiente de la concentración de la enzima. Numéricamente K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual la rapidez de reacción es igual a la mitad de la rapidez máxima. Un valor pequeño de K_m refleja una alta afinidad de la enzima por su sustrato y un valor grande de K_m implicará una baja afinidad por el sustrato (Vavilin y Lokshina, 1996).

La ecuación (1.8) es pues aplicable al fenómeno de utilización de sustancias químicas por parte de los grupos bacterianos para su subsistencia y crecimiento, por lo que ha sido la base para construir modelos de crecimiento bacteriano y de consumo de sustratos orgánicos e inorgánicos por parte de dichas poblaciones. En este sentido la ecuación de Michaelis-Menten se presenta utilizando una tasa de crecimiento específica (μ) como función de la concentración de un cierto sustrato, una constante de afinidad por dicho sustrato (K_S) y una tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$). Esta ecuación recibe el nombre de ecuación de Monod.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_s + [S]} \quad (1.9)$$

de donde se tiene que la tasa de crecimiento bacteriano r_B es igual a:

$$r_B = \frac{d[B]}{dt} = \mu[B] \quad (1.10)$$

donde r_B está dado en unidades de masa por volumen por tiempo, μ y $\mu_{\max}$ tienen unidades de tiempo⁻¹, y K_s , S y B tienen unidades de concentración siendo B la concentración volumétrica de los microorganismos.

La ecuación de Monod describe la tasa de crecimiento bacteriano bajo una cierta acumulación de sustrato y en la que este último no genera ningún estado de inhibición sobre el crecimiento bacteriano, es decir, que la presencia del sustrato a cualquier concentración tiene siempre una influencia positiva sobre el crecimiento bacteriano. La ecuación de Monod ha sido utilizada para la describir la degradación bacteriana de diversos sustratos orgánicos como metanol o ácidos grasos volátiles, entre otros (Gupta *et al.*, 1994; Vavilin y Lokshina, 1996; Omil *et al.*, 1998; Kaksonen *et al.*, 2006), sin embargo el aumento en los hallazgos sobre la complejidad y limitaciones de los procesos de degradación biológica ha llevado a la generación y uso de otros modelos que mejoren la descripción de los procesos. En la degradación de acetato por ejemplo, debido a la capacidad de inhibición sobre la biomasa que dicho sustrato tiene cuando se acumula demasiado (arriba de 250 mg/L (Metcalf y Eddy, 2003)), se ha utilizado la ecuación cinética de Haldane bajo la forma:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (1.11)$$

donde K_I es la constante de inhibición producida por el sustrato. Si el valor de dicha constante es muy alto la inhibición es despreciable por necesitarse de una muy alta concentración de sustrato para afectar el proceso y la ecuación de Haldane se reduce a la de Monod. En la figura 1.8 se aprecia el comportamiento comparativo de las ecuaciones de Monod y de Haldane.

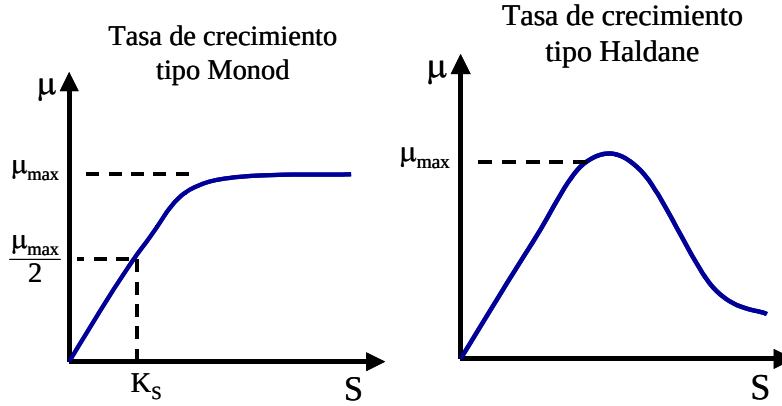


Figura 1.8. Gráficos del comportamiento de una tasa de crecimiento tipo Monod y Haldane como función de la concentración de sustrato.

A partir de ambas ecuaciones, diversos modelos con diferentes propuestas en cuanto a los parámetros que afectan a la tasa de crecimiento específica (μ) han sido presentados según las características de los sistemas estudiados. Vavilin y Lokshina (1996) obtuvieron parámetros cinéticos para la biodegradación de ácidos grasos volátiles comparando al mismo tiempo el desempeño de un modelo tipo Monod y un modelo que tomaba en cuenta la inhibición por la presencia misma de los ácidos grasos y por la producción de acetato. Las ecuaciones (1.12) presentan el planteamiento tradicional tipo Monod para la degradación de un sustrato S y el crecimiento asociado de la biomasa B . Las ecuaciones (1.13) presentan de forma general la corrección por inhibición utilizada por Vavilin y Lokshina.

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{[S][B]}{K_s + [S]}, \quad \frac{d[B]}{dt} = \mu_{\max} \frac{[S][B]}{K_s + [S]} - K_d[B] \quad (1.12)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{[S][B]}{K_s + [S]} \frac{1}{1 + [I]/K_I}, \quad \frac{d[B]}{dt} = \mu_{\max} \frac{[S][B]}{K_s + [S]} \frac{1}{1 + [I]/K_I} - K_d[B] \quad (1.13)$$

donde K_d es el coeficiente de decaimiento de la biomasa, I es la concentración de la especie considerada como inhibidor, K_I es la constante de inhibición e Y corresponde al coeficiente de producción máxima, esto es, la razón de la biomasa producida, entre la masa de sustrato consumido, por lo que estrictamente es una cantidad adimensional aunque se reporta como gSSV/gSustrato, donde los SSV (sólidos suspendidos volátiles) corresponden a la masa de los microorganismos. Vavilin y Lokshina obtuvieron resultados en cuanto al ajuste del modelo

inhibidor para un conjunto de datos experimentales de degradación de acetato, propionato y butirato. La capacidad predictora del modelo modificado tipo Monod les llevó a concluir que se podía utilizar la concentración total de acetato (considerado inhibidor) como inhibidor de hecho en vez de utilizar un modelo tipo Haldane pero usando sólo el acetato no ionizado como inhibidor.

Adicionalmente, les permitió concluir sobre aspectos de la población bacteriana y su régimen de consumo de ácidos grasos volátiles dado los tipos de inhibición que se verificaron en el cotejo del modelo con los datos experimentales. En un trabajo previo, Vavilin *et al.* (1994) plantearon un modelo para un reactor continuo alimentado con sulfato agregando a la función de la tasa de crecimiento tipo Monod, dos funciones de inhibición por pH y por concentración de sulfuro de tal suerte que la ecuación quedaba de la siguiente manera:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]f(H_2S)f(pH)}{K_S + [S]} \quad (1.14)$$

donde las dos funciones de inhibición para $I=pH$ o para $I=H_2S$ tenían la forma:

$$f(I, K_2, K_{100}) = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{K_2} \right)^{\left(\frac{\ln 99}{\ln \frac{K_{100}}{K_2}} \right)}} \quad (1.15)$$

donde K_2 y K_{100} corresponderían a la concentración de I a la cual la tasa de crecimiento haya descendido dos y cien veces respectivamente. El modelo fue calibrado con corridas experimentales de un sistema anaerobio donde se varió la relación DQO (acetato)/sulfato con la que se operaba, desde 60:1 hasta 2:1. Las simulaciones con dicho modelo arrojaron que cuando la relación DQO/sulfato disminuía 10:1, tanto la sulfatorreducción como la metanogénesis se inhibían, y concluyeron que los factores de falla del sistema eran la inhibición por pH y por H_2S .

Kalyuzhnyi *et al.* (1998) propusieron un modelo llamado “dispersed plug-flow model” para un reactor UASB (continuo de flujo ascendente de lecho de lodo anaerobio) que fue validado con resultados satisfactorios para describir datos experimentales de reactores de lodo granular alimentados con sulfato. Dicho modelo incluyó consideraciones de equilibrio físico, hidrodinámicas y cinéticas considerando cambios de concentración con respecto al tiempo y con respecto a la altura del reactor. Se tomaron en cuenta nueve grupos bacterianos entre las que se consideraron bacterias sulfatorreductoras, para las cuales concretamente, se propuso una

expresión de crecimiento específico (ecuación 1.16) en la que se consideró un término por influencia del pH, un término de inhibición por sulfuro de primer orden y un término para el sustrato de carbono S_i y otro para el sulfato como “sustrato complementario” ya que el sulfato funge como el aceptor de electrones en la oxidación de la materia orgánica por parte de las bacterias sulfatorreductoras.

$$\mu_j = \mu_{\max,j} \frac{[S_i][SO_4^{2-}](1 - [H_2S]/K_{i,j})f(pH)}{(K_{S,j} + [S_i])(K_{SO_4} + [SO_4^{2-}])} \quad (1.16)$$

donde μ_j es la tasa de crecimiento específica debida a la reacción de degradación “j” que se considere que las bacterias sulfatorreductoras sean capaces de llevar a cabo dentro del sistema. Los sustratos para las bacterias sulfatorreductoras considerados en el modelo de Kalyuzhnyi *et al.* fueron butirato, propionato, acetato e hidrógeno.

Es pues que, a partir de expresiones como la de Monod, se pueden agregar términos de influencia de sustrato o de inhibición a la ecuación de la tasa de crecimiento específica de acuerdo con las consideraciones y alcances del modelo. Finalmente se ha de decir que, si bien el planteamiento de la ecuación de Monod, y sus expresiones derivadas, sobre el crecimiento bacteriano como consecuencia necesaria bajo la presencia de sus sustratos, ha sido utilizada satisfactoriamente por muchos estudios, se ha observado también que existe una concentración límite de sustrato debajo de la cual no ocurre el consumo del mismo, incluso después de tiempos de incubación extensos. Este fenómeno no se prevé en la ecuación de Monod (ecuación 3) por lo que se han desarrollado otras expresiones que consideran el umbral mínimo de concentración consumible de sustrato (S_t), algunas de las cuales han logrado modelar lo ocurrido cerca de la concentración umbral mínima con más o menos deficiencias en la predicción de Monod a concentraciones altas de sustrato. Como ejemplo reciente, Ribes *et al.* (2004), partiendo de desarrollos anteriores, generaron la siguiente expresión modificada de la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S] - S_t f}{K_s + [S] - S_t f} F, \text{ donde } f = \frac{1}{1 + \exp(A(S_t - S))}, \text{ y } F = \frac{1}{1 + \exp(A(T - S))} \quad (1.17)$$

donde adicionalmente se tienen las relaciones: $A=100/S_t$, y $T=1.1S_t$. De tal forma que se agregan tres parámetros a determinar para un solo sustrato.

La consideración de una concentración umbral mínima debe tenerse en cuenta según las cantidades de sustrato que se encuentren presentes y la observación del sistema. Al día de hoy, sin embargo, los modelos más aplicados a procesos de biotratamiento de aguas residuales continúan utilizando el esquema de influencia del sustrato planteado en la ecuación de Monod, de Haldane o como expresión cinética de primer orden como la base para generar expresiones de modelado para el crecimiento bacteriano y su consumo de sustratos (Batstone, 2006).

El modelado y parametrización del proceso son de utilidad para plantear condiciones de control. Tanto los aspectos de operación necesarios bajo condiciones aerobias como anaerobias, las características del reactor, las variables más convenientes para el seguimiento de la actividad de degradación, así como el desarrollo de la mejor estrategia de control, son todos los puntos a considerar en la búsqueda del tratamiento óptimo de un efluente rico en sulfato con la obtención simultánea de azufre elemental. Controles para el pH y la oxigenación deben ser considerados en el planteamiento experimental así como los posibles fenómenos de inhibición, como es el caso de la concentración de sulfuro.

El estudio de un proceso discontinuo combinado y su control pueden permitir una mayor selectividad biológica, que impacte en las propuestas hasta ahora realizadas del proceso de tratamiento de aguas contaminadas con sulfato y su transformación a azufre elemental.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

1. Se puede mantener un proceso para conversión de sulfatos a azufre elemental en un reactor discontinuo que integre una fase anaerobia sulfatorreductora y una fase aerobia sulfuroxidante logrando una eficiencia sustentable en ambos procesos.
2. Se puede controlar el proceso combinado utilizando una variable como el potencial redox, el oxígeno disuelto y/o el pH utilizando sensores en línea de bajo costo.
3. Mediante un control en línea es posible evitar la inhibición bacteriana por factores como pH o acumulación de sulfuros así como garantizar un suministro de oxígeno durante la etapa aerobia que permita la biotransformación de sulfuros obteniendo azufre elemental y evitando su oxidación hasta sulfato.
4. El control del reactor discontinuo permite maximizar la obtención de azufre elemental en un proceso de tratamiento de agua residual.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de azufre elemental a partir de agua residual contaminada con sulfatos, en un proceso discontinuo anaerobio-aerobio controlado óptimamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar y caracterizar cinéticamente un consorcio microbiano para el proceso sulfatorreductor y el proceso sulfuroxidante utilizando dos reactores secuenciales para cada proceso.
2. Desarrollar un modelo que represente las reacciones del sistema, llevando a cabo su parametrización y su validación.
3. Evaluar las condiciones bajo las cuales el proceso sulfatorreductor coexiste con el proceso sulfuroxidante en un reactor discontinuo secuencial.
4. Seleccionar una metodología para el seguimiento en línea de las reacciones involucradas en el proceso mediante un sensor de bajo costo (Potencial redox, pH u oxígeno disuelto).
5. Implementar un piloto de laboratorio instrumentado y automatizado que integre tanto una fase anaerobia para la reducción de sulfatos como una aerobia para la oxidación de sulfuros a azufre elemental.

6. Llevar a cabo el tratamiento del agua residual rica en sulfatos maximizando la producción de azufre mediante una estrategia de operación y control.

ALCANCE

Este trabajo se llevará a cabo a nivel piloto de laboratorio, en donde se determinarán experimentalmente las condiciones de operación y control de un reactor biológico para el tratamiento eficiente de agua residual sintética rica en sulfato, buscando maximizar la obtención de azufre durante el proceso.

III. METODOLOGÍA Y MATERIALES

3.1 METODOLOGÍA

Inicialmente se llevó a cabo un estudio cinético de un proceso sulfatorreductor operado bajo condiciones anaerobias. De igual forma se llevó a cabo un estudio separado para determinar la cinética de la sulfuroxidación química y conocer el comportamiento del oxígeno disuelto para un proceso sulfuroxidante en lote a diferentes condiciones de aereación. Posteriormente se llevó a cabo un estudio de colonización de un soporte plástico por parte de un consorcio sulfatorreductor, y finalmente se implementó y operó un reactor para establecer las condiciones de operación y proponer una estrategia de control que llevara a la obtención de azufre elemental en un proceso discontinuo anaerobio-aerobio con el soporte plástico colonizado.

3.1.1 Caracterización cinética del proceso sulfatorreductor

Se implementó un reactor en lote con 2 litros de volumen de trabajo. El reactor fue inoculado con lodo granular proveniente de un reactor anaerobio de flujo ascendente que operaba en una planta de tratamiento del efluente de una instalación cervecera, en combinación con lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal para dar 2.7 g/L de biomasa como sólidos suspendidos volátiles. En la figura 3.1 se muestra el esquema del reactor utilizado.

El reactor fue alimentado con agua residual sintética compuesta por nutrientes provenientes de un medio mineral (Bayoumy *et al.*, 1999, Celis-García *et al.*, 2004) tal como se reporta en la sección de materiales de este capítulo, además de sulfato de sodio y ácido láctico como sustrato orgánico. Se llevó a cabo la alimentación en ciclos de duración variable, de tal modo que el ciclo se detenía cuando el reactor había reducido todo el sulfato. Conforme la duración del ciclo era similar uno tras otro, se consideró que el proceso en lote había alcanzado un estado estable de reducción de sulfato y producción de sulfuro.

Así pues, una vez alcanzado dicho estado, la operación del reactor consistió en 3 ciclos diarios de 8 horas incluyendo las siguientes etapas: 30 minutos de sedimentación del lodo, 2 minutos de vaciado del 60% del volumen total, 2 minutos para llenado y el resto del tiempo del ciclo de reacción se realizó con agitación continua.

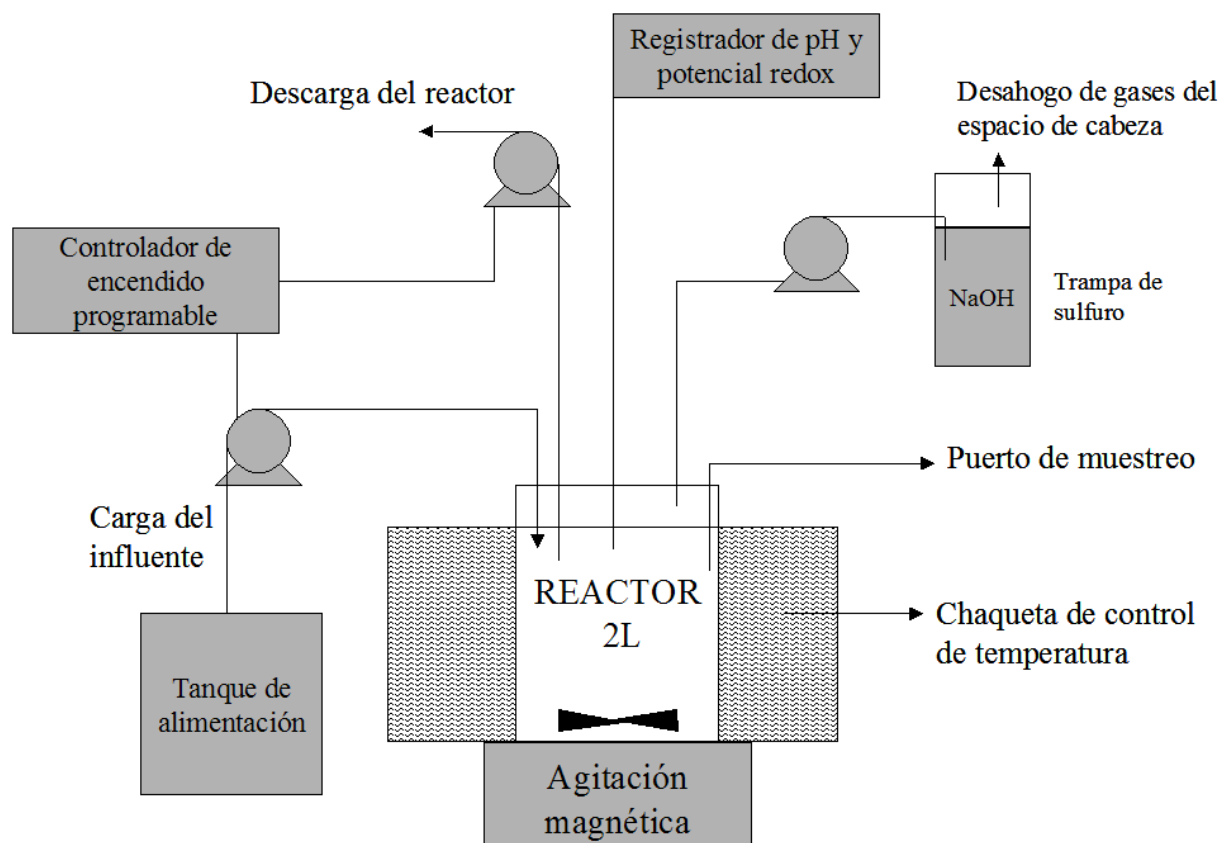


Figura 3.1. Esquema del sistema de sulfatorreducción utilizado

Se llevó a cabo un seguimiento del proceso a partir de la medición de los principales compuestos involucrados, a saber, sulfato, sulfuro, ácido láctico, ácido acético y carbono total orgánico e inorgánico, buscando conocer mejor el tipo de reacciones involucradas en el sistema así como evaluar la inhibición por sulfuro del proceso y parametrizar un modelo que representara cinéticamente la sulfatorreducción.

Para la evaluación de la inhibición del proceso por sulfuro se propusieron cuatro condiciones experimentales variando en un caso la cantidad de sustrato orgánico disponible (como demanda química de oxígeno teórica, (DQO)), cambiando de este modo la relación de alimentación DQO/sulfato y en otro caso, variando la concentración de sulfuro acumulado mediante el lavado del mismo a través del burbujeo constante de nitrógeno en el reactor. En la tabla 3.1 se indican estas condiciones, para todas las cuales, se comenzó la reacción con una concentración de 20 mM de sulfato. El reactor operó constantemente a 30°C y un pH inicial de 7.0.

Tabla 3.1 Condiciones experimentales para el sistema sulfatorreductor

Relación gDQO/g sulfato alimentada	Concentración inicial de ácido láctico (mM)	Lavado de sulfuro con N₂
2	40	No
2	40	Sí
6	120	No
6	120	Sí

Durante las corridas experimentales se llevaron a cabo mediciones de sulfato, sulfuro, lactato, acetato, carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico total, así como de pH y potencial de óxido-reducción. Las técnicas analíticas con las cuales se midieron los diferentes compuestos son descritas en una sección posterior así como el procedimiento de calibración del pH y del potencial redox cuyos valores han sido referenciados al potencial del electrodo de hidrógeno.

Una vez realizados los experimentos descritos, se buscó proponer un modelo de acuerdo al comportamiento del sistema observado y se buscaron obtener los parámetros cinéticos propios del sistema sulfatorreductor mediante el ajuste del modelo a los datos experimentales. Los ajustes tanto lineales como no lineales se llevaron a cabo a través de un programa de computadora utilizando el método de aproximación Levenberg-Marquardt.

En la sección de resultados se presenta y discute el balance de materia de los ciclos del proceso en términos molares.

3.1.2 Estudio de la cinética del proceso sulfurooxidante

Se llevaron a cabo mediciones experimentales que permitieron calcular los parámetros de la cinética de la sulfurooxidación química. También se llevó a cabo el montaje de un reactor sulfurooxidante para determinar qué le ocurre a las especies azufradas durante el proceso y cómo cambian durante el mismo las variables cuyos sensores en línea se fueron elegidos como posibles variables de control (pH, potencial de óxido-reducción y oxígeno disuelto).

Parametrización de la sulfuroxidación química

La determinación de los parámetros de la cinética química se llevó a cabo mediante mediciones respirométricas. La figura 3.2 muestra el respirómetro utilizado, el cual tiene un volumen de 50mL y cuenta con un sensor de oxígeno YSI modelo 5331 y un medidor YSI modelo 5300 Biological Oxygen Monitor (Ohio, EUA), así como un registrador de pluma Cole-Parmer modelo 202 (EUA). El sensor atraviesa un tapón de hule que sella el respirómetro, el cual así mismo cuenta con dos entradas adicionales para la inyección de otros medios. En la prueba se agrega dentro del respirómetro el medio mineral, previamente saturado con oxígeno (concentración cercana a 7 mg/L a 25°C y 1 atm), se sella con el tapón que contiene el sensor sin introducir burbujas de aire y después se agrega el sulfuro por inyección una vez que la lectura del oxígeno disuelto se ha estabilizado por al menos un minuto bajo agitación continua.

De esta manera es posible obtener una curva de disminución del oxígeno disuelto con respecto al tiempo debido a la oxidación del sulfuro presente, y así se pueden determinar, mediante el ajuste a un modelo cinético, los parámetros de la sulfuroxidación (la constante de rapidez y los ordenes de reacción) bajo las condiciones en que la respirometría haya sido llevada a cabo.

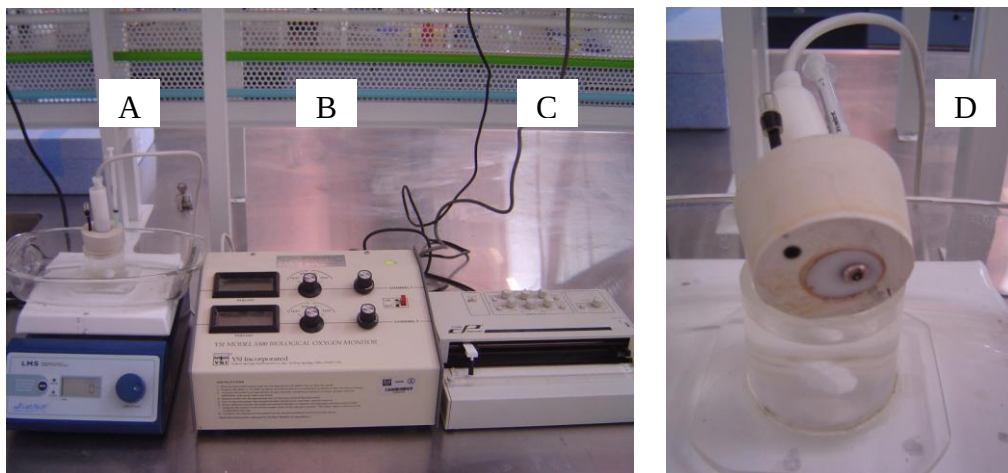


Figura 3.2 Imagen del equipo de respirometría. **A.** Respirómetro y parrilla de agitación, **B.** Transmisor de la señal de oxígeno disuelto, **C.** Registrador, **D.** Detalle del sensor de oxígeno usado en el respirómetro

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la sulfuroxidación química en este caso, se eligieron diversas concentraciones de sulfuro de entre 0.1 y 6 mM como concentración inicial a reaccionar con el medio saturado con oxígeno. Igualmente se llevaron a cabo variaciones de la concentración inicial de oxígeno disuelto desde 6 hasta 1 mg/L de O_2 a una concentración inicial fija de sulfuro de 2 mM. Las diferentes condiciones experimentales permitieron el cálculo de los parámetros cinéticos de sulfuroxidación química tal y como se explica en la sección de resultados. A lo largo de todas las corridas experimentales, el respirómetro se mantuvo a 30°C y se realizaron con la previa calibración del sensor de oxígeno y del sistema de registro.

Relación entre la oxidación del sulfuro y el oxígeno disuelto en línea

Por otro lado, se montó un reactor de 2 litros de capacidad considerando 1.5 litros de volumen de trabajo de acuerdo al esquema presentado en la figura 3.3. El reactor contó con un baño de agua para mantener la temperatura constante a 30°C, líneas de alimentación y de descarga, línea de aereación con un difusor de aire, sistema de agitación magnético y entrada para sensores de pH, potencial de óxido-reducción y/o oxígeno disuelto. A la salida de aire se le colocaron trampas de NaOH 0.5 M para captar el sulfuro lavado por la aereación.

El reactor fue inoculado con 150 mL de lodos provenientes de una planta de tratamiento por lodos activados y con 50 mL de lodos recolectados en una laguna sulfurosa para dar al inicio 360 ± 40 mg/L de SSV. El reactor se alimentó con medio mineral sulfuroxidante (Celis-García *et al.*, 2004, González-Sánchez *et al.*, 2005) de acuerdo a lo indicado en la sección de materiales, además de sulfuro de sodio ($Na_2S \cdot 9H_2O$) para una concentración inicial promedio de 4.5 mM y 1g/L de $NaHCO_3$ como fuente inorgánica de carbono. El pH inicial siempre se ajustó a 8 para disminuir la cantidad de sulfuro que se lava por la aereación.

El reactor se operó por 5 meses midiendo el desempeño sulfuroxidante mediante el seguimiento de producción de sulfato (de acuerdo hasta que el reactor se mantuvo estable en una conversión de sulfuro a sulfato de 2.83mM/ día. Posteriormente se comenzó a alimentar con el efluente del reactor sulfatorreductor para una concentración inicial de 6.7 mM de HS^- , y se conectó a la línea de aire un controlador de flujo másico para conocer la cantidad de aire suministrada al reactor, tras lo cual se llevaron a cabo pruebas de medición en línea con los sensores de oxígeno disuelto y pH, en las cuáles se cuantificaron igualmente las diversas especies

azufradas a lo largo del proceso oxidativo para evaluar la interrelación de las señales en línea con lo que ocurre en el proceso sulfuroxidante en términos de la transformación de dichas especies.

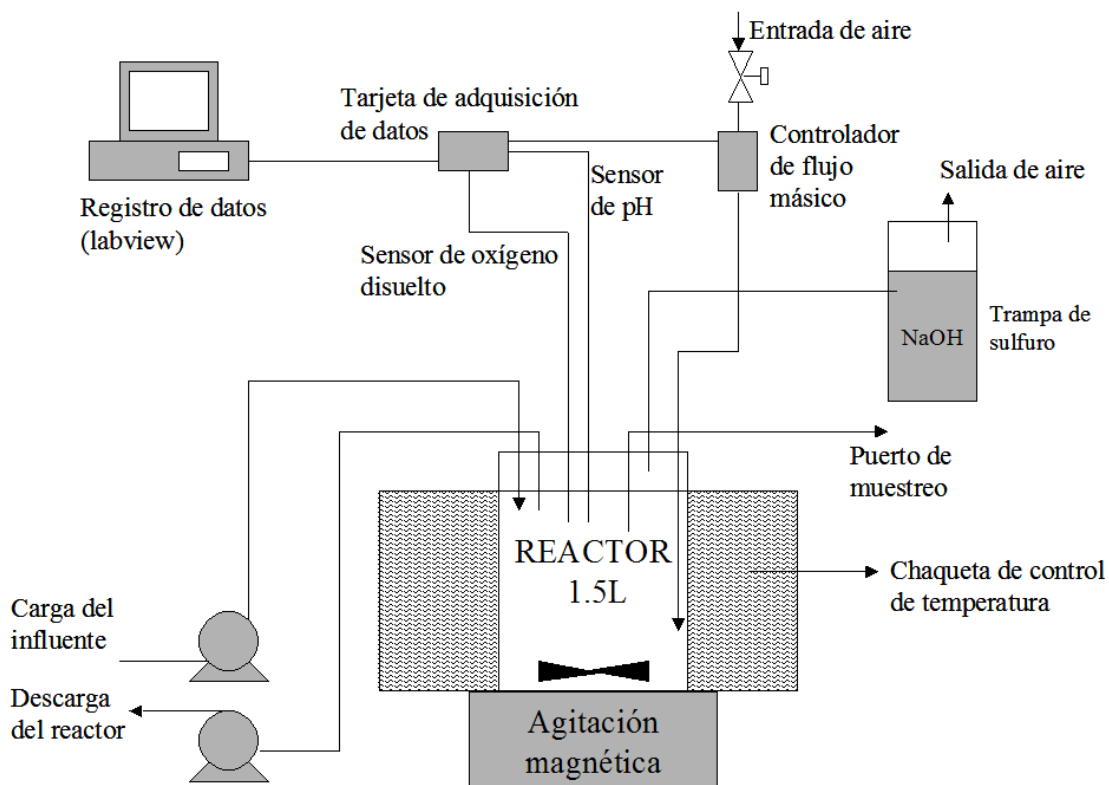


Figura 3.3. Esquema del reactor de 2 L utilizado para las mediciones de oxígeno disuelto En los ciclos sulfuroxidantes para diferentes condiciones de aereación.

Todas las especies químicas se midieron tomando muestras del reactor para la cuantificación de sulfato, sulfuro, azufre elemental y carbono inorgánico así como sólidos suspendidos volátiles, todo de acuerdo con las técnicas descritas en la sección 3.2.3. En la sección de resultados se presenta y discute el balance de materia del sistema calculado en moles.

3.1.3 Estudio de la colonización de un soporte plástico por parte de un consorcio sulfatorreductor

Con la intención de poder contar con un lecho móvil para el reactor anaerobio-aerobio, se evaluó la colonización de un soporte plástico por parte del consorcio sulfatorreductor. Para ello se operó un reactor sulfatorreductor inoculándolo con la biomasa suspendida remanente del reactor

sulfatorreductor utilizado en la primera etapa de caracterización cinética (2 g/L de SSV), así como con 150 mL de lodos provenientes de una laguna sulfurosa para dar 3.02 ± 0.06 g/L de SSV. Se llevó a cabo una alimentación y seguimiento del proceso y se operó al reactor de manera similar a la descrita en la primera etapa, es decir, se alimentaba con medio mineral de acuerdo con Celis-García *et al.* (2004) y Bayoumy *et al.* (1999) y con aproximadamente 20 mM de sulfato, utilizando lactato como fuente de carbono.

De acuerdo con hallazgos de consumo de sulfato en la sección de parametrización cinética, se determinó que la concentración inicial de lactato en cada ciclo debía de ser la suficiente para dar una relación DQO/sulfato de 2.4 la cual permitiría el consumo total del sulfato. Así pues el reactor sulfatorreductor mencionado se alimentó bajo dicho régimen en ciclos de 12 horas. El reactor operó con un baño de temperatura constante de 30°C bajo el mismo esquema del de la etapa de caracterización cinética, a un volumen de trabajo de 2 litros con un intercambio de 1.2 litros en cada ciclo. El sistema se mantuvo cerrado para minimizar la entrada de aire al mismo a lo largo de los ciclos, lo que implicó que el espacio de cabeza del reactor contuviera continuamente una mezcla de aire con sulfuro de hidrógeno. Una vez que el reactor mantuvo una remoción total de sulfato en el tiempo de ciclo de 12 horas de manera continua, se introdujeron los empaques plásticos que serían los soportes para la colonización de la biomasa suspendida, esto con la finalidad de utilizar dichos empaques colonizados para operar el reactor del proceso combinado.

Inicialmente se introdujeron 150 empaques de polietileno con un área específica de 963 m²/m³ y densidad 0.95 g/cm³. Las especificaciones completas del empaque se establecen en la sección 3.2 de materiales. Tras introducirlos al reactor sulfatorreductor se continuó la alimentación sin ningún cambio. Después de 32 ciclos de alimentación (16 días), se comenzó a medir la actividad sulfatorreductora de los mismos sin la biomasa suspendida. Lo cual se continuó haciendo periódicamente tal como se reporta en la sección 4.3 de resultados. Tras un mes de operación, se agregaron otros 650 empaques para totalizar 800 dentro del reactor. Lo anterior se hizo debido a que se buscó que los empaques totalizaran el 40% del volumen de trabajo pues se consideró que 150 empaques representaban una cantidad poco significativa para el tamaño del reactor.

La colonización del empaque se asoció a la actividad sulfatorreductora de los empaques. El procedimiento para su determinación fue el siguiente: se colectó el 10% de los mismos del

reactor y se introdujeron en un recipiente únicamente con medio mineral a la misma temperatura del reactor para minimizar consecuencias por choque térmico. Enseguida se lavaron en dicho medio por aproximadamente 10 minutos con agitación para retirar parte del medio de reacción proveniente del reactor así como separar aquella biomasa y residuos no adheridos al empaque.

Posteriormente, se introdujeron en un recipiente pequeño y cerrado que contenía un volumen de medio de reacción de 200 mL con la misma mezcla inicial de alimentación utilizada para el reactor de 2 litros. Una vez introducidos los empaques en dicho medio, se midió el consumo de sulfato muestreando 5 mL por varios espacios de tiempo para conocer el grado de capacidad sulfatorreductora de los empaques tentativamente colonizados. La prueba se realizaba por 24 horas, y el recipiente era mantenido en un baño a temperatura controlada (30°C) y agitación constante. Estas mediciones permiten determinar que efectivamente la biomasa que ha colonizado el soporte plástico es biomasa sulfatorreductora, pues es la que interesaba que se pegara al soporte.

3.1.4 Operación y estrategia de control de un reactor discontinuo anaerobio-aerobio

Tras las pruebas de colonización se puso en marcha un reactor en lote de 7.5 litros de capacidad máxima y 5 litros de volumen de trabajo para operarse bajo un régimen combinado de ciclos tanto anaerobios como aerobios (figura 3.4).

Fase de estabilización biológica sulfatorreductora

Para la operación del reactor, se buscó estabilizar primeramente el ciclo anaerobio y colonizar el lecho móvil, por lo que fue inoculado con lodo granular proveniente de un reactor anaerobio de flujo ascendente que operaba en una planta de tratamiento del efluente de una instalación cervecera, en combinación con la biomasa suspendida del sistema sulfatorreductor de 2 litros con el que se hizo la prueba de colonización del empaque (aproximadamente 2 g de sólidos suspendidos volátiles). Así el reactor inició operaciones con 1 g/L de sólidos suspendidos volátiles y 2500 empaques de polietileno como los mencionados en la sección anterior, los cuáles abarcarían aproximadamente un 50% del volumen de trabajo del reactor, es decir,

aproximadamente 2.5 litros. El medio mineral y la cantidad de sulfato alimentado fue la misma que para el reactor de la prueba de colonización, es decir, con aproximadamente 20 mM de sulfato y usando lactato como fuente de carbono.

Desde el primer ciclo se observó que con una relación de alimentación lactato/sulfato de 0.66 el consumo sulfato era de aproximadamente el 40%, por lo que se elevó dicha relación de alimentación a 2.4 tal y como se había venido alimentando la biomasa del reactor de 2 L. El reactor de 5 L se sometió a ciclos variables conforme se llevaba a cabo la reducción total de sulfato. Una vez lograda la estabilización del reactor se llevaron a cabo seguimientos cinéticos para obtener el desempeño de los ciclos anaerobios mediante la cuantificación de las especies azufradas y los compuestos carbonados. Se siguió la evolución de los sólidos suspendidos volátiles en el reactor así como la colonización del empaque a través del método de cuantificación de proteína de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) con ligeras modificaciones (Markwell *et al.*, 1978, Stoscheck, 1990) para medir indirectamente la biomasa a través de la cantidad de proteína presente en los empaques. La técnica de cuantificación de proteína se describe a detalle en la siguiente sección.

Fase de seguimiento de variables en línea y aplicación de etapas sulfuroxidantes

Se acoplaron sensores de oxígeno disuelto, pH y potencial de óxido-reducción al reactor para dar seguimiento a los ciclos del mismo. Posteriormente se procedió a realizar ciclos sulfuroxidantes tras los ciclos anaerobios. Se buscó controlar el pH cercano a 8 en los ciclos oxidativos, que se llevaron a cabo a un flujo de aire de 500 mL/min. Se cuantificaron las especies azufradas como sulfato, sulfuro y azufre elemental así como los compuestos carbonados como el ácido láctico y el ácido acético.

Se estableció un esquema de operación de diversos ciclos oxidativos para determinar la manera de operar el reactor para garantizar la continuidad de la eficiencia anaerobia tras las etapas aerobias. Para ello se evaluaron los posibles factores que afectaban la continuidad de la sulfatorreducción tales como los cambios de pH, de potencial redox, de concentración de sulfuro y de tiempo de duración de la etapa oxidativa. Una vez establecido el criterio de operación se llevaron a cabo ciclos continuos para evaluar la factibilidad de operar el reactor bajo el régimen anaerobio/aerobio con la posibilidad de ser controlado mediante alguna de las variables medidas

en línea. Los sensores utilizados fueron calibrados de acuerdo a como se indica en la sección 3.2.3. Los valores de potencial redox obtenidos fueron corregidos al valor de referencia del electrodo de hidrógeno. Las evidencias para sustentar la propuesta de control del proceso se discuten en la sección de resultados.

Determinación del grado de sulfuroxidación química y/o biológica

Se determinó en el reactor anaerobio / aerobio, la actividad química y biológica sulfuroxidante, tras las últimas pruebas de ciclos continuos. Para ello se utilizó el equipo de respirometría descrito en la sección 3.1.2 y mostrado en la figura 3.2. Las respirometrías realizadas se llevaron a cabo por triplicado utilizando un mismo equipo y bajo condiciones comparables. Se llevó a cabo la sulfuroxidación química así como la sulfuroxidación debida a los empaques.

Se utilizó para todas las corridas una concentración de sulfuro 2 veces mayor a la concentración máxima de oxígeno disuelto, es decir, 0.4mM de HS^- . Se utilizaron 24 empaques en los 60mL del respirómetro por cada prueba, utilizando así una cantidad proporcional de empaques respecto de la encontrada en el reactor. Previo al experimento, los empaques se sacaron del reactor y se dejaron en reposo por media hora en un medio mineral anaerobio sin levadura ni sulfato bajo condiciones de pH 7.0 y 30°C para retirar el sulfuro remanente buscando no afectar a la biomasa en el empaque. Posteriormente, dichos empaques se colocaron en el respirómetro con 60mL de medio mineral saturado con oxígeno a 30°C, y rápidamente se tapó el respirómetro para comenzar a registrar el consumo de oxígeno. Esta corrida experimental carente de sulfuro corresponde a la respiración endógena.

Posteriormente se llevó a cabo la respiración biótica en la cual se introdujeron los empaques y se inyectó el sulfuro registrándose la curva de consumo de oxígeno contra el tiempo durante 20 minutos. A la sulfuroxidación biótica se le restó la sulfuroxidación química y la respiración endógena. En la sulfuroxidación química se llevó a cabo el mismo procedimiento inyectando la misma cantidad de sulfuro pero sin introducir empaques al respirómetro. De este modo es posible determinar si existe o no sulfuroxidación biológica llevada a cabo por algún grupo de bacterias presentes en los empaques colonizados. Cada una de las curvas de sulfuroxidación se registraron durante los primeros 20 minutos.

3.2 MATERIALES Y TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.2.1 Reactor y equipo accesorio

Para la etapa de ciclos combinados, se diseñó, construyó y montó un reactor piloto de laboratorio con una capacidad máxima de 7.5 litros para operar únicamente con 5 litros dejando el resto como espacio de cabeza. En la figura 3.4 se presenta la imagen del reactor utilizado con sus accesorios.

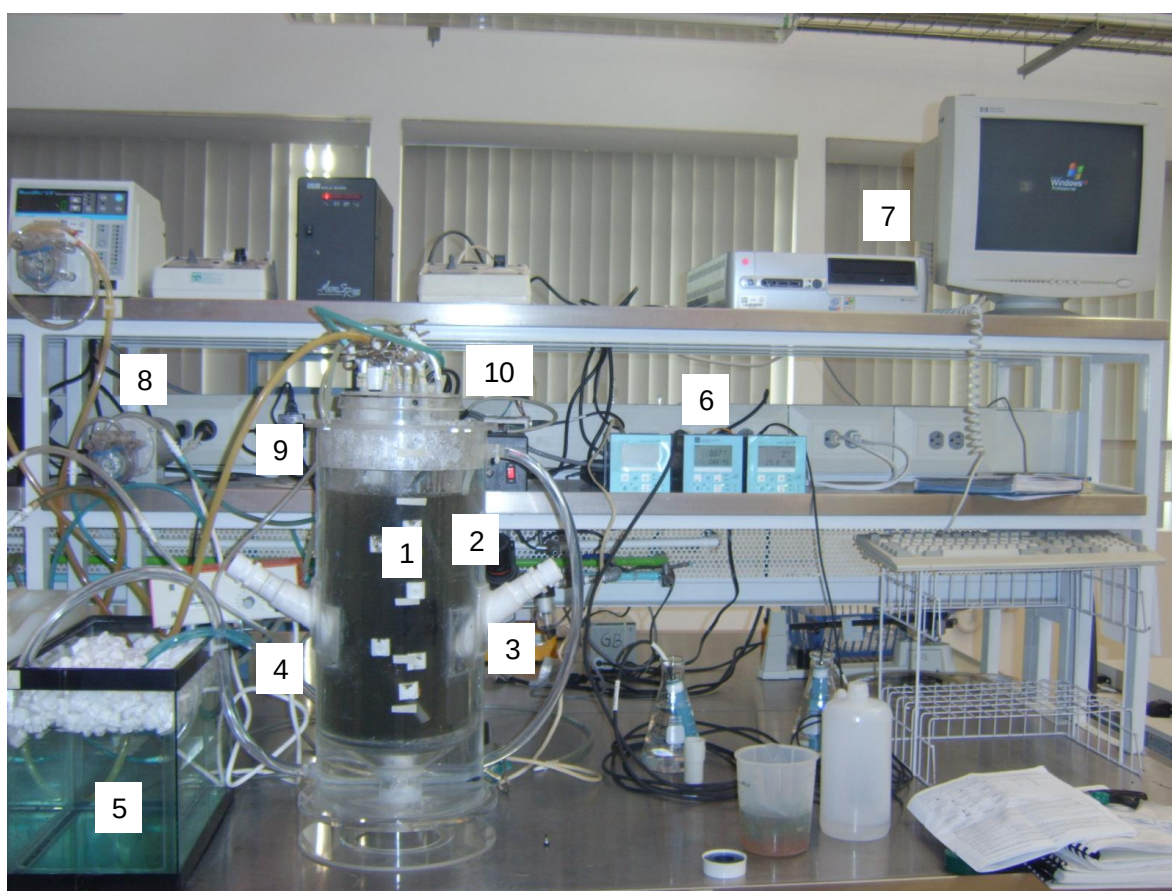


Figura 3.4. Imagen del reactor piloto construido. 1. Reactor principal, 2. Chaqueta para baño de agua, 3, 4. Entradas para sensores de pH y potencial de óxido-reducción, 5. Zona de calentamiento del baño de agua, 6. Transmisores para señales de pH, POR y oxígeno disuelto, y tarjeta de adquisición de datos
7. Computadora receptora de datos, 8. Bombas de carga y descarga, 9. Controlador de flujo másico para aire, 10. Tapa con entradas de mangueras y cople para sensor de oxígeno.

Se utilizaron sensores de oxígeno disuelto (modelo COS41-2F), pH (modelo CPF81LN21C2) y potencial de óxido-reducción de anillo de platino (modelo CPF82PA31A2) así como

transmisores modelo Liquisys M y Liquisys S. Todo lo anterior marca Endress+Hauser (Alemania). El reactor se construyó de acrílico y contó con entrada y salida de aire y un controlador de flujo másico para la línea de aire marca Cole-Parmer 32708-26 con un intervalo de operación de 0 a 1000 mL/min de aire. Se utilizó una tarjeta de adquisición de datos National Instruments (EUA) modelo NI USB-6008, con la cual los transmisores de los sensores se conectaban a la computadora. Las señales se procesaron a través del programa BioRec adaptado por el Dr. Manuel Betancur y bajo la asistencia del Dr. Alejandro Vargas Casillas sobre la plataforma de programación del LabView 7.1. Se contó con dos bombas de alimentación Cole-Parmer Masterflex de 6-600 rpm y una bomba de vaciado Cole Parmer Masterflex de 0-1200 rpm. El reactor contó con una chaqueta para recircular agua y mantener constante la temperatura a 30°C. Se utilizó una bomba de recirculación de agua como sistema de agitación dentro del reactor. Para la aereación se utilizó un difusor flexible de aire de 40 cm de largo el cual fue colocado en el fondo del reactor.

Como lecho móvil se utilizaron 2500 empaques de polietileno con un área específica de $963 \text{ m}^2/\text{m}^3$ y una densidad $0.95 \text{ g}/\text{cm}^3$ (figura 3.5). Cada empaque es un anillo de aproximadamente 0.8 cm de diámetro que contiene aletas tanto por dentro como por fuera para incrementar el área superficial.



Figura 3.5 Empaques de polietileno utilizados como lecho móvil.

3.2.2 Reactivos y medios de cultivo

Para la alimentación en el caso del proceso sulfatorreductor se utilizó como fuente de carbono orgánica, ácido láctico grado alimenticio [$C_3H_6O_3$] (CAS no. 50-21-5) con 85% de pureza marca Sigma-Aldrich y masa molar de 90 g/mol. Además se usó sulfato de sodio anhidro [Na_2SO_4] (CAS no. 7757-82-6) 99% de pureza marca Fluka con masa molar de 142 g/mol, así como un medio mineral descrito más adelante.

En el caso del proceso sulfuroxidante del que se habla en la sección 4.2 de resultados, se utilizó sulfuro de sodio nonahidratado [$Na_2S \cdot 9H_2O$] (CAS no. 1313-84-4) marca Sigma-Aldrich con masa molar de 240 g/mol. Como fuente de carbono se utilizó bicarbonato de sodio anhidro [$NaHCO_3$] (CAS no. 144-55-8) marca J.T.Baker con masa molar de 84 g/mol.

Medio mineral sulfuroxidante

Tabla 3.2 Elementos del medio mineral sulfuroxidante

Compuesto	Concentración (g L ⁻¹)	Marca	Número CAS
KH ₂ PO ₄	1.8	J.T.Baker	[7778-77-0]
NH ₄ Cl	0.5	J.T.Baker	[12125-02-9]
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04	J.T.Baker	[10035-04-8]
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.2	J.T.Baker	[7782-85-6]
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.03	J.T.Baker	[13446-34-9]
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.02	J.T.Baker	[10025-77-1]

Medio mineral sulfatorreductor

Se preparó medio mineral (tabla 3.3) de acuerdo con Celis-García *et al.*, (2004) y con dos modificaciones en la cantidad de fósforo y nitrógeno sugeridas por Bayoumy *et al.* (1999). Las concentraciones reportadas están referidas al medio de reacción.

Tabla 3.3 Compuestos del medio mineral sulfatorreductor

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)	Marca	Número CAS
KH ₂ PO ₄	220	J.T.Baker	[7778-77-0]
NH ₄ Cl	950	J.T.Baker	[12125-02-9]
CaCl ₂ ·2H ₂ O	13	J.T.Baker	[10035-04-8]
KCl	500	Fluka	[7447-40-7]
MgCl ₂ ·6H ₂ O	150	J.T.Baker	[7791-18-6]
extracto de levadura	18	Becton Dickinson	[8013-01-2]
H ₃ BO ₃	0.05	J.T.Baker	[10043-35-3]
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.072	Merck	[7791-13-1]
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.05	J.T.Baker	[10125-13-0]
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.785	J.T.Baker	[13446-34-9]
ZnCl ₂	0.15	J.T.Baker	[7646-85-7]
HCl (37%)	1μL	J.T.Baker	[7647-01-0]
FeCl ₂ ·4H ₂ O	2	J.T.Baker	[13478-10-9]
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.05	J.T.Baker	[7791-20-0]
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.05	J.T.Baker	[12027-67-7]
AlCl ₃	0.05	Fluka	[7446-70-0]
Na ₂ SeO ₄	0.05	Sigma-Aldrich	[13410-01-0]
EDTA sal disódica dihidratada	0.5	J.T.Baker	[6381-92-6]

3.2.3 Preparación de disoluciones y técnicas analíticas

Para la preparación de todas las disoluciones se utilizó el material volumétrico apropiado. Para pesar los reactivos se utilizaron, según las cantidades a ser pesadas, una balanza granataria así como una balanza analítica Ohaus Explorer (EUA) con una resolución máxima de 0.1 mg. Los medios minerales sulfatorreductor y sulfurooxidante se prepararon como soluciones de reserva a mayor concentración para ser utilizadas en las diversas corridas experimentales de acuerdo a las concentraciones de reacción presentadas en la sección de materiales. Todas las disoluciones acuosas fueron preparadas en agua destilada, con excepción de la alimentación de rutina del proceso sulfatorreductor la cual se preparaba con agua corriente. Todas las muestras utilizadas

para cuantificación por cromatografía, espectrofotometría o analizador de carbono se filtraron utilizando filtros de nitrato de celulosa de 0.45 μm marca Whatman (Inglaterra). En el caso de muestras con acetona y éter de petróleo como las de azufre elemental, se utilizaron filtros de teflón de la misma marca y tamaño de poro. Para todos los métodos excepto para los sólidos suspendidos, se determinaron curvas de calibración para la cuantificación de las muestras problema.

Determinación de biomasa

La biomasa suspendida fue determinada como sólidos suspendidos volátiles (SSV) de acuerdo con el método descrito en los métodos estándar (APHA, 1995) mediante la diferencia entre los sólidos suspendidos totales y los sólidos suspendidos fijos. Los sólidos suspendidos totales se obtienen tomando una muestra volumétrica del licor mezclado del reactor para después ser filtrada en un filtro de fibra de vidrio y secada en una estufa durante una hora a 100°C. Posteriormente el mismo filtro es sometido a un calcinado por 15 minutos en estufa a 550°C y pesado para obtener los sólidos suspendidos fijos. Todas las determinaciones se realizan por triplicado.

Cromatografía y cuantificación de sulfato, azufre y ácidos grasos

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión (CLAP) HP series 1100 (EUA) equipado con un detector UV-Visible con arreglo de diodos. Este sistema se utilizó para la detección de ácido láctico y sulfato en el caso de la sección de resultados 4.1 y 4.3, y para determinación de azufre elemental y tiosulfato.

El ácido láctico se detectó utilizando una columna Phenomenex Luna 5u C8(2) 100A 150x4.6mm (California, EUA) con una fase móvil de 0.1M de fosfato dibásico de amonio a pH 7.0 ajustado con ácido fosfórico. Se inyectaron muestras previamente filtradas de 20 μL a un flujo isocrático de la fase móvil de 0.5 mL/min. Se leyó la absorbancia a 210nm con una referencia de 500nm con un tiempo de retención de 2.1 minutos. La temperatura de la columna fue mantenida a 40°C.

Posteriormente se migró a un método más especializado en ácidos grasos que funciona con una columna Grace Prevail Organic Acid 5u 250x4.6mm (Illinois, EUA) con una fase móvil de fosfato de potasio 25 mM a pH 2.5 ajustado con HCl. Se inyectaron muestras previamente filtradas de 20µL a un flujo isocrático de la fase móvil de 1 mL/min. Se leyó la absorbancia a 210nm con una referencia de 500nm y un tiempo de retención de 5.1 minutos. La temperatura de la columna fue mantenida a 40°C. Este mismo método también permitió la detección de ácido acético a un tiempo de retención de 5.5 minutos. Los límites de detección del acetato y del lactato fueron de 1.1mM y 1.3mM respectivamente.

El azufre elemental se detectó utilizando una columna Phenomenex Luna 5u C8(2) 100A con una fase móvil de 95% metanol 5% agua. Se inyectaron, a un flujo isocrático de 1 mL/min, muestras previamente filtradas mediante filtros de teflón® de 0.45µm marca Lida. Se leyó la absorbancia a 254nm con una referencia de 500nm con un tiempo de retención de 3.7 minutos. La temperatura de la columna fue mantenida a 40°C. El límite de detección fue 0.25 mM.

El sulfato y el tiosulfato se detectaron utilizando una columna Varian IonoSpher 5A 200x3mm (California, EUA) con una fase móvil de biftalato de potasio 0.04M a un pH de 4.0. Se inyectaron muestras previamente filtradas de 40µL a un flujo isocrático de la fase móvil de 0.5 mL/min. Se leyó la absorbancia a 302nm con una referencia de 500nm con un tiempo de retención de 5.5 minutos para el sulfato y 6.5 minutos para el tiosulfato. La temperatura de la columna fue mantenida a 40°C y el límite de detección fue de 2mM para el sulfato y 2.5mM para el tiosulfato.

Se utilizó un cromatógrafo de iones Dionex ICS-1500 (California, EUA) con detector de conductividad y con una columna REIC IonPac AS23 250x4mm para la detección de ácido láctico, ácido acético y sulfato, para los resultados experimentales de la sección 4.4 pues la detección de dichas especies resultó mejor que con los métodos antes mencionados. El método se llevó a cabo usando como eluyente una disolución 0.8 mM de NaHCO₃ y 4.5 mM de Na₂CO₃ en agua destilada a un flujo isocrático de 1 mL/min aplicando una corriente de supresión de aniones de 25 mA y bajo un control de temperatura de 30°C. Se inyectaron muestras previamente filtradas de 25µL. El tiempo de retención para el ácido láctico fue de 4.5 minutos, para el ácido

acético de 4.9 minutos y para el sulfato de 22 minutos. Los límites de detección fueron de 0.17mM, 0.3mM y 0.04mM respectivamente.

Un cromatógrafo de gases Agilent GC6890N (EUA) con una columna Phenomenex Zebron ZB-FFPA 15m x 0.53mm x1 μm y un detector de ionización de flama (DIF), fue utilizado para las determinaciones de ácidos grasos volátiles, especialmente el ácido acético, únicamente para la sección 4.1 de resultados. El Flujo de nitrógeno como gas acarreador fue de 3.4 mL/min. Las temperaturas del inyector y detector fueron 230 y 250°C respectivamente, la del horno fue de 65°C por 20 min., incrementándose una velocidad de 50°C/min. hasta 135°C, misma que se mantuvo por 4.5min.

Para los dos cromatógrafos de líquidos se filtraban diariamente los eluentes mediante vacío utilizando filtros Whatman de 0.45 μm de nitrato de celulosa para las soluciones acuosas y filtros de teflón para el metanol.

Cuantificación de carbono total

Las determinaciones de carbono inorgánico total y carbono orgánico total se obtuvieron utilizando un analizador TOC-5050 de marca Shimadzu Corporation (Japón). Este analizador funciona midiendo el dióxido de carbono desprendido de la solución tras ser acidificada, con lo que se determina el carbono inorgánico contenido en una alícuota de la misma. Posteriormente lleva a cabo una combustión de una alícuota de la solución determinando el total de CO₂ formado con lo cual se obtiene la cantidad total de carbono. La diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico se reporta como carbono orgánico total. Se inyectaban 20 μL de las muestras filtradas diluídas 1:10 con agua destilada. Las muestras para este método eran pasadas siempre en el mismo día de la medición o a más tardar al día siguiente para evitar variaciones especialmente del carbono inorgánico.

Cuantificación de Sulfuro

El sulfuro se cuantificó a través del método de Cord-Ruwisch (1985). Se tomaron 100 μL de la muestra filtrada y se introdujeron en una celda de cuarzo de aproximadamente 4 mL de volumen conteniendo 4 mL de CuSO_4 5mM en HCl 50mM. Esta adición causa la formación colorida del sulfuro de cobre cuya concentración fue determinada utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible Perkin-Elmer Lambda 25 (Connecticut, EUA) midiendo la absorbancia a 480nm.

Cuantificación de azufre elemental

Se tomó una muestra de 10mL del licor mezclado del reactor. Se introdujo en un crisol sin filtrar, se acidificó con 100 μL de HCl 3.7% y se secó completamente en una estufa a 100°C durante aproximadamente 2 horas. Una vez seca la muestra se rasparon los sólidos y se resuspendieron dentro de una botella serológica en 25 mL de éter de petróleo, y fueron mantenidos en dicha solución al menos 24 horas. Al inicio se utilizó la técnica de cianólisis para medir el azufre (Bartlett y Skoog, 1954), la cual es un método colorimétrico que consiste en la reacción de cianuro de sodio con azufre elemental para formar tiocianato que se acompleja con el hierro. Se toma una alícuota de 5 mL de la muestra de éter de petróleo y azufre y se disuelven en un matraz de 25 mL con 15 mL de una solución 0.1% de cianuro de sodio en acetona aforando con acetona al 95%. De la solución resultante se toman 5 mL y se agregan en un tubo con 5 mL de una solución de cloruro férrico 0.4% en acetona. Así se forma un complejo colorido que puede determinarse por espectrofotometría. La lectura de la absorbancia se realizó a 465 nm en un espectrofotómetro Hach DR/2010 (Colorado, EUA). El blanco se preparó con 5 mL de acetona 95% y 5 mL de la solución de cloruro férrico.

Posteriormente se implementó una técnica de azufre elemental por CLAP teniendo como guía la modificación del método de McGuire y Hamers (2000). La técnica consistió en tomar los mismos 5mL de la solución de éter de petróleo con azufre y se disolvieron en un matraz de 10mL aforando con acetona. La mezcla era pasada a través de un filtro de Teflón® marca Lida y cuantificada a través del CLAP de acuerdo con las condiciones descritas en la sección de cromatografía.

Cuantificación de proteína

Se siguió la colonización del soporte mediante la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) con ligeras modificaciones (Markwell *et al.*, 1978, Stoscheck, 1990) para medir indirectamente la biomasa a través de la cantidad de proteína presente. El principio del método consiste en que, bajo condiciones alcalinas, el Cu^{2+} forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas y queda reducido a Cu^+ . El Cu^+ así como los grupos R de la tirosina, el triptofano y la cisteína reaccionan entonces con el reactivo de Folin-Ciocalteu que es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato capaz de reaccionar con grupos aromáticos y diversas sustancias reductoras. Dicho reactivo produce primero un compuesto inestable el cual es lentamente reducido para llegar a ser de color azul molibdeno/tungsteno. Durante las mediciones de proteína se tomaron 5 empaques por triplicado provenientes del reactor; estos se enjuagaron suavemente con medio mineral a temperatura ambiente y posteriormente se introdujeron en un tubo con 10mL de agua destilada para ser sonicados por media hora con el fin de romper la células y liberar la proteína. Posteriormente el líquido sobrenadante fue sometido al método modificado de Lowry el cual consistió en agregar 2 mL de la muestra a 6 mL de mezcla de tartrato de sodio con dodecil-sulfato de sodio y sulfato cúprico, se agitó con vórtex y se dejó reposando 30 minutos en la obscuridad. El dodecil-sulfato de sodio es un coadyuvante de la técnica modificada para garantizar la desestabilización de estructuras membranales remanentes pues fue implementada inicialmente para cuantificación de proteína de membrana (Markwell *et al.*, 1978). Posteriormente se agregó el reactivo de Folin, el cual completa la reacción tras ser agitado con vórtex inmediatamente y dejando reposar por 45 minutos más en la obscuridad. Después la absorbancia de la muestra fue leída en un espectrofotómetro Hach DR/2010 a 660nm. Se estableció la curva de calibración utilizando albúmina sérica de bovino en un intervalo de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. El límite de detección del método fue de 8.9 μg de proteína por mililitro.

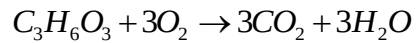
Calibración de sensores

Los sensores se calibraron de acuerdo con las indicaciones de los manuales disponibles. En el caso del oxígeno disuelto la calibración se llevó a cabo con un punto de referencia utilizando

agua saturada con oxígeno. Los sensores de pH fueron calibrados con dos puntos de referencia con soluciones amortiguadoras para pH 4.0 y 7.0. El sensor de potencial de óxido-reducción se calibró con 3 puntos utilizando soluciones amortiguadoras de referencia a pH 4.0, 7.0 y 10.0 saturadas con quinhidrona buscando obtener valores redox de 264mV, 87mV y -90mV respectivamente.

3.2.4 Cálculo de demanda química de oxígeno teórica (DQO)

Tomando el caso del ácido láctico, se plantea la reacción de oxidación total del ácido láctico y se determina la cantidad de oxígeno que se invertiría para llevar a cabo dicha reacción.



De acuerdo con la ecuación, se necesitan 96g de Oxígeno para oxidar por completo 90g de ácido láctico. Esto significa que cada gramo de lactato expresado en gramos de DQO, equivale a 1.067 g como DQO teórica.

IV. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL PROCESO SULFATORREDUCTOR*

La determinación de los parámetros cinéticos del proceso sulfatorreductor ha necesitado el planteamiento de un modelo que describa los aspectos principales que afectan al mismo. Para establecer el modelo más útil ha sido necesaria la consideración de las propuestas de modelado previamente publicadas así como la comprensión del proceso, sus reacciones predominantes y los factores que favorecen o inhiben al mismo.

4.1.1 Estabilidad del proceso sulfatorreductor y reacción predominante

Tal y como se mencionó en la sección 3.1.1 de la metodología, se llevó a cabo la estabilización de un proceso sulfatorreductor alimentado por un agua residual sintética compuesta por nutrientes minerales así como sulfato y ácido láctico como sustrato orgánico. Previo al proceso de aclimatación de la biomasa, se realizaron pruebas de consumo de sulfato en relación con la cantidad de sustrato orgánico suministrado. La figura 4.1 muestra el consumo de sulfato que se logra a diferentes relaciones de alimentación lactato/sulfato tomando el lactato como DQO teórico tal y como se señala en la sección 3.2.3 del capítulo de metodología.

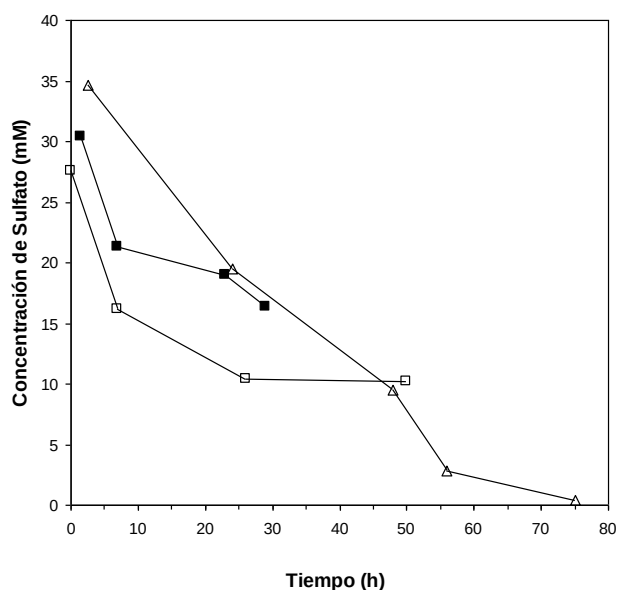


Figura 4.1 Consumo de sulfato para la biomasa para diferentes relaciones de alimentación DQO/sulfato de 1.77 (-■-), 2 (-□-), and 2.4 (-Δ-).

* Esta sección es una adaptación de la publicación sometida y aceptada en *J.Chem.Tech.Biotech.*, **85**, 4, (2010), 453-459 y presentada en el Anexo II de esta tesis.

Se puede observar en la figura 4.1 que la relación de alimentación lactato/sulfato que varía de 1.77 a 2.4 tiene repercusión en la conversión de sulfato. Como estos experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de no aclimatación de la biomasa, el tiempo de consumo es considerablemente grande comparado con los tiempos de ciclo una vez que el proceso fue estable, pero ayudaron a establecer la conveniencia de que la relación de alimentación lactato/sulfato fuera de entre 2 y 2.4 para garantizar una sulfatorreducción no limitada por el sustrato orgánico. Estas razones de alimentación habían sido reportadas previamente (Bayoumy *et al.*, 1999) encontrándose un resultado como el que aquí se reporta. Esto llevó a que la alimentación normal del reactor sulfatorreductor considerara una relación de alimentación DQO/sulfato cercana a 2 y no a otras razones de alimentación utilizadas en otros trabajos (Kaksonen *et al.*, 2003, Celis-García *et al.*, 2007). Una vez que el reactor se aclimató al ciclo de 8 horas, la relación de alimentación DQO/sulfato en la operación normal fue de 2. El reactor operó a 30°C y pH inicial 7.0 obteniéndose bajo un ciclo normal una tasa de consumo de sulfato de 2.16 mM por hora lográndose una conversión mínima de 85% del sulfato en cada ciclo. En la tabla 4.1 se presenta el desempeño normal de un ciclo del reactor sulfatorreductor una vez alcanzada la estabilización.

Tabla 4.1 Características de consumo y producción del proceso sulfatorreductor

Condición	Valor
Duración del ciclo	8 horas
Consumo de sulfato	17.3 ± 0.4 mM
Consumo de ácido láctico	30.8 ± 0.9 mM
Producción de ácido acético	18.1 ± 1.3 mM
Producción de carbono inorgánico	30.6 ± 2.1 mM
Conversión total de sulfato	85%
Reducción de carbono orgánico	42%
Tasa de remoción de sulfato	2.16 mM h ⁻¹

La tasa de remoción de sulfato obtenida para este reactor bajo condiciones estables es comparable con aquellas obtenidas para reactores que llevan a cabo sulfatorreducción y que utilizan lactato como sustrato orgánico (Herrera *et al.*, 1993a y b, Bayoumy *et al.*, 1999, Kaksonen *et al.*, 2003,

Jong y Parry, 2006, Celis-García *et al.*, 2007) e igualmente comparables con las tasas de consumo de sulfato obtenidas por otros sistemas sulfatorreductores que usan otro tipo de sustratos (ver tabla 4.5).

Así mismo, en la figura 4.2 se presentan gráficamente los promedios de la evolución del consumo de sulfato y el predominio de las especies carbonadas para la operación estable del reactor para una alimentación DQO/sulfato = 2. Los números del consumo de lactato y sulfato y producción de acetato y carbono inorgánico se resumen en la tabla 4.1. Las variaciones de las mediciones son en general poco significativas. Las cantidades presentadas permiten así mismo realizar el balance de materia del sistema en términos del carbono presente.

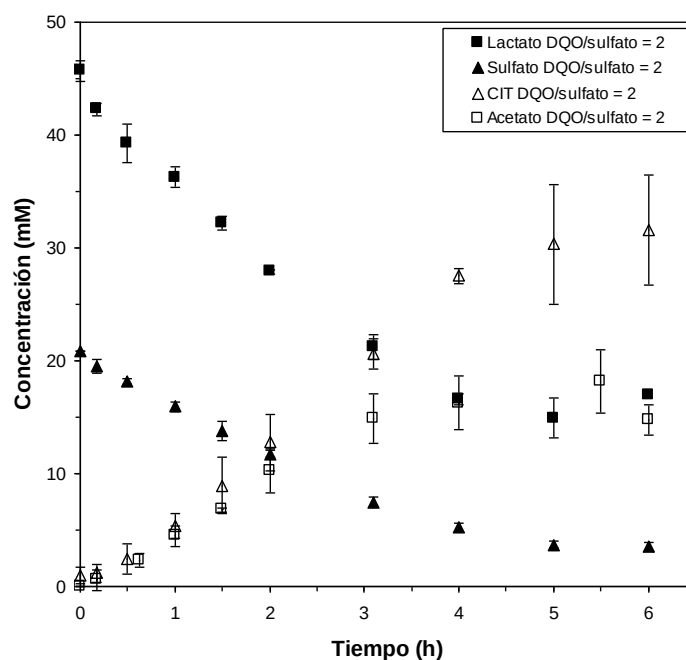


Figura 4.2 Concentraciones promedio para el ciclo normal de operación del reactor discontinuo secuencial sulfatorreductor para una relación de alimentación DQO/sulfato de 2; lactato (■), sulfato (▲), acetato (□) y carbono inorgánico total (CIT) (Δ)

Las ecuaciones 4.1 a 4.3 representan las bioreacciones de sulfatorreducción más probables a ocurrir en el sistema dado que es alimentado con ácido láctico (Jong y Parry, 2006, Janssen *et al.*, 1997, Kaksonen *et al.*, 2004; Lens *et al.*, 1998; Vavilin *et al.*, 1994)



Considerando las ecuaciones, se tienen dos posibles rutas del lactato: su transformación a acetato y carbonato (ecuación 4.1) o su mineralización completa (ec. 4.3). Adicionalmente es posible que el acetato producido en la reacción 4.1 sea consumido por bacterias sulfatorreductoras utilizadoras de acetato (ec. 4.2). Para efectos de poder determinar los parámetros cinéticos de la sulfatorreducción, es necesario la identificación de las reacciones predominantes en el sistema. Esto se logró mediante el balance de las especies carbonadas.

Considerando de la tabla 4.1 las cantidades alimentadas de lactato y las producidas de acetato y carbono inorgánico, se puede determinar las razones molares de consumo del sistema. Así por ejemplo, la relación molar de consumo promedio lactato/sulfato es de 1.78 ± 0.01 lo que indica que por cada mol de sulfato consumida se consumieron 1.78 moles de ácido láctico. Si se toman en consideración las ecuaciones 4.1 a 4.3 se puede ver que cuando se lleva a cabo una mineralización completa del ácido láctico, la relación molar de consumo lactato/sulfato debe ser de aproximadamente 0.67. Por otro lado, si se lleva a cabo una mineralización parcial, la relación molar de consumo lactato/sulfato se debe aproximar a 2 tal como lo indica la estequiometría de la ecuación 4.1 y debe presentarse producción de ácido acético. Se observó que existe una producción de ácido acético y la constante acumulación de carbonatos junto con ácido acético (ver figura 4.2) y por tanto una mineralización parcial del ácido láctico como reacción principal del sistema.

Así mismo, si se considera la cantidad de carbono inorgánico producido se tiene que son 30.6 ± 2.1 mM, lo cual coincide con la cantidad de moles de ácido láctico consumidas para la ocurrencia de la reacción 4.1. Por otro lado, la producción detectada de acetato es 30% menor a la esperada estequiométricamente. Esto se puede explicar por la posible ocurrencia de la reacción 4.2 en el sistema por un lado, así como a la volatilización de parte del ácido acético producido.

Aunque la incertidumbre permite establecer un pequeño margen de ocurrencia de la sulfatorreducción utilizadora de acetato, la evidencia de la acumulación de este compuesto en el reactor implicaría una ocurrencia mucho menos importante de la reacción 4.2 respecto de la reacción 4.1. Adicionalmente, se sabe por trabajos previos que el proceso sulfatorreductor acetotrófico generalmente no se lleva a cabo u ocurre a tasas considerablemente más bajas (Nagpal *et al.*, 2000).

El predominio de la oxidación parcial del ácido láctico se ha observado también para sistemas que operan a razones de alimentación diferentes tales como DQO/sulfato de 0.67 y en

los cuales se han reportado sulfatorreducciones incompletas bajo estas condiciones de alimentación (Lens *et al.*, 1998, Celis-García *et al.*, 2007). El hallazgo de la reacción 4.1 como la reacción con la ocurrencia más significativa, permitió establecer la base para el modelado y parametrización del proceso sulfatorreductor como se describe en la sección 4.1.3.

4.1.2 Aspectos inhibidores y variación de demanda química de oxígeno

Se estableció una estrategia experimental que permitiera establecer el efecto de utilizar una mayor relación de alimentación DQO/sulfato así como la búsqueda de un posible efecto inhibidor por parte del ácido sulfhídrico formado en el proceso. En la tabla 3.4 de la sección de metodología se describieron cuatro condiciones experimentales a las cuales se sometió el sistema que operaba bajo condiciones normales a las condiciones descritas en el apartado anterior. De acuerdo con la metodología, las condiciones experimentales fueron: 1) la condición normal con una alimentación a relación DQO/sulfato de 2; 2) una alimentación similar pero haciendo burbujear nitrógeno en el reactor a lo largo del ciclo para disminuir la cantidad de sulfuro presente, y reducir la posible inhibición que los niveles de sulfuro producido pudieran ejercer sobre la biomasa; 3) ciclos normales sin burbujeo con una alimentación a relación DQO/sulfato de 6, esperando que el exceso de fuente de carbono aumentara la rapidez de consumo de sulfato; y 4) una alimentación igualmente de DQO/sulfato = 6 pero haciendo burbujear nitrógeno tal como se hizo con la condición número dos, para reducir el sulfuro presente y evitar a la biomasa cualquier condición de inhibición por dicho factor.

En la figura 4.3A se presenta el consumo de sulfato para las cuatro condiciones experimentales descritas. Se observa como se alcanza una reducción del sulfato cercana al 90% en 7 horas para la condición normal de operación a DQO/sulfato de 2. Por otro lado, tal como se esperaba, la sulfatorreducción ocurre más rápidamente cuando se aumenta la cantidad de ácido láctico tal que la relación de alimentación DQO/sulfato haya sido de 6 obteniéndose un 100% de la sulfatorreducción en 5 horas. Así pues, para estas dos condiciones experimentales los resultados se presentan tal como se esperaban. No así en el caso de las corridas con burbujeo de nitrógeno.

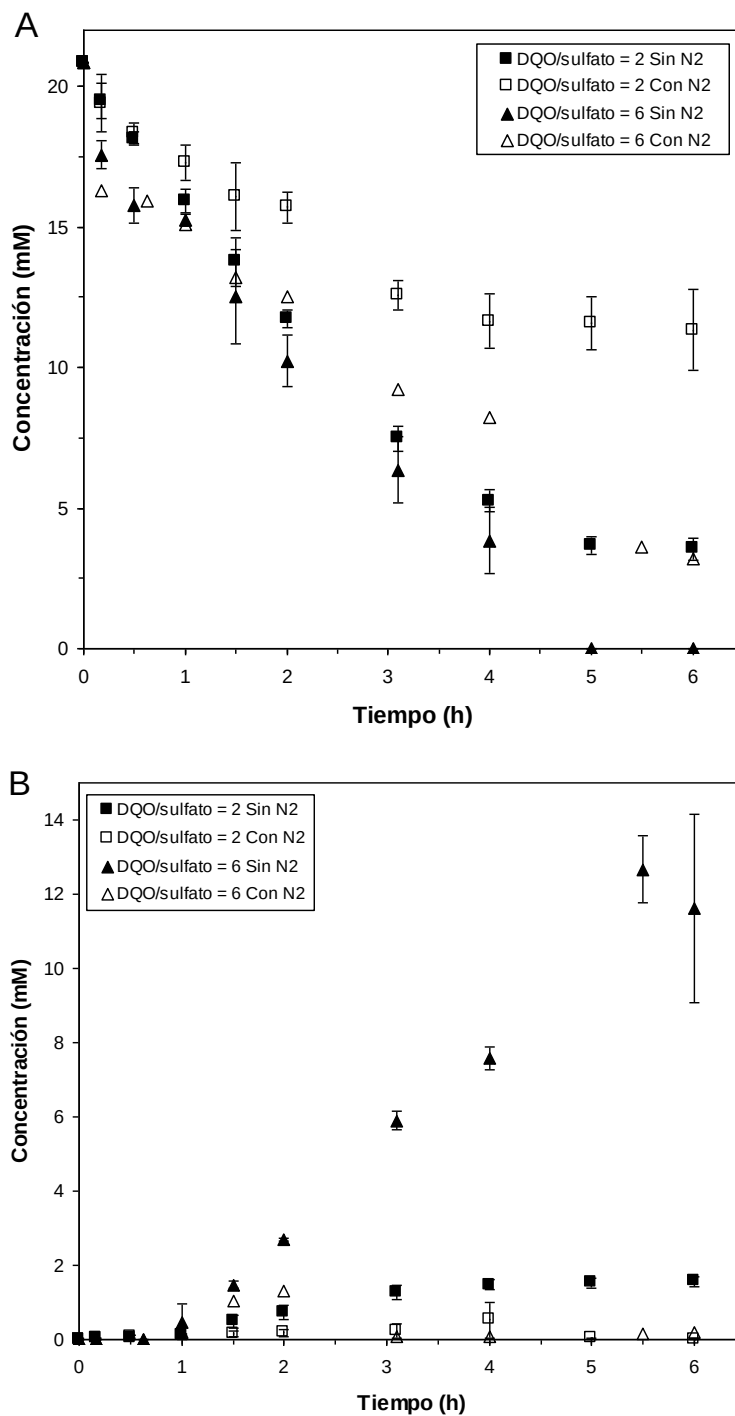


Figura 4.3 Reducción de sulfato (**A**) y acumulación de sulfuro (**B**) a lo largo de un ciclo sulfatorreductor operado bajo cuatro diferentes condiciones: con una relación de alimentación DQO/SO₄²⁻ de 2 (■) y de 6 (▲) y utilizando nitrógeno para lavar el sulfuro presente (□), (△)

En el caso de las corridas experimentales donde se lavó el sulfuro con nitrógeno, no se presenta una mejora en el consumo de sulfato, por el contrario, la sulfatorreducción cae a un 84% a relación DQO/sulfato de 6 y a 53% para la relación DQO/sulfato de 2. Inesperado resultó el

hecho de que en la corridas de burbujeo con nitrógeno se presentara un consumo más bajo de sulfato, ya que si pudiera haber habido un factor de inhibición por sulfuro, éste hubiera sido eliminado del reactor bajo la condición de burbujeo: la figura 4.3B y la tabla 4.2 muestran cómo prácticamente los niveles de sulfuro son nulos, excepto, para la condición donde se obtiene el mejor desempeño de sulfatorreducción, siendo que se llega a valores máximos de 350 mg/L de sulfuro total disuelto. La inhibición por sulfuro ha sido reportada en múltiples trabajos previos (Visser *et al.*, 1997, Kalyuzhnyi *et al.*, 1998, Kaksonen *et al.*, 2004) aunque con variaciones considerablemente grandes, ya que se reportan valores de inhibición por sulfuro desde 35 hasta 1700 ppm.

Aparentemente el grado de inhibición está sujeto al tipo de proceso y al grado de aclimatación de la biomasa. En el caso de los resultados experimentales presentados se concluyó que, bajo las condiciones en que opera el reactor y dada la aclimatación de la biomasa, no existe evidencia de que los niveles de sulfuro existentes o que pudieran acumularse, dada la cantidad de sulfato alimentado en cada ciclo, impliquen una condición inhibitoria para el proceso. Esto se observa por el nivel de eficiencia sulfatorreductora del 100% observado para la condición que presentó los mayores niveles de sulfuro en el reactor.

Tabla 4.2 Resumen de eficiencia sulfatorreductora bajo las cuatro condiciones experimentales

Relación DQO/sulfato	Reducción de sulfato	Acumulación máxima de HS ⁻ (ppm)	Rango de pH	Rango de potencial redox (mV)
2	85%	50	7.1 – 6.8	-105 / -225
6	100%	350	7.0 – 6.7	-50 / -200
2 + N ₂	53%	30	7.1 – 8.2	-125 / -310
6 + N ₂	84%	32	7.2 – 8.3	-175 / -325

Sin embargo, a pesar de que la evidencia experimental apunta a la posibilidad de despreciar el factor de inhibición por sulfuro, el proceso sí sufrió inhibición tal como lo muestra la tabla 4.2. En la figura 4.4A y B se presenta la evolución del pH y del potencial de óxido-reducción para los experimentos descritos. De igual manera se resumen dichos resultados en la tabla 4.2.

Se puede observar que bajo las condiciones de lavado de sulfuro, el pH se incrementa prácticamente una unidad, mientras que en los casos donde no hubo lavado tiende a mantenerse más cercano a la neutralidad decreciendo 0.3 unidades como máximo. Este efecto se entiende por

IV. RESULTADOS

el procedimiento mismo de burbujeo de sulfuro, el cual funge como el amortiguador principal del proceso. Al ser lavado, la ausencia de sulfuro en el sistema así como un lavado menos importante pero presente del ácido acético y del CO_2 tiende a hacer subir el pH en el reactor. Estos dos últimos efectos pueden apreciarse en las figuras 4.5A y B donde se presenta el carbono orgánico total (COT) y el carbono inorgánico total respectivamente para las corridas realizadas.

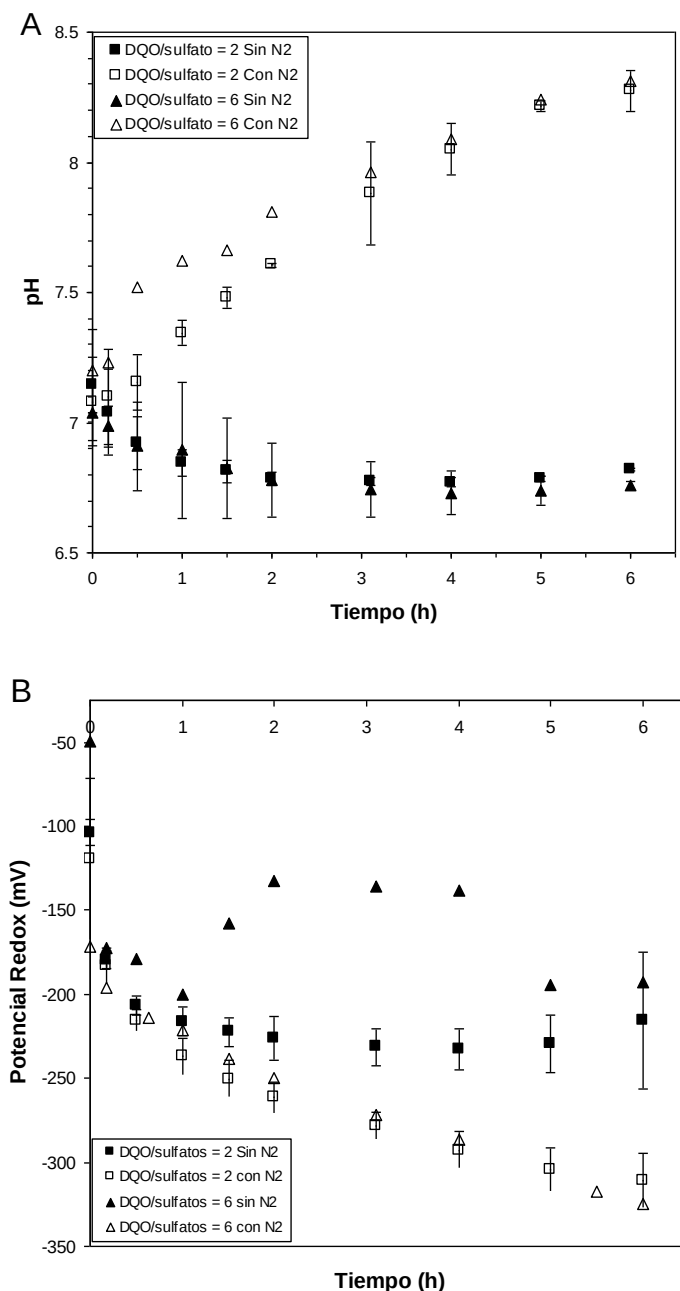


Figura 4.4 Evolución del pH (**A**) potencial redox (**B**) a lo largo de un ciclo sulfatorreductor operado bajo cuatro diferentes condiciones: con una relación de alimentación DQO/ SO_4^{2-} de 2 (■) y de 6 (▲) y utilizando nitrógeno para lavar el sulfuro presente (□), (△)

Para las condiciones con lavado de sulfuro se observa como el COT decrece mucho más rápido que en los casos donde no se llevó a cabo burbujeo, lo cual se atribuye al lavado del ácido acético. Sin embargo, el decremento del COT no se presenta como un factor limitante para el consumo del sulfato remanente si se considera la relación COT remanente / sulfato remanente en cada caso. Así mismo, en la figura 4.5B es posible observar como el carbono inorgánico detectado durante dichos ciclos resulta igualmente disminuido. Es posible apreciar el efecto de lavado del carbono inorgánico si se comparan las corridas con $DQO/sulfato = 2$ sin burbujeo y $DQO/sulfato = 6$ con burbujeo ya que ambas condiciones presentaron niveles de sulfatorreducción final similares por lo que en principio deberían presentar niveles de carbono inorgánico similares si no fuera por el proceso de lavado aplicado en el segundo caso.

Dado lo anterior y descartada la inhibición por sulfuro podría ser posible que la inhibición del proceso se presentara debido al aumento del pH en el reactor durante los ciclos con burbujeo. Sin embargo, el rango de pH resultante para las corridas con baja eficiencia sulfatorreductora continúa siendo un rango que ha sido reportado como no inhibidor para las bacterias sulfatorreductoras en general (Lens *et al.*, 1998, Celis-García *et al.*, 2007) (ver figura 1.1) y podría no ser estrictamente la causa de la inhibición. El otro posible factor para haber causado la inhibición del proceso sulfatorreductor pudo haber sido el ambiente redox imperante en las corridas donde fue utilizado el nitrógeno. En la figura 4.4B se aprecia cómo para los casos donde no se lavó el sulfuro, el potencial de óxido-reducción se halla en niveles de entre los $-50mV$ y los $-225mV$, mientras que el rango de valores para los casos con lavado con nitrógeno va de $-125mV$ a los $-325mV$ y aumentando continuamente conforme el ciclo avanza independientemente de los niveles de sulfuro en el reactor. Esto hace ver que en estos casos ha sido el burbujeo de nitrógeno el que ha impuesto un ambiente fuertemente reductor en el reactor.

Existe evidencia de que las bacterias sulfatorreductoras son susceptibles de ser afectadas por cambios en el potencial redox del ambiente que las rodea (Bayoumy *et al.*, 1999, Jones y Ingle, 2005), por lo que se ha reportado que el rango óptimo del potencial redox para este tipo de sistemas va de -150 a -250 mV. Si se observa la gráfica 4.4B se ve que después de la primera hora de ciclo, el valor del potencial redox para las corridas nitrogenadas es menor a $-250mV$ y continua siempre hacia niveles más negativos, lo que sugiere que ha sido el ambiente redox el que ha llevado a que el sistema no presente la eficiencia que se esperaba.

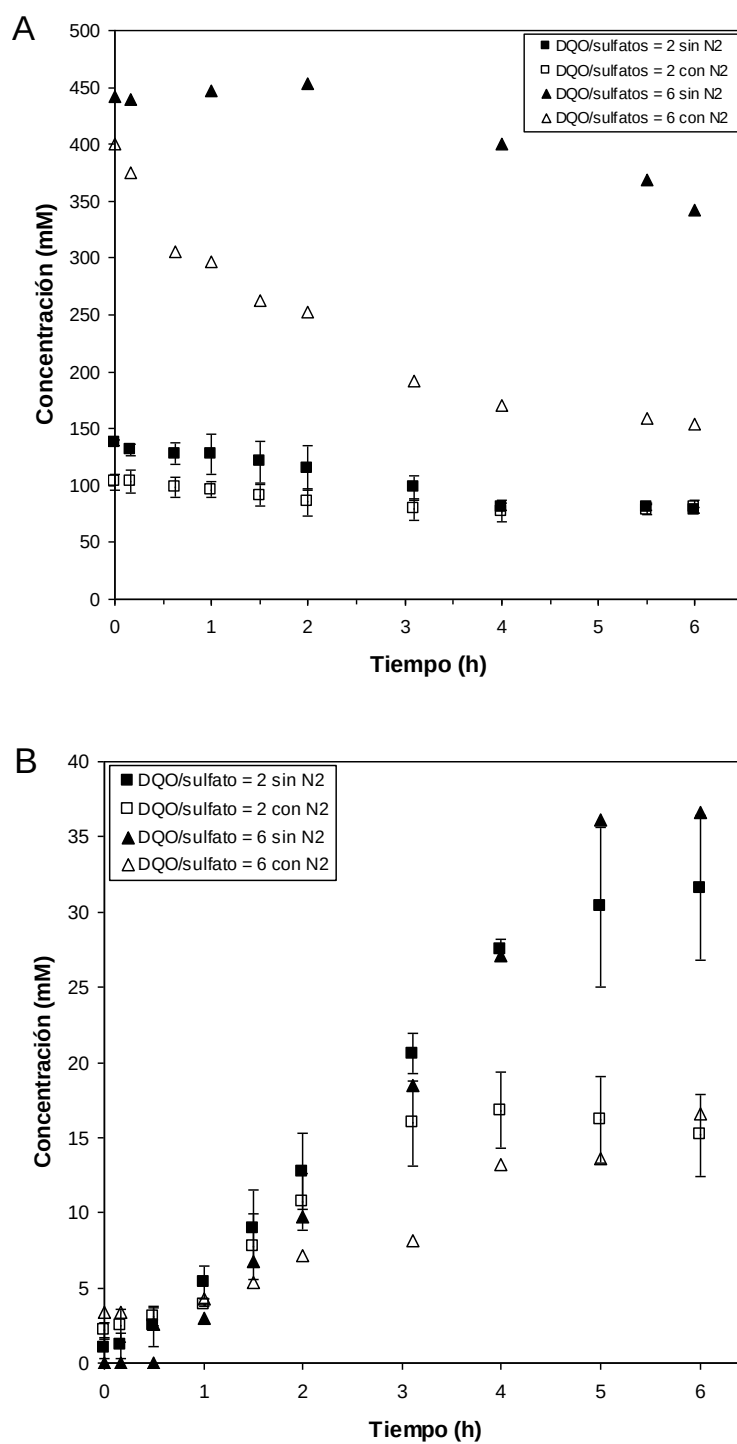


Figura 4.5 Carbono orgánico total (COT) (A) y carbono inorgánico total (B) a lo largo de un ciclo sulfatorreductor operado bajo cuatro diferentes condiciones: con una relación de alimentación DQO/SO₄²⁻ de 2 (■) y de 6 (▲) y utilizando nitrógeno para lavar el sulfuro presente (□), (△)

Adicionalmente, de acuerdo con las figuras 4.3B y 4.4, la presencia de sulfuro parece ser la especie más importante en relación con el pH y los niveles de potencial redox del sistema. Se puede observar que el aumento del sulfuro en el caso de las corridas con DQO/sulfato=6 lleva a un comportamiento distintivo del potencial redox. Esto lleva a la necesidad de explorar la correlación de las concentraciones de sulfuro con lo que le ocurre al potencial redox durante la sulfatorreducción, pues estas primeras mediciones permitieron ver que los cambios en las concentraciones de sulfuro se manifiestan como cambios detectables en el valor del potencial redox. Una mayor discusión de esto se presenta en una sección posterior de los resultados.

Por último se debe mencionar que la relación de consumo lactato/sulfato obtenida en promedio para las diferentes corridas con y sin nitrógeno fue de 1.83 ± 0.20 ; el carbono inorgánico total producido en promedio tomando en consideración las corridas tanto para DQO/sulfato de 2 como de 6 fue de 33.6 ± 3.1 mM que se encuentra muy cerca del promedio del lactato consumido para los mismos experimentos (28.7 ± 2.0 mM). Todas estas cifras son muy cercanas y por tanto coincidentes con las presentadas en la tabla 4.1, lo que indica que, independientemente del grado de inhibición del proceso o de los niveles de pH, el predominio de la reacción 4.1 se corrobora incluso para las demás condiciones experimentales impuestas al reactor. Los hallazgos aquí discutidos sobre la reacción predominante del sistema y los factores de inhibición permiten plantear un modelo lo más simplificado posible considerando estrictamente los factores más importantes.

4.1.3 Propuesta del modelo del proceso sulfatorreductor. Parametrización y validación.

En la sección 1.6 del capítulo de antecedentes se presentan algunos de los modelos propuestos para la cinética de biorreacciones y en concreto algunos propuestos para un sistema sulfatorreductor (Vavilin y Lokshina, 1996, Kalyuzhnyi *et al.*, 1998). Tomando en consideración los antecedentes de información inhibitoria y los modelos encontrados, se propuso inicialmente un modelo general para describir al proceso sulfatorreductor basado en la expresión de la tasa de crecimiento específica propuesta por Kalyuzhnyi *et al.* (1998) quien tomó en cuenta dos términos

de afinidad tipo Monod, uno para el sulfato y otro para el sustrato orgánico, de tal forma que la expresión para la sulfatorreducción utilizando lactato como sustrato quedaría como sigue:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[SO_4^{2-}]}{K_{SO_4} + [SO_4^{2-}]} \frac{[L^-]}{K_S + [L^-]} \frac{(K_I - [H_2S])}{K_I} f(pH) \quad (4.4)$$

donde μ es la tasa de crecimiento específica, $\mu_{\max}$ es la tasa máxima de crecimiento, $[SO_4^{2-}]$ es la concentración de sulfato, K_{SO_4} es la constante de afinidad del sulfato, $[L^-]$ es la concentración de lactato, K_S es la constante de afinidad del sustrato orgánico, en este caso del ácido láctico, K_I es la constante de inhibición por sulfuro, $[H_2S]$ es la concentración de sulfuro y la expresión $f(pH)$ corresponde a un término de inhibición por pH propuesto por Vavilin *et al.* (1995) (ver ecuación 1.15, sección 1.6 de antecedentes).

De este modo se cubrían los principales factores que, de acuerdo a trabajos previos, tendrían a afectar al proceso sulfatorreductor. Tomando en consideración las reacciones 4.1 a 4.3, se tendría pues una expresión general para el consumo de sulfato y de las principales especies involucradas considerando cada una de las tres biorreacciones.

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_1[B]}{Y} - \frac{\mu_2[B]}{Y} - \frac{\mu_3[B]}{Y} \quad (4.5)$$

$$\frac{d[L^-]}{dt} = -2\frac{\mu_1[B]}{Y} - \frac{2}{3}\frac{\mu_3[B]}{Y} \quad (4.6)$$

$$\frac{d[A^-]}{dt} = 2\frac{\mu_1[B]}{Y} - \frac{\mu_2[B]}{Y} \quad (4.7)$$

donde cada una de las tres reacciones tendría su tasa de crecimiento específica μ , asociada a la concentración de biomasa $[B]$ y con un término de producción referido al sulfato (Y). Donde $[A^-]$ representaría la concentración de acetato. Considerando este modelo, dada la cantidad de parámetros que incluye, y considerando que la efectividad del mismo está en función de la precisión con que dichos parámetros puedan ser determinados, se buscó su simplificación evaluando los factores más relevantes para el proceso. Los hallazgos de las secciones anteriores han contribuido a lograr dicha simplificación.

El resultado de que sea la reacción 4.1 la que ocurre predominantemente permite eliminar los términos de tasas de crecimiento específicas para las otras dos biorreacciones de tal manera que la expresión para el consumo de sulfato queda determinada por una sola μ , quedando como sigue:

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[B]}{Y} \left(\frac{[SO_4^{2-}]}{K_{SO4} + [SO_4^{2-}]} \right) \left(\frac{[L^-]}{K_S + [L^-]} \right) \frac{K_I - [H_2S]}{K_I} f(pH) \quad (4.8)$$

Teniendo la expresión anterior como la expresión general, se tomó ventaja de las corridas experimentales descritas en las secciones 4.1.1 y 4.1.2 para hallar los parámetros cinéticos del proceso. Dado que bajo condiciones normales de operación se encontró que no existía inhibición del proceso por la variación del pH ni tampoco por la acumulación de sulfuro, se pueden despreciar los dos términos inhibidores quedando la expresión como:

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[B]}{Y} \left(\frac{[SO_4^{2-}]}{K_{SO4} + [SO_4^{2-}]} \right) \left(\frac{[L^-]}{K_S + [L^-]} \right) \quad (4.9)$$

Utilizando los datos de consumo de sulfato como función del tiempo se determinaron los parámetros cinéticos para la expresión 4.9. Primero se determinó la cinética con respecto al sulfato, para lo cual se utilizaron los resultados de las corridas con una relación de alimentación DQO/sulfato de 6 sin nitrogenar. Al estar el lactato a una alta concentración en estas corridas, se puede aproximar el término de afinidad por lactato a 1 teniendo en cuenta pues que se encuentra en exceso con respecto al sulfato, esto es que la concentración de lactato en estos casos fue siempre considerablemente mayor al valor de su constante de afinidad (K_S). De esta forma la ecuación 4.9 queda únicamente con el término de afinidad correspondiente al sulfato. Tras considerar lo anterior y aunque el modelo planteado es de tipo Monod para la afinidad por el sulfato, se probaron también los modelos de orden cero y de orden uno. En el anexo I se presentan las gráficas correspondientes a los datos utilizados y a los ajustes para cada uno de los tres modelos. En términos generales se encontró que la cinética con respecto al sulfato si bien puede ajustarse a la cinética tipo Monod, también se ajusta a una cinética de orden cero, es decir, que la tasa de consumo de sulfato prácticamente no está limitada por la cantidad de sulfato presente en el sistema. Si se considera un término tipo Monod implica que K_{SO4} es considerablemente pequeño con respecto a las concentraciones utilizadas en este proceso. Las ecuaciones 4.10 a 4.12 representan las expresiones de cinética de orden cero, uno y Monod respectivamente.

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[B]}{Y} \quad (4.10)$$

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[B]}{Y}[SO_4^{2-}] \quad (4.11)$$

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[B]}{Y} \left(\frac{[SO_4^{2-}]}{K_{SO_4} + [SO_4^{2-}]} \right) \quad (4.12)$$

En la tabla 4.3 son presentados los resultados comparativos de los parámetros cinéticos obtenidos al ajustar tanto el modelo de orden cero como el modelo tipo Monod a los datos experimentales. El modelo de orden uno por su parte dio resultados mucho menos satisfactorios al obtenerse un factor de correlación de aproximadamente 0.91, el cual es considerablemente menor al obtenido con los otros dos modelos. Dichos ajustes se encuentran en las figuras 1 a 3 del anexo I.

Tabla 4.3 Valores de la constante cinética de dos modelos ajustados a los resultados del proceso sulfatorreductor alimentado bajo un relación DQO/sulfato de 6.

	Modelo de orden cero	Modelo tipo Monod
K_{SO_4} (mmol L ⁻¹)	NA	0.038 ± 0.322
$\mu_{\max}[B]/Y$ (mM h ⁻¹)	3.71 ± 0.13	3.74 ± 0.17
r^2	0.99273	0.99274

Tal como se mencionó previamente, de acuerdo con lo reportado en la tabla 4.3 se puede observar que, aunque el término tipo Monod es utilizable para describir la influencia de la concentración de sulfato en el proceso, se puede considerar al término de sulfato como de orden cero pues la constante de afinidad K_{SO_4} obtenida es considerablemente pequeña en comparación con las concentraciones de sulfato presentes a lo largo del proceso (entre 20 y 1 mM de sulfato contra un valor de constante de 0.038 ± 0.322 mM). Se puede apreciar igualmente que la diferencia entre las $\mu_{\max}[B]/Y$ encontradas con ambos modelos cae dentro del rango de incertidumbre de los ajustes de ambos modelos. Para el caso de la cinética de orden cero, se obtuvo que el parámetro $\mu_{\max}[B]/Y$ tiene un valor de 3.71±0.13 mM/h. Dado que la biomasa

promedio $[B]$ durante los experimentos fue de 2.7 g/L como sólidos suspendidos volátiles, se obtuvo una tasa específica de consumo de sulfato $\mu_{\max}/Y$ de $2.17 \pm 0.08 \text{ mg gSSV}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Considerando pues la cinética de orden cero para el sulfato, el modelo para describir al proceso sulfatorreductor que ocurre en el reactor quedaría como sigue:

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[B]}{Y} \frac{[L^-]}{K_s + [L^-]} \quad (4.13)$$

A partir de la expresión anterior se puede determinar la constante de afinidad del lactato a partir de experimentos donde este llegue a ser limitante respecto del sulfato. Así pues, utilizando los resultados de sulfatorreducción con una relación de consumo DQO/sulfato de 2 sin burbujeo de nitrógeno se pudo determinar la cinética con respecto al lactato considerando que en todo momento,

$$[L^-] = [L_0] - [L_{\text{consumido}}] \quad (4.14)$$

Siendo $[L_0]$ la concentración inicial de lactato. Con este balance material y considerando como aproximación razonable que la reacción predominante del proceso en cuanto al consumo de lactato corresponde a la ecuación 4.1, se puede decir que:

$$[L_{\text{consumido}}] = 2[SO_4^{2-}]_{\text{consumido}} = 2[SO_4^{2-}]_0 - 2[SO_4^{2-}] \quad (4.15)$$

de tal forma que la ecuación 4.13 quedaría como:

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[B]}{Y} \frac{[L]_0 - 2[SO_4^{2-}]_0 + 2[SO_4^{2-}]}{K_s + [L]_0 - 2[SO_4^{2-}]_0 + 2[SO_4^{2-}]} \quad (4.16)$$

siendo $[SO_4^{2-}]_0$ la concentración inicial de sulfato. La integración de la ecuación 4.16 y su ajuste no lineal con los parámetros conocidos a datos de sulfato contra tiempo para los experimentos realizados a DQO/sulfato = 2, arrojó una constante de afinidad para el lactato K_s de $1.603 \pm 0.729 \text{ mmol L}^{-1}$, la cual puede expresarse también como $142.7 \pm 64.9 \text{ mg L}^{-1}$. En la figura 4 del anexo I, se presenta la gráfica del ajuste no lineal realizado con esta ecuación. Es de hacer notar que la constante de Monod para el lactato, aunque más alta que aquella para el sulfato, no es demasiado grande si se consideran las concentraciones manejadas en el proceso, las cuales van desde los 50mM hasta los 5mM aproximadamente. Sin embargo, su inclusión en el modelo debe obedecer a la influencia que ya se ha observado de la concentración del sustrato orgánico sobre la eficiencia del proceso sulfatorreductor.

Finalmente se llevó a cabo una simulación de datos de ácido láctico contra tiempo de acuerdo con la ecuación 4.17 para compararlos con datos experimentales de consumo de ácido láctico para una relación de alimentación DQO/sulfato de 2.

$$\frac{d[L^-]}{dt} = -2 \frac{\mu_{\max}[B]}{Y} \frac{[L^-]}{K_s + [L^-]} \quad (4.17)$$

En la figura 4.6 se puede presentar los datos experimentales mencionados así como la simulación realizada a partir de la ecuación 4.17.

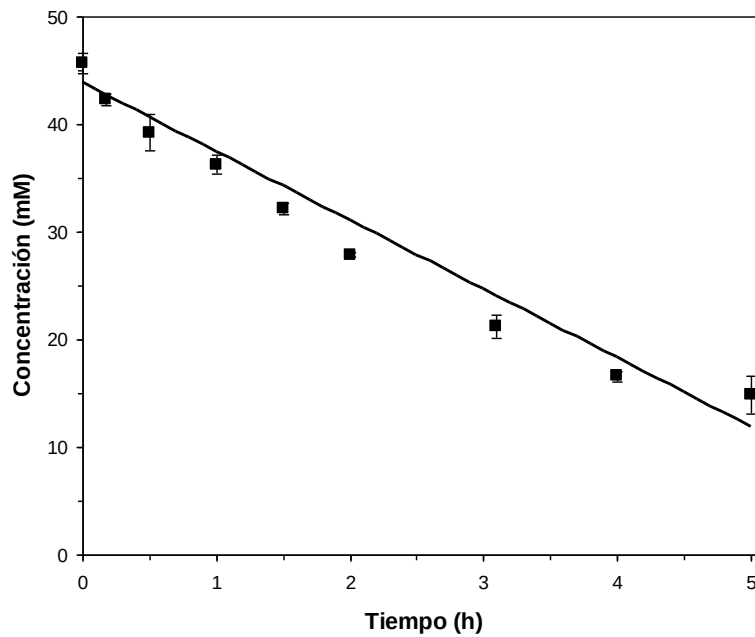


Figura 4.6 Resultados experimentales de consumo de ácido láctico en el reactor sulfatorreductor a una relación de alimentación DQO/SO₄²⁻ de 2 (■) y datos simulados a partir de la ecuación 4.17 (—).

La curva de simulación presenta un comportamiento relativamente cercano a los datos experimentales por lo que se puede decir que en general el modelo funciona. Es hacia el final de la curva donde se tienen concentraciones remanentes de sulfato y lactato donde la simulación presenta discrepancias en cuanto al punto en que la tasa de consumo decrece. Estas discrepancias pueden deberse a los errores inherentes producidos por las constantes que son alimentadas al modelo así como a la necesidad de considerar el término Monod del sulfato dentro de la ecuación 4.17, que si bien sería un término poco significativo al inicio del ciclo, en la fase final de consumo puede representar una diferencia en la capacidad del modelo de predecir dicha región del ciclo.

Las simplificaciones consideradas basadas en los hallazgos experimentales permitieron obtener un modelo funcional. La evidencia experimental ha indicado que bajo condiciones de operación como las presentadas aquí, el sistema no se ve afectado por el pH ni por la concentración de sulfuro como factores inhibidores. El potencial de óxido-reducción se presenta como un factor que puede afectar al proceso.

Sin embargo, bajo condiciones de operación normales donde no es introducido un agente de cambio redox importante en el sistema, el proceso mantendrá los niveles redox en gran medida bajo la influencia del ácido sulfhídrico producido, por lo que en este caso no se establece la necesidad de considerar un término de inhibición por potencial redox en el modelo. Sin embargo, es un aspecto a considerar en caso de que el sistema sulfatorreductor tuviera que trabajar bajo condiciones o en presencia de agentes no propios del proceso y que puedan cambiar el ambiente redox del mismo.

A través de esta sección del trabajo experimental se logró un mejor entendimiento del proceso sulfatorreductor que facilitó el montaje de experimentos posteriores así como un acercamiento a los términos convenientes en el modelado del proceso.

4.2 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DEL PROCESO SULFUROXIDANTE

Conocido el comportamiento general del proceso sulfatorreductor y previo al planteamiento de la operación de un reactor que combinara tanto el proceso anaerobio como el aerobio, se montó un reactor con biomasa suspendida para llevar a cabo un proceso sulfuroxidante y poder conocer el comportamiento del proceso en relación con el flujo de aire, los tiempos de ciclo y el predominio de las especies azufradas así como su interrelación con variables de proceso, en concreto con la lectura en línea del oxígeno disuelto.

Así mismo, se llevaron a cabo pruebas para determinar los parámetros de la sulfuroxidación química por ser considerados de utilidad en caso de que fuera necesario el modelado del proceso.

4.2.1 Parametrización de la sulfuroxidación química

Tal como ya se ha estudiado en la sección de antecedentes, el proceso sulfuroxidante puede ocurrir de manera espontánea por vía química o biológica, por lo que el planteamiento de ecuaciones que modelen dicho proceso de manera general deberían en principio incluir ambos fenómenos. En el caso por ejemplo de la producción de sulfato y de azufre, se pueden plantear las ecuaciones 4.18 y 4.19 respectivamente.

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = \frac{\mu_{SO4}B}{Y_{SO4}} + k_{SO4,1}[HS^-]^a[O_2]^b + k_{SO4,2}[S^o]^c[O_2]^d \quad (4.18)$$

$$\frac{d[S^o]}{dt} = \frac{\mu_s B}{Y_s} + k_s[HS^-]^f[O_2]^g - k_{SO4,2}[S^o]^c[O_2]^d \quad (4.19)$$

donde μ_s y μ_{SO4} son las tasas de crecimiento específicas para una sulfuroxidación biológica referida a la producción de azufre y a la producción de sulfato y que serían a su vez dependientes de las concentraciones de sulfuro y oxígeno disuelto; B es la concentración de biomasa e Y es el coeficiente de producción para cada caso. Si consideramos que existe una sulfuroxidación parcial de sulfuro a azufre y una oxidación máxima de sulfuro a sulfato, los dos términos restantes del lado derecho de ambas ecuaciones corresponden a la cinética de la sulfuroxidación química ya sea para oxidar el sulfuro directamente a sulfato con una constante de rapidez $k_{SO4,1}$, para oxidar

el azufre elemental a sulfato con una constante de rapidez $k_{SO4,2}$, y finalmente para oxidar el sulfuro a azufre elemental con una constante de rapidez k_S . $[SO_4^{2-}]$, $[HS^-]$, $[S^0]$ y $[O_2]$ son las concentraciones de sulfato, sulfuro, azufre y oxígeno disuelto respectivamente, y a , b , c , d , f y g son los ordenes de reacción respectivos para cada especie.

Aunque la determinación de todos los parámetros del modelo resulta considerablemente complicada, el grado de contribución del proceso biológico y el proceso químico se puede determinar mediante pruebas de respirometría, en las cuales se realiza una prueba de oxidación química separada de la oxidación químico-biológica. Este tipo de pruebas de respirometría se han descrito a detalle en la sección 3.1.2 del capítulo de materiales y metodología. De esta forma es posible obtener curvas de consumo de oxígeno en función del tiempo como consecuencia de la oxidación química del sulfuro agregado.

De acuerdo con el modelo planteado, la ecuación (4.20) representa el consumo de oxígeno disuelto por las diversas vías para el proceso sulfurooxidante. Los dos primeros términos, de izquierda a derecha, involucran el consumo biológico derivado de la reacción de oxidación a sulfato y de la reacción de oxidación a azufre elemental; el tercer término corresponde a la transferencia de oxígeno al licor del reactor como consecuencia de la aereación, donde $k_L a$ es el coeficiente de transferencia del oxígeno y O_{sat} la concentración máxima de saturación del oxígeno en el agua; y al final los tres términos de oxidación química planteados en las ecuaciones 4.18 y 4.19, a saber, la oxidación de sulfuro y azufre a sulfato así como la oxidación de sulfuro a azufre.

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -2 \frac{\mu_{SO4} B}{Y_{SO4}} - \frac{\mu_S B}{2Y_S} + k_L a (O_{sat} - O_2) - k_{SO4,1} [HS^-]^a [O_2]^b - k_{SO4,2} [S^0]^c [O_2]^d - k_S [HS^-]^f [O_2]^g \quad (4.20)$$

La obtención precisa de todos los parámetros incluso de la oxidación química se plantea complicada. En publicaciones previas donde se establece la oxidación del sulfuro se considera un solo término de oxidación química (Chen y Morris, 1972) lo cual simplifica el término químico. De igual forma, dada la dificultad de diferenciar entre las varias y no necesariamente distinguibles etapas de oxidación de las especies azufradas, es más factible plantear un solo término para la oxidación biológica de tal suerte que la ecuación (4.20) queda como sigue:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -\frac{\mu B}{Y} + k_L a(O_{sat} - O_2) - k[HS^-]^a [O_2]^b \quad (4.21)$$

donde μ es la tasa de crecimiento específica biológica única, y donde los dos últimos términos son el de transferencia nuevamente y un solo término cinético de oxidación química con a y b como los ordenes de reacción respecto al sulfuro y al oxígeno respectivamente. La determinación del término de transferencia depende de mediciones concretas en el reactor y del sistema de aereación que se pretenda utilizar, por lo que es un término mucho más cambiante que los otros dos y su determinación se debe realizar en su caso para cada tipo y condición de aereación del reactor.

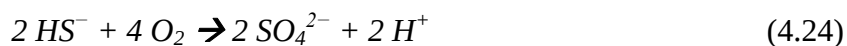
La determinación experimental de los parámetros de la oxidación química fue realizada mediante el uso de curvas de consumo de oxígeno contra concentraciones iniciales de sulfuro disuelto ya que el término de oxidación química está planteado en función de la concentración de oxígeno y de sulfuro presentes y cuyos parámetros dependen de temperatura y pH principalmente. Si únicamente se considera la oxidación química, la ecuación (4.21) queda como:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -k[HS^-]^a [O_2]^b \quad (4.22)$$

Como resulta más fácil medir el oxígeno disuelto que el sulfuro sin arriesgarse a introducir variables de error en las mediciones, se planteó la ecuación en función del oxígeno y no del sulfuro. La obtención del orden de reacción respecto al oxígeno y respecto al sulfuro se hizo por partes, ya que resulta más complicado ajustar los parámetros simultáneamente. Primero se realizó la determinación del orden de reacción con respecto al oxígeno, para lo cual fue necesario plantear condiciones experimentales que permitieran despreciar el término del sulfuro. Esto únicamente se logra si el valor de la concentración de sulfuro se acerca a 1 en las unidades en que se llevará a cabo la determinación cinética, y que permanezca relativamente constante durante el experimento de consumo de oxígeno.

Para este caso se determinó como medida de concentración estándar las milimoles, de tal manera que, cuando la concentración de sulfuro fuera de 1mM, el dicho término pudiera ser despreciado, y siempre y cuando la concentración no variara demasiado. Así pues se consideró que a una concentración inicial de saturación de oxígeno ($\sim 7\text{mg/L} = 0.22\text{mM}$) y a una concentración de sulfuro de 1 mM se garantiza que la concentración de sulfuro no se aleje demasiado de su valor inicial, ya que la concentración de oxígeno está muy por debajo de la de

sulfuro y que, dada la estequiometría de las reacciones de oxidación (ecuaciones 4.23 y 4.24), se espera un consumo de sulfuro poco significativo para el total presente (menos del 10% de cambio en la concentración total de sulfuro).



Tras la realización de diversos experimentos de respirometría con una concentración inicial de 1mM de sulfuro y en un medio a pH 7 saturado con oxígeno, se obtuvo una curva promedio del consumo de oxígeno con la cual se llevó a cabo el ajuste de la ecuación 4.22 integrada, la cual tras despreciar el término de sulfuro queda como sigue:

$$[O_2] = (-kt(-b+1) + [O_2]_0^{-b+1})^{1/(-b+1)} \quad (4.25)$$

La figura 4.7 muestra el ajuste no lineal realizado a los datos experimentales de la respirometría promedio a 30°C, a partir de una concentración inicial de oxígeno ($[O_2]_0$) en el punto de saturación, aproximadamente 0.2 mM, y la cual fue disminuyendo por efecto de la sulfurooxidación durante un lapso de 20 minutos. Se puede observar que se logra un buen ajuste del modelo de acuerdo con el factor de correlación y la minimización de la función χ^2 utilizada por el método numérico de ajuste no lineal. En el anexo I se presentan los ajustes individuales, sin embargo, se consideró más confiable realizar el ajuste de la curva promedio que se presenta.

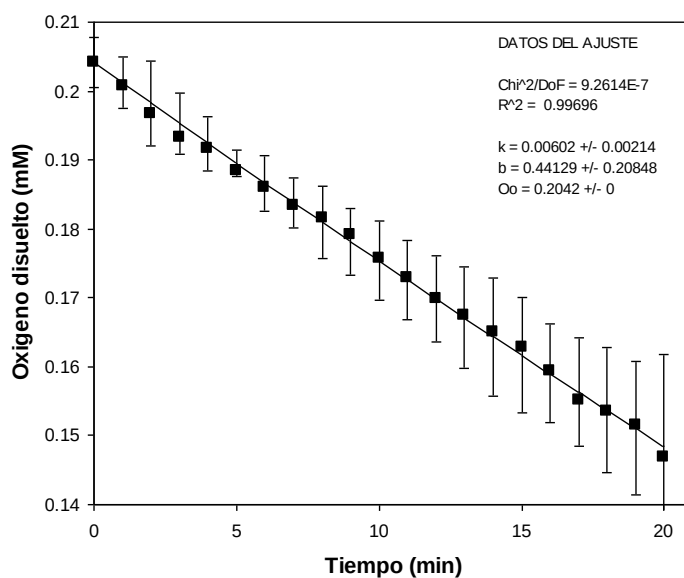


Figura 4.7. Consumo de oxígeno promedio por efecto de la sulfurooxidación química para una concentración inicial de sulfuro de 1mM. Datos experimentales (■), Ajuste del modelo (—). Se presentan igualmente los parámetros ajustados.

A partir de estos resultados se pudo obtener una constante de rapidez $k=0.006 \pm 0.002 \text{ mM min}^{-1}$ así como el orden de reacción con respecto al oxígeno $b=0.441 \pm 0.208$. Si bien este valor del orden de reacción obtenido a partir de la curva 4.7 es pequeño y con una incertidumbre significativa, es cercano al valor reportado en la literatura (Chen y Morris, 1972).

Posteriormente, para encontrar el orden con respecto al sulfuro, se recurrió a múltiples experimentos de consumo de oxígeno a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro. La figura 4.8 muestra las curvas promedio de consumo de oxígeno para diferentes concentraciones iniciales de sulfuro. Tal como es de esperarse la tasa de consumo de oxígeno cambia conforme hay más sulfuro disponible, de este modo es posible plantear un ajuste del orden del sulfuro en una curva donde la rapidez de consumo de oxígeno ($d[O_2]/dt$) quede en función de las variaciones de concentración inicial de sulfuro.

De este modo se puede plantear, junto con el balance de sulfuro presente y consumido que, a partir de la ecuación 4.22, la rapidez de consumo de oxígeno queda dada por la ecuación 4.26, para la cual se tomó en cuenta que la estequiometría de oxidación de sulfuro, dadas las condiciones experimentales, correspondería a la de la generación de azufre (2 moles de sulfuro por mol de oxígeno, ver ecuación 4.23) en vez de la de la generación de sulfato (1 mol de sulfuro por dos moles de oxígeno, ver ecuación 4.24) y así la rapidez queda expresada como:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -k([HS^-]_0 - 2[O_2]_0 + 2[O_2])^a [O_2]^b \quad (4.26)$$

donde $[HS^-]_0$ es la concentración inicial de sulfuro, $[O_2]_0$ es la concentración inicial de oxígeno disuelto. Tomando en cuenta que todas las curvas parten de valores similares de oxígeno disuelto, se puede considerar esta concentración como constante. Por otro lado la concentración de oxígeno $[O_2]$ se puede estimar como un valor promedio si el valor de la rapidez tomado para el ajuste corresponde a un mismo intervalo de variación del oxígeno disuelto para todas las curvas. De esta manera, se presenta la figura 4.9, en la cual se grafican las rapidezces de consumo de oxígeno de la figura 4.8 contra las concentraciones iniciales de sulfuro; datos a los cuales a su vez se ajusta la ecuación 4.26 para obtener el orden de sulfurooxidación química con respecto al sulfuro. Se puede observar una buena correlación entre los datos experimentales y la ecuación.

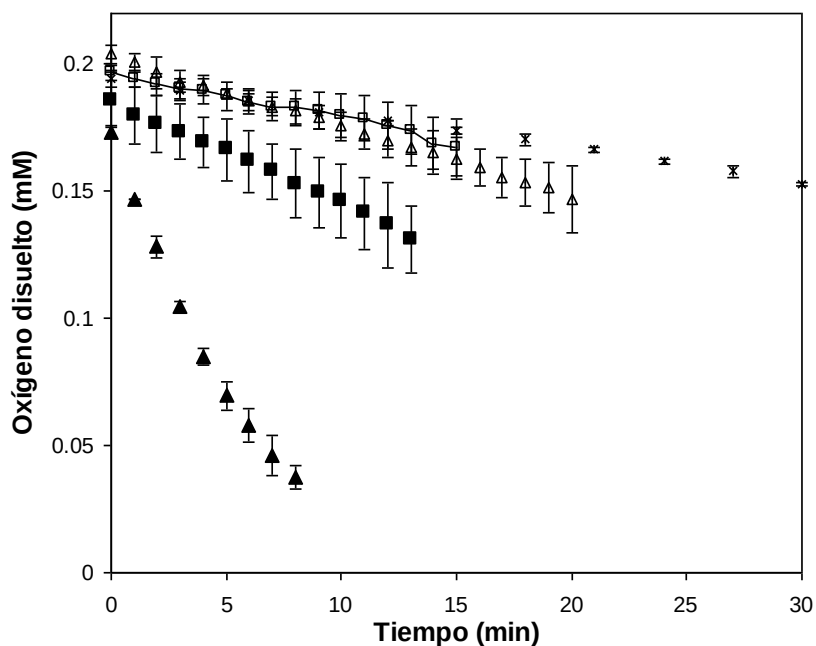


Figura 4.8. Consumo de oxígeno promedio por efecto de la sulfuroxidación química para diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0.1mM (*), 0.5mM (□), 1mM (Δ), 2mM (■) y 6 mM (▲)

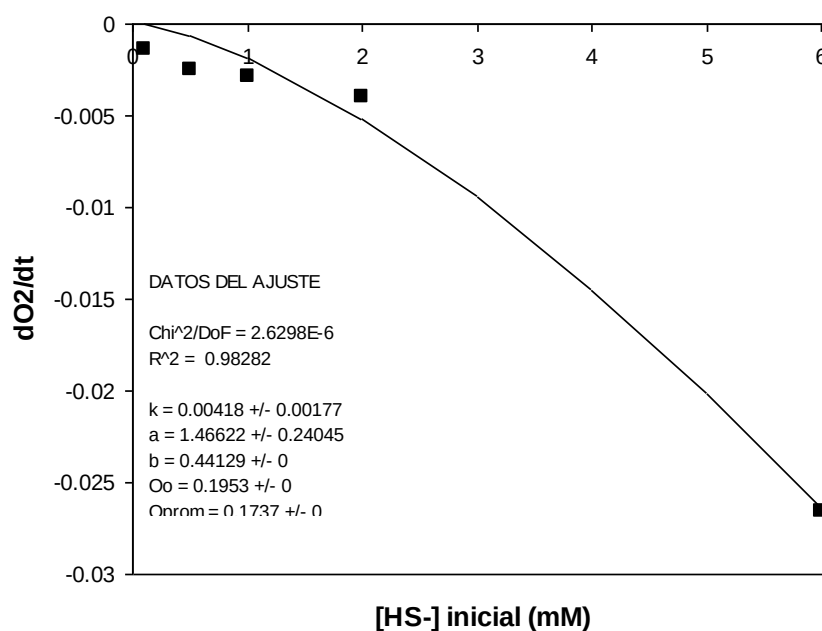


Figura 4.9. Rapidez de consumo de oxígeno contra sulfuro inicial. Datos experimentales (■), Ajuste del modelo (—). Se presentan dentro de la gráfica los parámetros ajustados

De acuerdo con el ajuste de la figura 4.9, se obtiene un orden de reacción con respecto al sulfuro de $a=1.466 \pm 0.240$ y una constante de rapidez $k=0.004 \pm 0.002 \text{ mM min}^{-1}$, la cual no difiere

mucho de la obtenida para el ajuste del orden del oxígeno. Chen y Morris (1972) llevaron a cabo experimentos para determinar la cinética de oxidación química del sulfuro planteando una ecuación como la 4.22 a 25°C y obtuvieron un orden de reacción con respecto al oxígeno de $b=0.56\pm0.03$ y con respecto al sulfuro de $a=1.34\pm0.04$, valores que difieren poco del obtenido a 30°C. El valor promedio de la constante k resulta entonces de 0.005 ± 0.001 en unidades $\text{mM}^{-0.91} \text{ min}^{-1}$, lo que se traduce en $164.3\pm32.9 \text{ M}^{-0.91} \text{ h}^{-1}$, valor que resulta superior al rango de valores publicados por Chen y Morris (1972) que oscilan entre 6 y $22 \text{ M}^{-0.9} \text{ h}^{-1}$ para valores de pH entre 7 y 8. Las unidades de molaridad de la constante de rapidez tienen un exponente fraccionario correspondiente a la combinación de los ordenes de reacción encontrados.

Es posible pues que la condición de mayor temperatura respecto de los valores publicados sea el factor principal de la discrepancia. La obtención del orden de reacción utilizando la estequiometría de la producción de azufre y no de sulfato ha obedecido a observaciones que serán detalladas en la siguiente sección en la cual se logró ver que la sulfurooxidación ocurre por etapas bajo condiciones de aereación continua, por lo que se consideró una aproximación razonable plantear la estequiometría de menor consumo de oxígeno para las respirometrías por tratarse de experimentos donde no se airea y donde el tiempo de medición es corto. La obtención de los parámetros de sulfurooxidación química pueden ser de utilidad para un planteamiento más amplio del modelo sulfurooxidante.

4.2.2 Relación entre la oxidación del sulfuro y el oxígeno disuelto en línea

Tal como se describe en la sección 3.1.2 del capítulo de la metodología, se montó un reactor de 2 litros de capacidad, con un volumen de trabajo de 1.5 L para estudiar diversos aspectos de operación del proceso sulfurooxidante. El reactor fue inoculado con lodos de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales así como con una muestra de lodos proveniente de una laguna sulfurosa. Desde el primer día se alimentó con una concentración promedio de 1 g/L de NaHCO_3 como fuente inorgánica de carbono para las bacterias litoautótrofas, un medio mineral descrito en la tabla 3.3 de la sección de metodología, así como sulfuro de sodio a concentraciones que variaban para dar razones molares $\text{HCO}_3^-/\text{sulfuro}$ teóricas de entre 2.5 y 3.5 dentro del reactor. El reactor se operó con aereación constante y la mayor parte del tiempo con ciclos de 48 horas,

puesto que se detectó que era el tiempo suficiente para que todo el sulfuro alimentado se transformara a sulfato, esto con la intención de completar todo el ciclo oxidativo. Al inicio de cada ciclo de ajustaba el pH a 8 para disminuir el lavado del sulfuro hacia las trampas del mismo.

En la figura 4.10 se presenta la evolución en la operación del reactor a lo largo de 230 días. Se puede observar cómo fue aumentándose paulatinamente la alimentación de sulfuro por día e igualmente cómo la producción de sulfato fue observándose en el mismo sentido. La conversión que se obtenía de sulfato era cercana al 100% con una baja pérdida de sulfuro hacia fuera del reactor gracias a su pH inicial de 8 en cada ciclo. La biomasa suspendida igualmente fue en aumento pero muy lentamente desde cerca de los 300 mg/L, manteniéndose siempre por debajo del orden de los gramos, con un máximo registrado de hasta 680 mg/L.

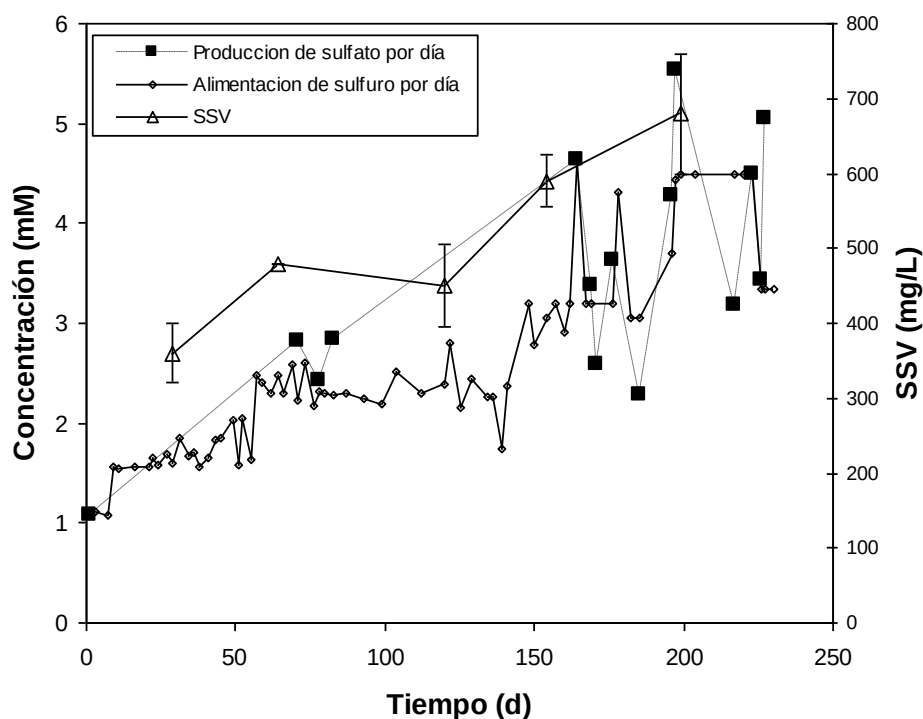


Figura 4.10. Evolución del reactor sulfurooxidante de 1.5 L. Se muestra la producción de sulfato (mM d^{-1}) (---■---), así como el sulfuro alimentado (mM d^{-1}) (—●—) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) (—△—).

Hacia la mitad del tiempo de operación, se le instaló al reactor un controlador de flujo másico para mantener el flujo de aire constante el cual para la mayoría de los ciclos fue de 220 mL/min. Dado que el volumen del reactor es de 1.5 litros se tiene pues bajo estas condiciones, un flujo específico de aire de $146 \text{ mL L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Posteriormente se instaló un sistema para seguimiento en línea de flujo de aire, oxígeno disuelto, pH y temperatura, tras lo cual, una vez alcanzada una

alimentación de sulfuro de más de 3 mM d^{-1} , se llevaron a cabo una serie experimentos cinéticos para dar seguimiento a las variables en línea como el oxígeno disuelto y el pH así como para determinar la influencia del régimen de aereación sobre el proceso.

Se realizaron corridas experimentales a diferentes flujos de aire llevando a su vez el seguimiento de las principales especies azufradas. Las tres condiciones de aereación probadas fueron 200, 400 y 600 mL de aire por minuto, utilizando para ello el controlador de flujo másico. Esto implicó 147, 266 y 400 $\text{mL L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de flujo de aire por litro de reactor respectivamente. Para los tres casos y las relación de alimentación $\text{HCO}_3^-/\text{sulfuro}$ fue la misma, a saber 1.7.

La figura 4.11 presenta el perfil de oxígeno disuelto y pH (4.11A) y la evolución de las especies azufradas (4.11B) a lo largo del ciclo con un aereación de $266 \text{ mL L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Lo que se puede observar primeramente, es lo que se espera del proceso en sí: la disminución del sulfuro y el aumento del sulfato conforme se acerca el final del ciclo. Sin embargo durante el transcurso del ciclo se llega a un punto donde el sulfuro ha desaparecido y donde la formación de sulfato resulta aún muy baja. Es en este punto donde se puede apreciar la formación de la mayor cantidad de azufre. De este modo se puede ver que las etapas del proceso de oxidación pueden distinguirse tanto en el perfil de oxígeno como en la evolución de las especies azufradas.

La figura 4.11A presenta un perfil de oxígeno disuelto que presenta cuatro estados: I) un estado de consumo casi total del oxígeno al inicio del ciclo, II) un estado de consumo moderado de oxígeno lo que lleva al aumento del oxígeno disuelto detectado, III) una segunda etapa de alta demanda de oxígeno llevando nuevamente a una reducción de los niveles del mismo y IV) un aumento final del oxígeno al termino del ciclo. Por su parte en la figura 4.11B se puede observar que es durante la etapa I que predomina la desaparición del sulfuro disuelto, durante la etapa II casi no queda sulfuro pero se detecta muy poca cantidad de sulfato aún, mientras que se detecta una considerable cantidad de azufre y baja la demanda de oxígeno; durante la etapa III comienza a verse un aumento en la cantidad de sulfato y una disminución en la cantidad de azufre, lo que se relaciona con el aumento nuevamente de la demanda de oxígeno. Finalmente llegando a la etapa IV, la especie predominante termina siendo el sulfato y la concentración de oxígeno vuelve a recuperarse. Esto está en concordancia con que la oxidación parcial del sulfuro lleva a azufre elemental y la oxidación final a sulfato, por lo que se espera que una ocurra antes de la otra, sin embargo, el hecho de poder distinguir dichas etapas a través de una variable en línea abre la puerta para establecer una estrategia de control del proceso.

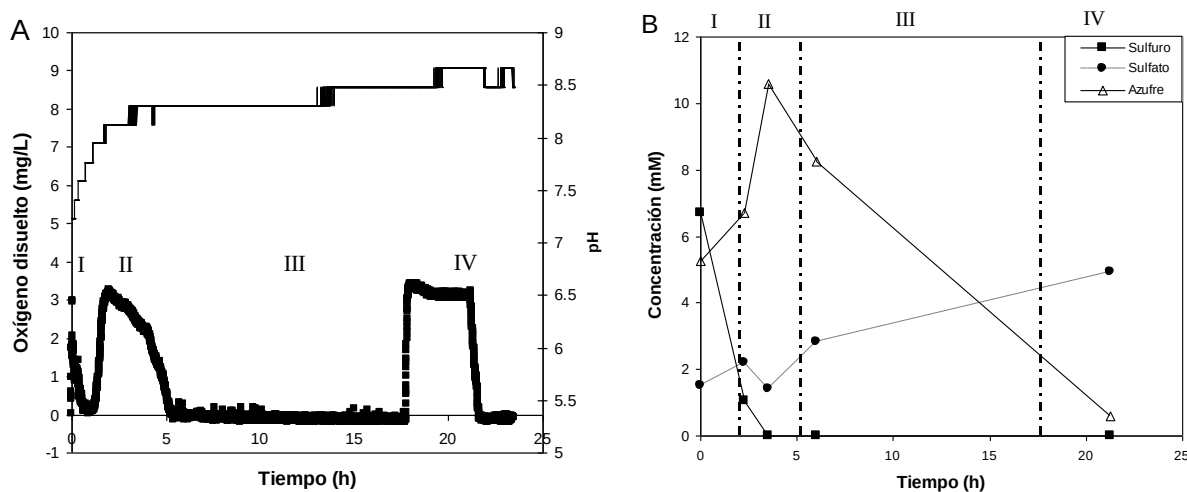


Figura 4.11. A: registro en línea de pH (—) y oxígeno disuelto (■) (mg/L) para un ciclo sulfuroxidante con suministro de aire de 266 ml/l min. Se señalan cuatro etapas distinguibles en el perfil de oxígeno disuelto. **B:** cuantificación de especies azufradas en el mismo ciclo.

Por otro lado, tal y como se podría suponer, si el flujo de aire suministrado es muy alto, la conversión a sulfato será más rápida. En la figura 4.12 se observan los mismos perfiles de la figura 4.11 pero para un régimen de aereación mayor (400 mL/L min). Se puede observar que la producción de sulfato es considerablemente más rápida y que se produce muy poco azufre, además de que no se pueden distinguir cambios en la señal de oxígeno disuelto, más que únicamente su aumento y estabilización una vez que prácticamente se ha producido todo el sulfato.

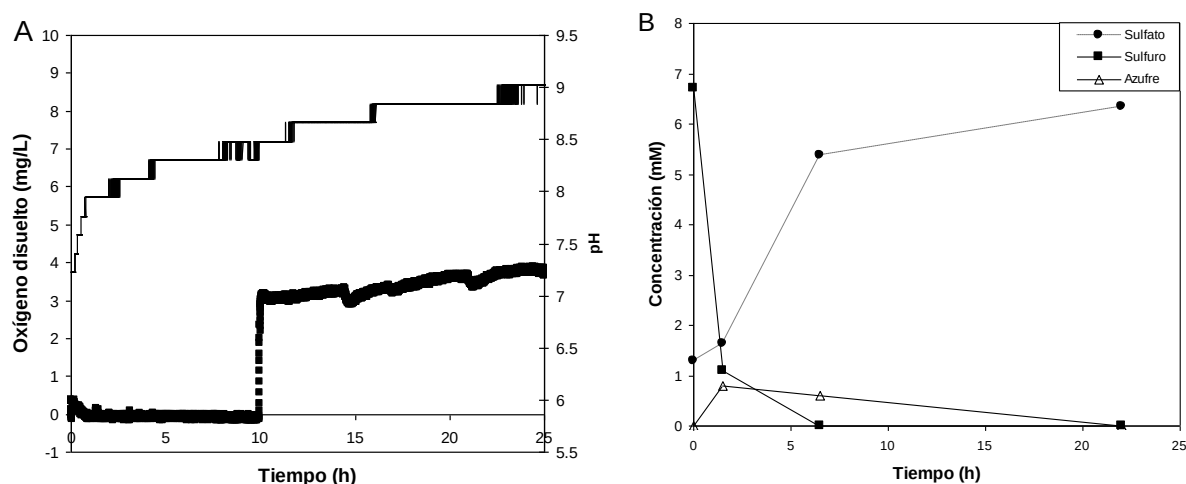


Figura 4.12. A: registro en línea de pH (—) y oxígeno disuelto (■) (mg/L) para un ciclo sulfuroxidante con suministro de aire de 400 ml/l min. **B:** cuantificación de especies azufradas en el mismo ciclo.

IV. RESULTADOS

Es pues que dependiendo del nivel de aereación se podrían o no distinguir en línea las etapas de la sulfuroxidación. De igual manera para un flujo de aire más bajo se espera un alargamiento de la oxidación. La figura 4.13 muestra igualmente los perfiles de oxígeno y de especies azufradas para el régimen de aire de 147 mL/L min, en el cual se puede, al igual que a 266 mL/L min, distinguir una producción de azufre significativa gracias a la baja aereación, pero un alargamiento de la etapa II, la cual prácticamente se junta con la etapa IV hacia el final del ciclo, lo que implica que la baja aereación induce a una disminución en la demanda misma del oxígeno y todo el proceso se lleva a cabo más lentamente.

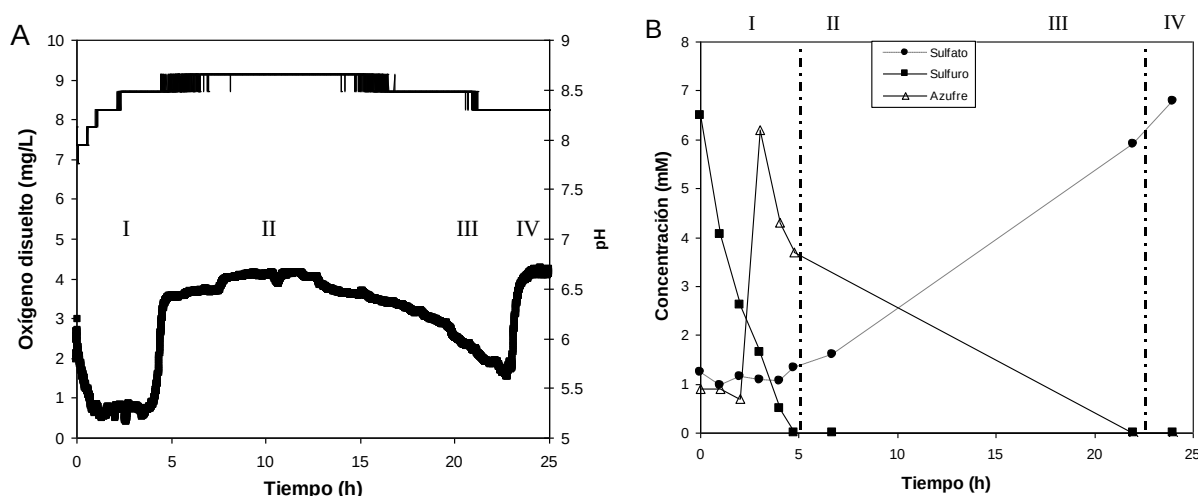


Figura 4.13. A: registro en línea de pH (—) y oxígeno disuelto (■) (mg/L) para un ciclo sulfuroxidante con suministro de aire de 147 ml/l min. **B:** cuantificación de especies azufradas en el mismo ciclo.

Lo anterior se observa si se cuantifica el tiempo total de ciclo para cada condición de aereación. En la tabla 4.4 se resumen los resultados para las tres condiciones evaluadas. Se pueden observar conversiones significativas de sulfuro a azufre elemental para el caso de los experimentos a 147 y 266 mL/L min de aire. Las discrepancias en la obtención de azufre entre estos pueden deberse a factores como el pH, pues es un factor importante para la producción de azufre elemental (Steudel, 2003). Se puede ver que conforme mayor es el suministro de aire, más corto es el ciclo para llegar hasta la conversión a sulfato, situación que resulta consistente con la expectativa; para el experimento con el suministro de aire más alto (400 mL/Lmin) el ciclo hasta sulfato es de tan sólo 10 horas, mientras que en el flujo de aire más bajo el ciclo llega a durar hasta 23 horas. Es importante destacar igualmente que, de acuerdo con los perfiles de oxígeno disuelto, conforme

mayor es el flujo de aire, se favorece la demanda de oxígeno, situación que está en concordancia con la dependencia cinética de la oxidación con la concentración de oxígeno.

En lo que respecta al lavado del sulfuro fuera del reactor, se tienen datos de las cantidades de ácido sulfhídrico que salen del mismo como efecto de su transferencia a la fase gaseosa. Tal como se espera el lavado es mayor conforme aumenta la cantidad de aire suministrado; este fenómeno ocasiona que el pH del sistema aumente cerca o por encima de 8.5 no sólo hacia el final del ciclo sino desde el momento en que el sulfuro comienza a ser consumido. Es claro pues que el proceso sulfurooxidante por su condición de aereación y eliminación de sulfuro, no tiene la capacidad de mantener el pH en un nivel cercano a la neutralidad, lo cual resulta poco conveniente por dos razones: la producción de azufre elemental se favorece a un pH igual o menor a 8 (Steudel, 2003, González-Sánchez y Revah, 2007), y, el hecho de que el pH a niveles de 8.5 o 9 podría llevar a la inhibición de la biomasa. Es pues necesario considerar este aspecto en el acoplamiento de los procesos sulfatorreductor y sulfurooxidante.

Tabla 4.4. Resultados generales de los ciclos sulfurooxidantes de acuerdo con las variaciones en el suministro de aire.

Flujo de aire	147 mL/L min	266 mL/L min	400 mL/L min
Concentración máxima de S° registrada	6.2mM	10.6mM	0.8mM
Conversión del sulfuro alimentado a S°	60%	80%	10%
Duración del ciclo hasta sulfato	23 h	17.5 h	10 h
pH inicial	7.9	7.3	7.3
pH final	8.5	8.5	9
% de sulfuro lavado hacia la trampa	ND	12% del total inicial	23% del total inicial

Por otra parte es importante mencionar que durante las tres condiciones de aereación no se detectó tiosulfato, el cual en algunos casos se ha reportado como intermediario de la sulfurooxidación (Velasco *et al.*, 2004, González-Sánchez *et al.*, 2005, Krishnakumar *et al.*, 2005). Así mismo, el consumo de carbono inorgánico total es de 6.8 mM a lo largo de un ciclo de 17 horas. Sin embargo, este consumo no es solamente atribuible a la población bacteriana sino también al mismo proceso de transferencia a la fase gas.

Desde la óptica del modelo sulfurooxidante, los hallazgos de estos experimentos llevan a concluir que el proceso puede modelarse por separado, es decir, que las etapas oxidativas que

llevan a azufre y sulfato, al ser diferentes, pueden necesitar de un tratamiento diferenciado desde el punto de vista del modelado cinético, así como aquellas que llevan de sulfuro directamente hasta sulfato como en el caso del régimen de aereación de 400 mL/L min.

La búsqueda de los parámetros de la ecuación 4.22, contempla únicamente la oxidación química del sulfuro, sin embargo, es de notar que en realidad los parámetros determinados para la oxidación química no presentan una especificidad en términos de la especie resultante, azufre o sulfato. Los hallazgos de esta sección dan la guía de que de hecho los parámetros cinéticos de la oxidación química, bajo condiciones de exceso de sulfuro, son los correspondientes al fenómeno inmediato de la oxidación, es decir, la formación de polisulfuros y azufre elemental y no a la transformación hasta sulfato, por lo que para modelar esta segunda etapa implicaría más bien determinar cinéticas de transformación entre azufre y sulfato, o bien bajo regímenes de aereación agresivos.

Por otro lado, si se trabaja solamente en la primera fase del proceso de oxidación, los términos planteados en la ecuación 4.20 para la oxidación hasta sulfato se pueden eliminar del modelado, gracias a la posibilidad de separar las etapas oxidativas a través de un régimen de aereación específico, por lo que la simplificación a la ecuación 4.21 sería factible y bajo ciertas condiciones de aereación no necesitaría contemplar ningún término cinético adicional.

La correlación entre el perfil de oxígeno disuelto y la detección de las especies azufradas, particularmente del azufre elemental, es de relevancia pues implica la posibilidad de usar la variable del oxígeno disuelto como indicador indirecto del fenómeno de sulfurooxidación. Sin embargo es importante destacar que, durante las etapas en las que el oxígeno disuelto cae a valores cercanos a cero, esta variable representa una caja negra, al no poder contar con una lectura confiable del oxígeno disuelto, lo que dificulta su uso para un control en línea. Sin embargo, se cuenta con evidencia (Jong y Parry, 2006) de que el potencial redox es una variable sensible, no sólo a posibles cambios por las transformaciones de las especies azufradas, sino a los niveles de oxigenación de un sistema. Los hallazgos de esta sección plantean la necesidad de explorar el proceso sulfurooxidante en términos del potencial redox. La realización de este tipo de experimentos se llevó a cabo para el proceso combinado que se describe en la sección 4.4 de resultados.

4.3. COLONIZACIÓN DE UN CONSORCIO SULFATORREDUCTOR EN UN LECHO MÓVIL

Tras la caracterización cinética de ambos procesos y con la intención de operar el reactor combinado mediante un lecho móvil, se llevaron a cabo pruebas de colonización de un soporte plástico por parte de una población bacteriana sulfatorreductora así como la continuidad en la aclimatación de biomasa sulfatorreductora que después sirviera de inóculo para el reactor combinado. Para ello, un reactor piloto de laboratorio de 2 litros de volumen de trabajo fue inoculado con lodos provenientes de un proceso sulfatorreductor previo, de una planta de tratamiento municipal y de una muestra tomada de una laguna sulfurosa. Este reactor se alimentó bajo el mismo esquema del reactor sulfatorreductor utilizado para la caracterización cinética en la sección 4.1 de resultados. Las características de la operación se especifican con detalle en la sección 3.1.3 de la metodología.

La biomasa fue aclimatada por medio de ciclos variables hasta que, tras 20 ciclos, con una duración total de 26 días, el proceso se estabilizó logrando la sulfatorreducción total con una duración de 24 horas por ciclo. Conforme pasaron más días de operación, la tasa de remoción de sulfato alcanzó valores de hasta $1.8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, reduciéndose el ciclo de operación a 12 horas. En la figura 4.14 se muestra la evolución del sulfato consumido y el sulfuro detectado en el efluente del reactor a lo largo de todos los días de operación del mismo.

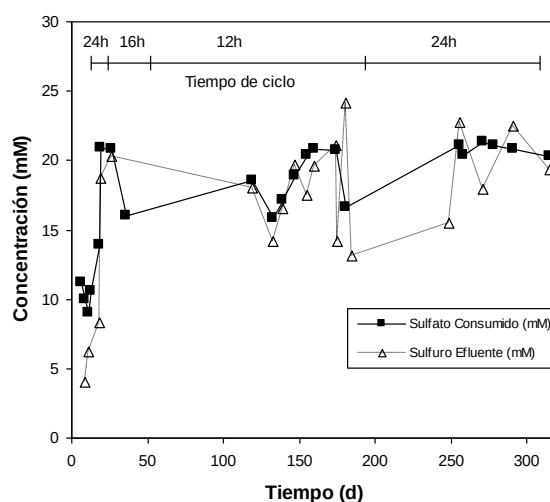


Figura 4.14. Evolución del sulfato consumido y el sulfuro detectado en el efluente del reactor a lo largo de la operación del proceso sulfatorreductor. En la parte superior de la figura se presenta la duración de un ciclo la etapa de operación correspondiente.

Se observa en la figura anterior que el proceso fue aclimatándose a un ciclo cada vez más corto de tal forma que se llegó a 12 horas por ciclo. Sin embargo, tras el día 180 de operación el reactor fue sometido a un paro de actividad tras lo cual continuó su operación pero en ciclos de 24 horas. Se puede ver de cualquier forma que a lo largo de la operación, el desempeño del proceso sulfatorreductor mostró un consumo estable de sulfato en sus diferentes etapas. A lo largo de la operación, el consumo de sulfato fue de 19.5 ± 2.0 mM con una remoción del 100%, y el sulfuro detectado en el efluente de 18.5 ± 3.2 mM. Dado que en cada ciclo únicamente se vaciaba el reactor hasta un 60% de su volumen, se detectaba aproximadamente 7 mM de sulfuro remanente al inicio de cada ciclo, lo que implica que el la producción real de sulfuro estuvo en valores de entre 11 y 12 mM, es decir, un 60% del sulfato consumido. Esto implica que el resto del sulfuro se transfería durante los ciclos al espacio de cabeza del reactor o se transformaba en una especie más oxidada no detectada como polisulfuros.

En la figura 4.15 se muestra la evolución de la tasa global de remoción de sulfato para los primeros 180 días de operación. Se puede observar que los valores de remoción de sulfato a los que se llega a partir del día 20 son cercanos, y en algunos casos superiores, a los de otros procesos sulfatorreductores. Por ejemplo, Celis-García *et al.* (2007) obtienen una tasa máxima de remoción de sulfato de 2.38 mM h^{-1} , Venkata Mohan *et al.* (2005), 1.33 mM h^{-1} , Khanal y Huang (2006), 0.85 mM h^{-1} , etc.

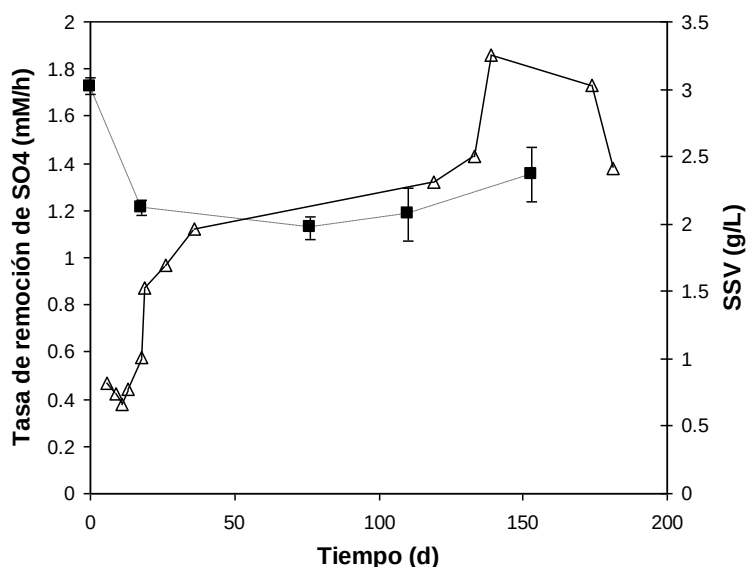


Figura 4.15. Evolución de la tasa global de remoción de sulfato para el reactor sulfatorreductor (—Δ—) y de la biomasa suspendida como sólidos suspendidos volátiles (—■—).

De la figura 4.15 se observa que la biomasa suspendida se mantiene en valores relativamente constantes con un promedio de 2.31 ± 0.42 g de SSV / L.

Una vez alcanzada la estabilidad del proceso se tomaron muestras de la biomasa suspendida aclimatada para identificar, mediante análisis de ADN, el tipo de bacterias presentes en el reactor. Se tomaron muestras por triplicado de aproximadamente 1 mililitro del sedimento de la biomasa en tubos Eppendorf de 1.5 mL, las cuales fueron llevadas al laboratorio de microbiología de la unidad académica donde se realizó esta tesis y donde, con el apoyo de la Dra. María Elena Raynal, se replicó el ADN y se obtuvieron, mediante la técnica de electroforesis con gradiente de gel desnaturalizante (DGGE), las bandas de ADN diferenciado. Estas se enviaron posteriormente a secuenciar, para comparar la secuencia resultante en un banco de datos de secuencias de material genético. La figura 4.16A muestra la fotografía de los 7 fragmentos de ADN en bandas en el gel que lograron distinguirse y separarse para llevar a cabo una identificación bacteriana. La figura 4.16B muestra una micrografía de bacterias provenientes del empaque colonizado identificadas mediante la técnica de tinción de Gram.

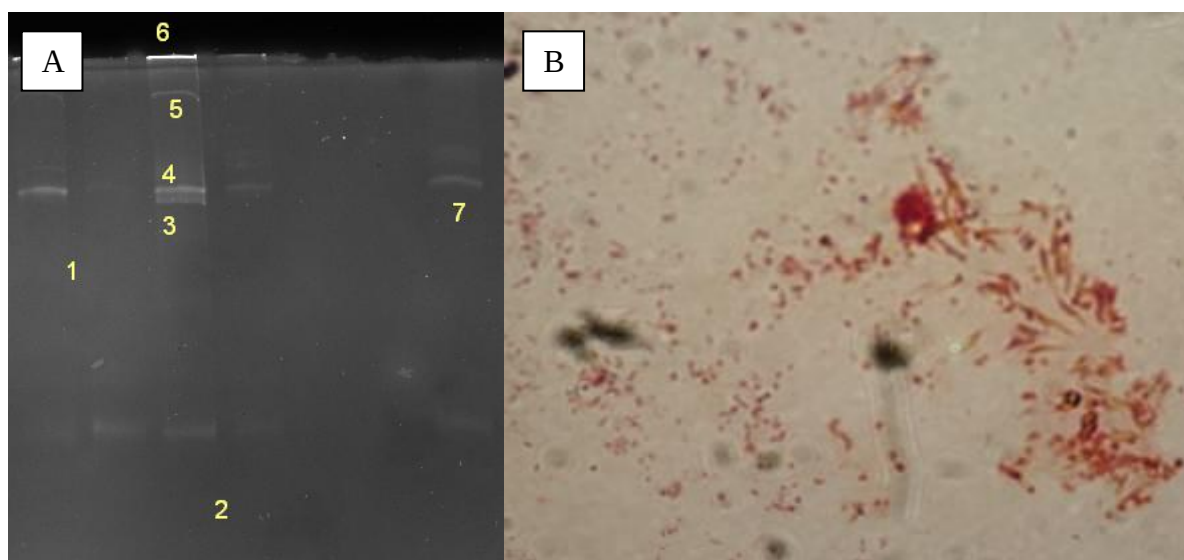


Figura 4.16 A. Fotografía de las 7 bandas identificadas en el proceso de separación de ADN. Las bandas fueron cortadas y enviadas a secuenciar. Posteriormente la secuencia se comparó en un banco de secuencias. **B.** Micrografía de identificación de bacterias por tinción de Gram de biomasa proveniente del empaque colonizado.

Los resultados de la identificación bacteriana arrojaron que la biomasa contenía bacterias de la familia *Clostridia*, *Actinobacteria*, *Eubacterium limosum*, *Desulfurococcus* y *Desulfobulbus sp.*,

de los cuales los tres últimos están asociados a procesos sulfatorreductores. La identificación es de importancia en terminos de comparar muestras posteriores que se tomaron de la biomasa adherida al soporte plástico y determinar si esta especie efectivamente se adhirió.

Posteriormente, el día 180 de operación se introdujeron al reactor 150 empaques plásticos, como los descritos en la sección 3.2.1 de la metodología, para ser usados como soportes de la biomasa sulfatorreductora. Tras su introducción al reactor la alimentación continuó sin ningún cambio. Para medir la colonización de los empaques, algunos de estos eran sacados periódicamente para realizar pruebas de actividad sulfatorreductora, sin la biomasa suspendida, tal y como se describe en la sección 3.1.3 de la metodología. En un lapso de 30 días los empaques pasaron de una tasa de sulfatorreducción de 0 a 0.71 mM/h, es decir, cercana a la mitad de la tasa de sulfatorreducción global del reactor.

Dado el resultado anterior, se buscó colonizar una cantidad mayor de empaque, tal que abarcara un 40% del volumen del reactor, por lo que se agregaron 650 empaques más el día 250 de operación para dar un total de 800 empaques. La colonización del empaque se determinó de la misma manera que la descrita para los 150 empaques.

La figura 4.17 muestra la evolución de la tasa global de consumo de sulfato para el reactor entre los días 250 y 320 de operación, así como la evolución de la capacidad sulfatorreductora del empaque que se estaba buscando colonizar.

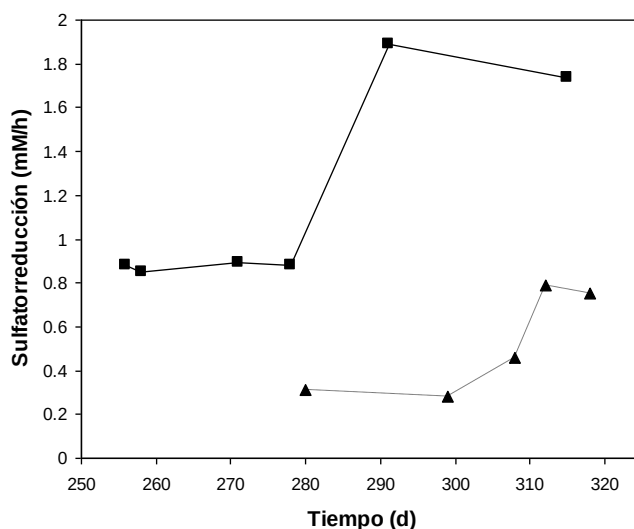


Figura 4.17. Evolución de la tasa global de remoción de sulfato para el reactor sulfatorreductor (-■-) Entre los días 250 y 320 de operación. Evolución de la tasa de remoción de sulfato del lecho móvil en proceso de colonización (--▲--).

De acuerdo con esta figura, en este punto de la operación del reactor la eficiencia sulfatorreductora global estaba estancada en una tasa promedio de 0.85 mM de sulfato por hora. Esto iba aunado a que, con el paso del tiempo y tras haber introducido los primeros empaques, la biomasa suspendida había pasado de los 2.3 g SSV/L promedio a tan sólo 0.5 ± 0.02 g/L en un lapso de 120 días (día 150 a 270 de operación). Por lo que después del día 290 de operación se agregó más biomasa para terminar en 2.68 ± 0.16 g SSV/L, lo que incrementó, como se puede ver en la figura, la tasa global de remoción de sulfato a un promedio de 1.8 mM/h. Con el paso de los días se puede ver que el empaque aumentó rápidamente su capacidad sulfatorreductora, llegando a una tasa de 0.75 mM de sulfato por hora. Estos resultados positivos de colonización del empaque establecieron la factibilidad de usar este mismo soporte en el reactor combinado.

Un aspecto notorio a considerar es la disminución significativa de la biomasa suspendida mencionada en el párrafo anterior. Lo que se observó es que, tras la introducción de los empaques, la biomasa perdió sedimentabilidad, lo cual se ha asociado a dos factores: que la constante agitación y el choque continuo con el empaque produjo que las partículas de biomasa no formaran flóculos tan grandes, lo que limitó dicha sedimentabilidad, y el otro factor lo constituye la colonización misma pues parte de la biomasa comienza a asociarse en torno al soporte plástico y va quedando una menor cantidad en suspensión.

Un aspecto más a mencionar sobre la actividad sulfatorreductora de los empaques es que, su capacidad real de sulfatorreducción, en relación con las mediciones realizadas, podría estar subdeterminada. Esto debido al diseño de los ensayos de actividad. Se hizo patente durante dichos ensayos a menor escala que, independientemente de su desempeño final, al inicio de las mediciones, el sistema con los empaques tardaba hasta 5 horas en mostrar un avance lento en la sulfatorreducción. Esto se ha asociado al hecho de que el ensayo de medición de actividad sulfatorreductora consiste en introducir los empaques en un medio mineral sulfatorreductor con sulfato y lactato a pH 7 y 30°C emulando el medio del reactor. Sin embargo, hay un elemento faltante, ya que el sistema no contiene al inicio del ciclo absolutamente nada de sulfuro en estos ensayos, lo cual lleva a la posibilidad de que esté siendo llevado a cabo bajo condiciones redox inapropiadas, o al menos, diferentes a las del reactor de colonización, dada la continua presencia del sulfuro en él. Si bien estos ensayos se consideraron útiles para determinar la actividad real de los empaques, la determinación de la colonización del empaque necesita de una técnica adicional

IV. RESULTADOS

que coadyuve a conocer si efectivamente existe biomasa asociada al empaque, por lo que en la sección posterior, como parte de la determinación de la colonización se utilizó la técnica de Lowry (1951) de determinación de proteína como una medida indirecta de la biomasa en el empaque.

Hacia el final de la operación de este reactor de 2 litros, se separaron sus componentes. La biomasa suspendida fue utilizada para la inoculación del reactor de 5 litros combinado, del cual se hablará en la siguiente sección, y los empaques, 230 fueron retirados para desprenderles la biomasa adherida y almacenarla para estudios de ADN. Los aproximadamente 500 empaques restantes fueron introducidos en un reactor de un litro que se siguió alimentando bajo el mismo esquema. La figura 4.18 muestra el seguimiento por varios días de dicho reactor que operó exclusivamente con el soporte plástico colonizado. Se puede ver que el desempeño de remoción de sulfato y producción de sulfuro fue similar al del reactor del cual provinieron los empaques. Esta fue una prueba más de la capacidad del soporte plástico elegido para conservar un consorcio sulfatorreductor adherido y mantener un reactor en operación bajo un régimen de sulfatorreducción con una eficiencia del 95% en ciclos continuos de 24 horas.

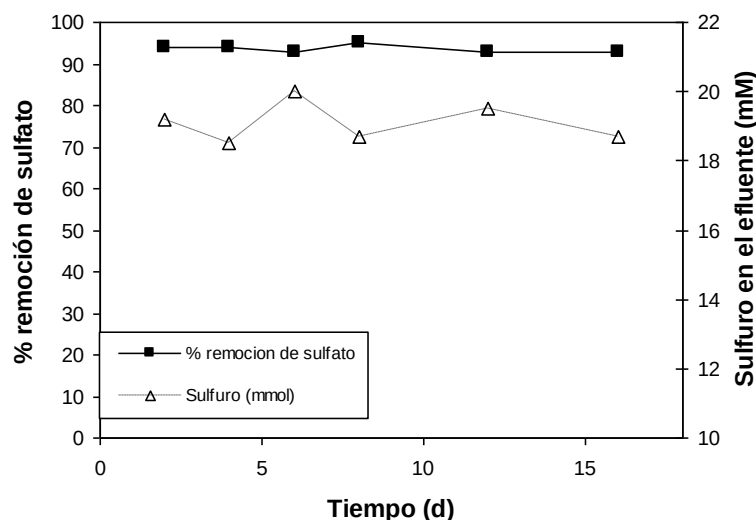


Figura 4.18. % de remoción de sulfato y sulfuro del efluente en ciclos de 24 horas de un reactor de 1 litro operado con 500 empaques colonizados.

Esta sección experimental, permitió aclimatar biomasa para el proceso combinado y establecer la factibilidad del uso del soporte plástico para llevar a cabo un proceso de colonización escalado para dicho reactor con un volumen de trabajo de 5 litros.

4.4 OPERACIÓN DE UN REACTOR ANAEROBIO-AEROBIO Y APLICACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL

De acuerdo con lo visto en la sección anterior de resultados se encontró como factible el utilizar el empaque plástico para fungir como soporte o lecho móvil de una población bacteriana sulfatorreductora, por lo que se implementó un reactor de mayor capacidad para llevar a cabo un proceso combinado sulfatorreductor y sulfuroxidante bajo un régimen discontinuo secuencial. El reactor construido tuvo 5 L de volumen de reacción y sus características generales así como las del empaque plástico son descritos en la sección 3.2.1 del capítulo de materiales y metodología.

Primeramente se comenzó por buscar la estabilización del proceso biológico sulfatorreductor y la colonización del empaque. Posteriormente, tras instalar sensores que permitieran la detección de variables del proceso como potencial redox, pH y oxígeno disuelto, se buscaron las mejores condiciones para la operación combinada de un proceso sulfatorreductor y uno sulfuroxidante en lote, así como la correlación de lo ocurrido en dichos procesos con las variables en línea mencionadas, con la intención de finalmente proponer y aplicar una estrategia de control para llevar el sulfato disuelto en el agua hasta azufre elemental.

4.4.1 Estabilización del proceso biológico sulfatorreductor en el lecho móvil

Se comenzó la operación del reactor con la introducción de la biomasa suspendida proveniente del proceso sulfatorreductor que fue utilizado en la sección anterior para la prueba de colonización de los empaques. Se puede apreciar en la figura 4.17 que, en el ciclo 315, que fue en el cual se sacó la biomasa suspendida del proceso anterior, dicho reactor operaba de manera constante y con una tasa de remoción de sulfato de 1.74 mM h^{-1} . Así pues, por considerarla biomasa sulfatorreductora aclimatada, se tomaron aproximadamente 2 g de la misma así como 10 g de lodo anaerobio granular proveniente de una planta de tratamiento de la industria cervecera, para inocular el nuevo reactor, de tal manera que la cantidad de sólidos suspendidos volátiles al inicio de la operación fue de 0.8 g/L.

Se inició la alimentación con el agua residual sintética compuesta por el medio mineral propio del proceso sulfatorreductor ya mencionado con anterioridad y descrito en la sección 3.2.2 de la metodología, así como con la misma concentración de sulfato utilizada en los experimentos de sulfatorreducción de las secciones anteriores, es decir 2g/L, aproximadamente 20.8 mM de SO_4^{2-} . Como prueba inicial de consumo de sulfato y con la intención de promover el crecimiento de bacterias sulfatorreductoras por encima del de otra clase de bacterias (Celis-García *et al.*, 2007), se suministró ácido láctico como fuente de carbono en una relación de alimentación de 0.66 DQO/sulfato.

Desde el primer ciclo se observó que con la relación de alimentación mencionada, el consumo de sulfato era de aproximadamente el 40%. Esto implicaba que a pesar de la limitación por fuente de carbono, la biomasa (dado que una parte provenía de un proceso aclimatado) era capaz de realizar la sulfatorreducción adecuadamente de acuerdo con la proporción de ácido láctico que se le había suministrado. Esto llevó a que en ciclos sucesivos se elevara la alimentación a la relación DQO/sulfato de 2.4, que es la misma con la que operaron los procesos sulfatorreductores de las secciones de resultados 4.1 y 4.3.

El reactor se sometió a ciclos variables con el fin de obtener la sulfatorreducción total, por lo que en los primeros 4 ciclos fue posible reducir el tiempo de ciclo de 96 a 24 horas y mantenerlo constante. En la figura 4.19A se muestra la evolución de la tasa global de consumo de sulfato en milimoles por hora seguida a lo largo de los primeros 120 días de operación del reactor durante los cuales únicamente se llevó a cabo un proceso sulfatorreductor. En la figura 4.19B se muestra la duración de los ciclos de alimentación conforme transcurrió el tiempo de operación así como los días equivalentes a los ciclos operados. Se observa con ambas figuras que a partir del ciclo 4, la duración de cada ciclo se mantuvo en 24 horas, y que la tasa de remoción de sulfato alcanzó un valor que se mantendría prácticamente constante en el tiempo de operación sucesivo.

Después de realizados 20 ciclos y con el ciclo de sulfatorreducción total en 24 horas, el día 27 de operación, tal como se especifica en la figura 4.19, se agregaron los empaques que se pretendían colonizar para convertirse en el lecho móvil del reactor. Se introdujeron 2500 empaques sin colonizar que ocuparon aproximadamente el 40% del volumen de operación del reactor. La colonización por parte del consorcio bacteriano se siguió mediante la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) con un protocolo modificado (Markwell *et al.*, 1978, Stoscheck, 1990), para medir indirectamente la biomasa a través de la cantidad de proteína presente, tal y

como está descrito en la técnica de cuantificación de proteína en la sección 3.2.3 de la metodología.

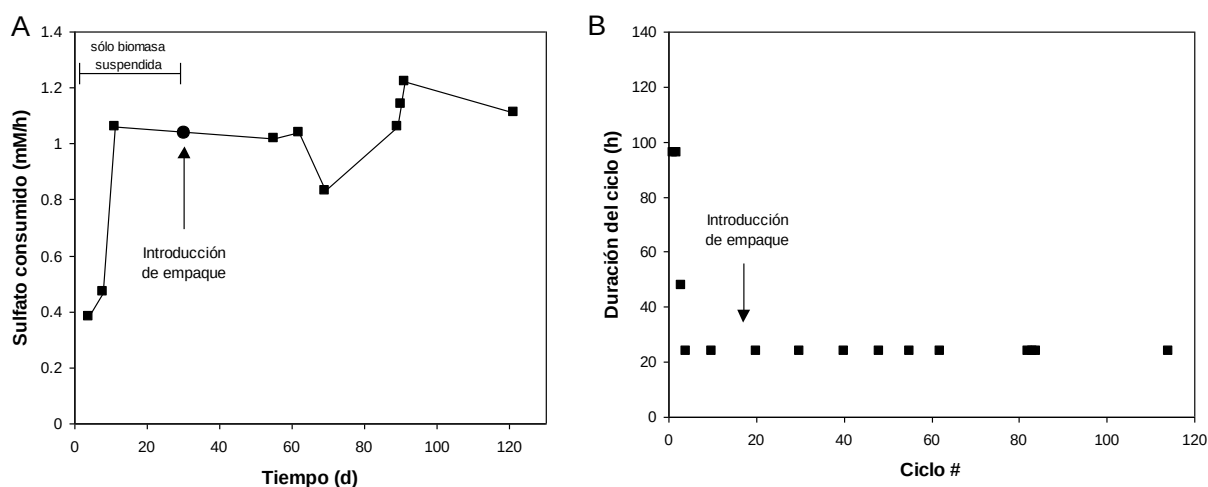


Figura 4.19 A. Evolución de la tasa global de consumo de sulfato para el reactor de 5 litros.
B. Duración de los ciclos de alimentación en función del número de ciclos realizados.
 Al inicio con operación de ciclos variables y posteriormente ciclos fijos de 24 horas.

La figura 4.20 muestra la evolución de la cantidad de proteína presente en los empaques del reactor, así como de la biomasa suspendida a lo largo de toda la operación del reactor que duró aproximadamente 350 días. Los primeros 120 días de la operación, de los que se habló en la figura 4.19 son considerados como la etapa principal de colonización, pues, como se puede apreciar en la figura 4.20A, en esta etapa se obtiene la más alta tasa de consumo de sulfato por unidad de proteína para después caer y presentar valores más estables a lo largo de la operación. Si se observa la figura 4.20C se puede ver cómo se va presentando una cantidad medible de proteína en el empaque desde los primeros ciclos.

En la figura 4.20B se presenta la tasa de consumo neto de sulfato correspondiente a los empaques y, por diferencia con la tasa de consumo global, el consumo neto que se puede atribuir a la biomasa suspendida. Se observa cómo en los primeros 120 días de operación, la sulfatorreducción llevada a cabo en presencia únicamente del soporte plástico se incrementa de cero a un 80% mientras que la cantidad de biomasa suspendida (figura 4.20D) y su participación en el proceso van en declive pues pasa de un valor de 840 mg SSV L⁻¹ a 187 mg/L, lo que implica una reducción del 78% de la biomasa suspendida disponible en el mismo lapso. De acuerdo con resultados obtenidos en la sección 4.3, se ha observado que la inclusión de empaque para colonización produce el efecto de ir disminuyendo gradualmente la biomasa suspendida.

IV. RESULTADOS

Lo anterior puede ocurrir debido en parte a la colonización del mismo empaque, así como a la dispersión, independientemente de la colonización, de la biomasa suspendida en torno a los empaques, lo cual se ha observado que lleva a que parte de ella ya no sedimente bien en el reactor dando como resultado un gradual lavado de la misma. Sin embargo, es de notar que la biomasa remanente a los 120 días conservó un consumo específico similar que el tenía en el día 11 de operación (figura 4.20A), y, conforme avanzaron más los ciclos en el proceso (días 120-350), su consumo específico de sulfato baja lentamente mientras la cantidad neta de sólidos suspendidos volátiles se mantiene baja el resto de la operación.

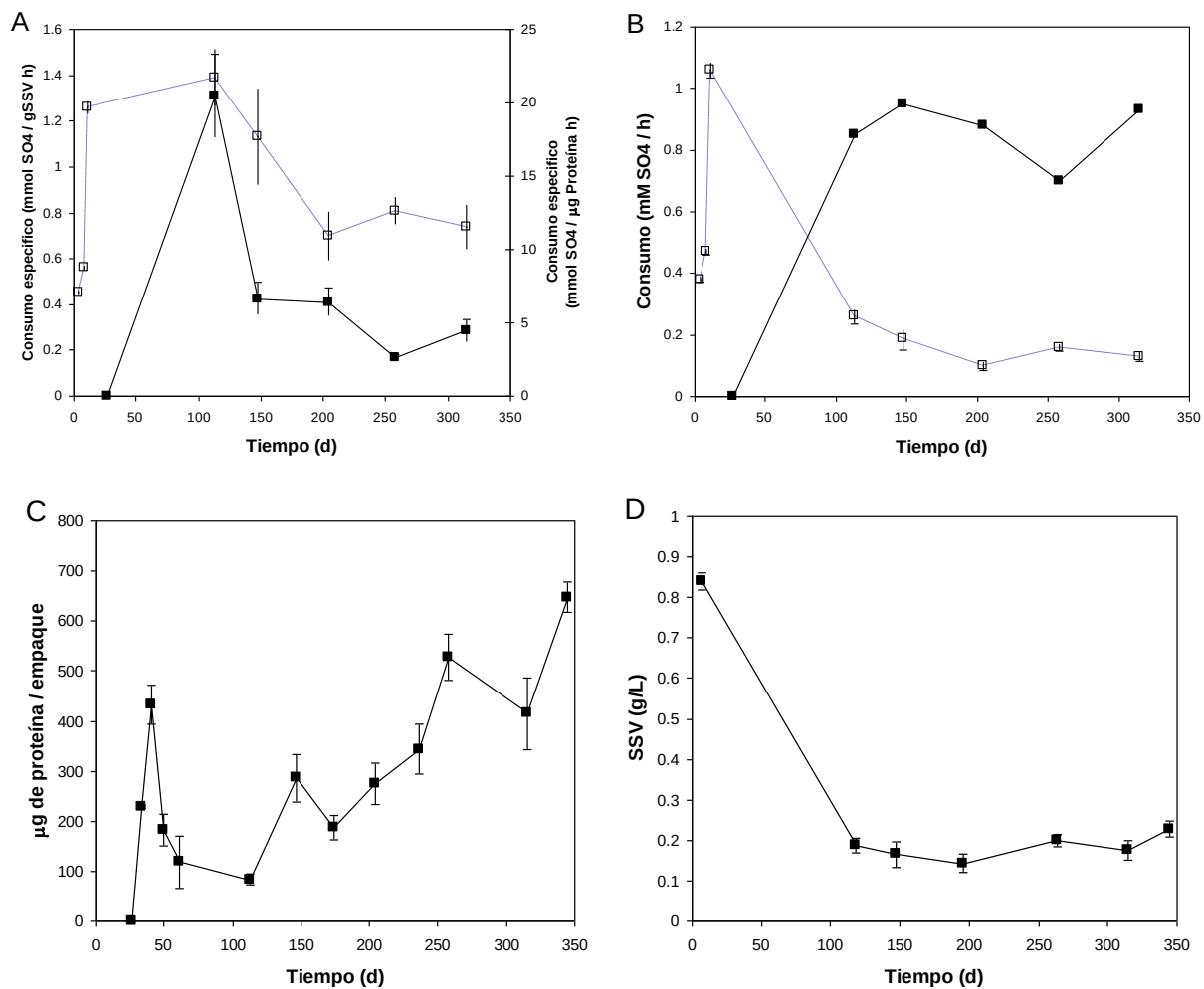


Figura 4.20. A Consumo específico de sulfato por hora por unidad de SSV (□) (eje izquierdo) y por unidad de proteína (■) (eje derecho) a lo largo de toda la operación del reactor combinado B. Consumo neto de sulfato mM/h para la biomasa suspendida (□) y para el empaque (■). C. Evolución de la cantidad de proteína presente por empaque. D. Evolución de la biomasa suspendida presente en el reactor.

El empaque por su parte, en los ciclos 120-350, mantuvo una actividad sulfatorreductora relativamente estable en términos netos (figura 4.20B) y un paulatino aumento de la cantidad de proteína por empaque (figura 4.20C) lo que ha dado como resultado una sulfatorreducción específica por unidad de proteína (figura 4.20A) con una ligera pendiente negativa, dado el incremento de proteína detectada, medición que puede verse influida igualmente por la presencia de exopolímeros propios de la biomasa que ha ido colonizando el empaque.

Tabla 4.5. Comparativo de tasas globales de remoción de sulfato de algunos reactores sulfatorreductores.

Autor	Tipo de reactor	Remoción de sulfato (mmol L⁻¹ h⁻¹)
Celis-García <i>et.al</i> , 2007	Reactor de lecho fluidizado de corriente descendente	2.38
Herrera <i>et al.</i> , 1993a	Reactor en lote (fermentador 1 L)	1.21
Venkata Mohan <i>et al.</i> , 2005	Reactor en lote de biopelícula (sulfatorreductor y metanogénico)	1.33
Jong y Parry, 2006	Reactor de lecho empacado de flujo ascendente	0.04
Khanal y Huang, 2003, 2006	Filtro anaerobio de flujo ascendente, sulfatorreductor y metanogénico	0.85
Kaksonen <i>et al.</i> , 2004	Reactor continuo de lecho fluidizado	1.88
Este trabajo	Reactor discontinuo secuencial de lecho móvil (5L)	1.06 ± 0.11

Se puede decir pues que, tras 120 días de operación y tras 93 días de contacto entre la biomasa aclimatada y el soporte plástico, este último pudo ser colonizado y consolidarse como el principal agente capaz de llevar a cabo el proceso sulfatorreductor en el reactor descrito. Adicionalmente, si se considera la figura 4.19A, se aprecia también que la tasa de sulfatorreducción global en los primeros 120 días de operación se mantuvo constante a partir del día 11 y también tras la introducción de los empaques el día 27, con un valor promedio de remoción de sulfato de $1.06 \pm 0.11 \text{ mM h}^{-1}$ desde el día 11 hasta el día 120, lo que garantizó el consumo de la totalidad del sulfato en el ciclo de 24 horas inclusive a lo largo del proceso de colonización. En la tabla 4.5 se

IV. RESULTADOS

presenta una comparación de las remociones de sulfato de algunos trabajos publicados, donde se puede ver que existe una actividad sulfatorreductora comparable entre la obtenida por este trabajo y por los autores reportados. Aunque en algunos casos publicados, la tasa de consumo de sulfato es cercana al doble de la obtenida en este trabajo, si se considera la tasa de remoción específica, se tiene que en este trabajo se obtuvo una tasa de $2.1 \pm 0.2 \text{ gSO}_4^{2-} \text{ gSSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que en reactores continuos como el de Celis-García *et al.* (2007) se obtiene una tasa de $1.24 \text{ gSO}_4^{2-} \text{ gSSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, lo que implica que el reactor secuencial ha podido generar una biomasa 40% más eficiente en términos de la sulfatorreducción.

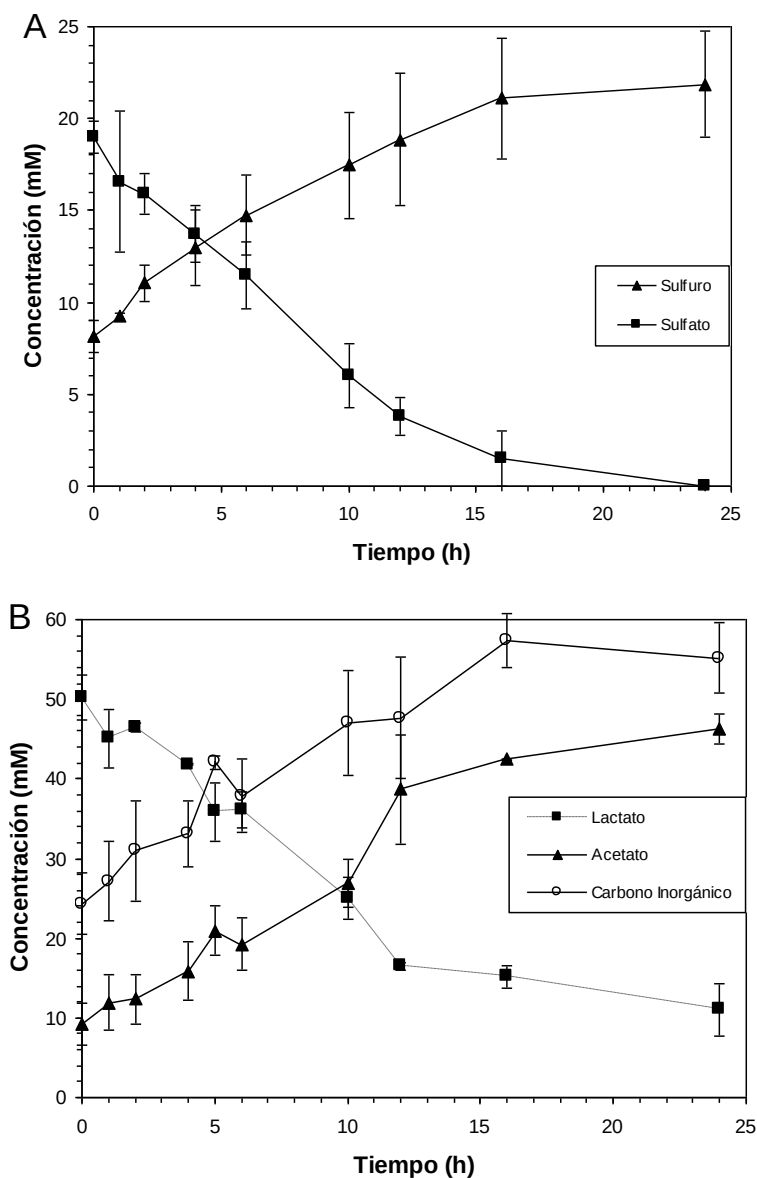


Figura 4.21. Cinética promedio del reactor sulfatorreductor de 5 litros **A.** Concentración de sulfato y sulfuro. **B.** Consumo de ácido láctico y producción de ácido acético y carbono inorgánico.

Adicionalmente, durante los 120 días de colonización del empaque, se llevó a cabo un seguimiento más detallado de las especies químicas más importantes involucradas en el proceso. La figura 4.21A muestra la evolución promedio de las concentraciones de sulfato y sulfuro para 5 ciclos seguidos a detalle en fechas espaciadas entre los días 55 y 120 de operación. Se puede observar que el consumo de sulfato es total y que se llegan a producir hasta 22mM de sulfuro durante cada ciclo. La figura 4.21B muestra a su vez las concentraciones de las especies carbonadas, a saber, el lactato consumido y la producción de acetato y carbono inorgánico ya sea en forma de CO₂ o de carbonatos.

La tabla 4.6 presenta el balance de materia que, tomando en cuenta la cuantificación de las diversas especies reportadas en la figura 4.21, reporta las cifras principales del proceso. El volumen de intercambio del reactor por ciclo fue del 60% del volumen total, por lo que las concentraciones iniciales de las principales especies químicas presentadas son consistentes con dicho régimen de intercambio.

En el caso del sulfato, si bien la alimentación estaba calculada para una concentración inicial de 20mM de sulfato, en la tabla se pueden ver las cifras reales de acuerdo con las mediciones realizadas y la incertidumbre del sistema de alimentación y de medición. Se puede apreciar que el balance de especies carbonadas es bastante bueno con un valor máximo del 11% y en algunos ciclos casos cercanos al 1% teniendo así el promedio del 6.2%.

El promedio de ácido láctico consumido y de ácido acético y carbono inorgánico producidos permiten ver que el comportamiento de estas tres especies corresponde justamente al de la mineralización parcial del ácido láctico que fue planteada en la sección 4.1 de los resultados y que corresponde a la reacción 4.1. Es decir que el proceso sulfatorreductor en este reactor de 5 litros es el mismo que para el reactor de 2 litros utilizado en los experimentos cinéticos iniciales.

En la reacción 4.1 la estequiometría indica que por cada mol de lactato consumida deben producirse un mol de acetato y un mol de carbono inorgánico en forma de ion bicarbonato. Las discrepancias en la cantidad promedio de moles reportadas en la tabla 4.6 se pueden atribuir a la volatilidad de dichas especies. La aseveración de la reacción predominante es válida considerando la relación de consumo lactato/sulfato de 2.24 ± 0.28 , la cual igualmente correspondería más a la estequiometría de la reacción 4.1 y no a la de la reacción de mineralización total (ecuación 4.3) pues por cada 2 moles de lactato consumido se consume una mol de sulfato.

Tabla 4.6 Resumen de resultados del sistema sulfatorreductor en un ciclo.

Condición	Valor
Remoción de sulfato	19.0 ± 0.7 mM
Tiempo de ciclo	24 h
Producción neta de sulfuro	13.3 ± 2.1 mM
Consumo de lactato	39.1 ± 2.7 mM
Producción de acetato	37 ± 2 mM
Producción de carbono inorgánico	33.1 ± 3.1 mM
Relación promedio de consumo lactato/sulfato	2.24 ± 0.28
% error balance de carbono	6.2 ± 5.4 %
% error balance de azufre (pérdidas por volatilización de H ₂ S)	15.2 ± 11.2 %
% de remoción de sulfato	100%
Tasa de consumo de sulfato	1.06 ± 0.11 mmol L ⁻¹ h ⁻¹

En relación con el sulfuro, se observa que no se produce la misma cantidad que el sulfato consumido. Esto debido a la volatilidad del sulfuro a pH 7, de tal forma que el porcentaje de error en el balance de azufre es mayor que en el balance de carbono, siendo del 15% en promedio y llegando hasta un 26%. El proceso sulfatorreductor por sí solo mantiene un pH prácticamente constante y cercano a 7, lo cual mantiene la susceptibilidad del sulfuro a transferirse a la fase gas dado que su primer pKa es de 7.01 por lo que se espera que una cierta parte del sulfuro se transfiera a lo largo del ciclo al espacio de cabeza del reactor de aproximadamente 2 litros.

Es pues que se logró estabilizar un proceso sulfatorreductor eficiente en un reactor discontinuo con biomasa soportada en un lecho móvil y con un mínimo de presencia de biomasa suspendida. Posteriormente, a partir del día 120 de operación, se procedió a buscar acoplar un proceso sulfurooxidante, así como a estudiar el oxígeno disuelto y el potencial redox como posibles variables para controlar el proceso.

4.4.2 Estabilización del proceso combinado y estrategia de control

Se acoplaron al reactor sensores de oxígeno disuelto y potencial redox tal y como se describe en la sección de metodología. Se llevó a cabo el seguimiento en línea de etapas tanto sulfatorreductoras como sulfuroxidantes que permitieron definir una estrategia de operación y control del proceso tal que se llevara la transformación del sulfato y el sulfuro a azufre elemental.

El potencial de óxido-reducción y el proceso sulfatorreductor

Después del día 120 de operación, una vez detectada una colonización positiva, se acopló un sensor de potencial redox y de oxígeno disuelto al reactor. A partir de entonces se obtuvieron datos en línea de ambas variables para la mayor parte de los ciclos. El establecimiento de una variable en línea que sirviera para determinar el término de la etapa sulfatorreductora se consideró de importancia para la estrategia de control de un proceso reductor / oxidativo acoplado.

Por hallazgos de trabajos previos (Janssen *et al.*, 1998, Khanal y Huang, 2003, Krishnakumar *et al.*, 2005, Jong y Parry, 2006) así como lo encontrado en los primeros ensayos de sulfatorreducción de este trabajo (ver figura 4.4B de la sección 4.1), se eligió el potencial redox como una variable factible para el seguimiento del proceso pues el ambiente redox imperante en el sistema ha sido ya relacionado con la formación de unas u otras especies azufradas (González-Sánchez y Revah, 2007) y por haber presentado, de acuerdo con la sección 4.1 de resultados, cierta sensibilidad a los cambios de concentración del sulfuro. Así pues, a lo largo de los ciclos sulfatorreductores posteriores se buscó profundizar en este hallazgo, por lo que se obtuvo el perfil del potencial redox para múltiples ciclos y para varios de los cuales se llevó a cabo también un seguimiento preciso de las especies azufradas presentes.

En la figura 4.22 se muestra un ejemplo del comportamiento obtenido para el potencial redox para un ciclo sulfatorreductor normal así como la evolución de las especies azufradas y carbonadas más importantes (día 195 de operación). Se puede observar que, conforme el ciclo avanza hay un aumento del potencial redox, el cual suele ser variable con cada ciclo, para luego

IV. RESULTADOS

caer conforme la concentración de sulfuro se hace más importante. El aumento en la concentración de sulfuro plantea un incremento en el ambiente reductor del sistema por lo que una disminución en el potencial redox se esperaría.

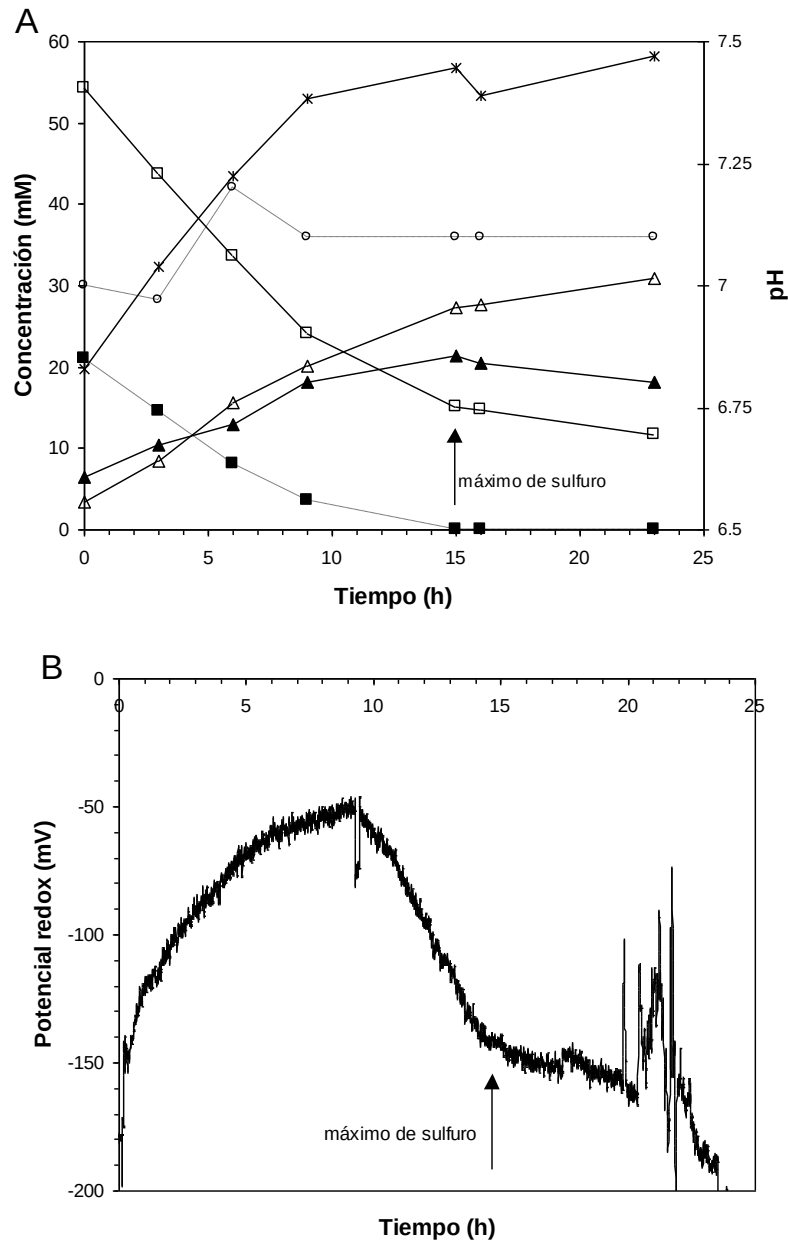


Figura 4.22. A. Cinética del ciclo sulfatorreductor al día 195 de operación. Concentraciones de sulfato (---■---), sulfuro (---▲---), lactato (---□---), acetato (---Δ---), carbono inorgánico total (---*---) y pH (---○---) (eje derecho). B. Perfil de potencial redox en línea para el mismo ciclo.

Se puede observar en la figura 4.22 que la caída del potencial redox se suaviza sensiblemente una vez que se alcanza el máximo de concentración de sulfuro y donde el consumo del escaso sulfato

y lactato remanentes se hace considerablemente lento. Dado que no existe alimentación adicional en las horas posteriores del ciclo, el comportamiento del potencial redox una vez terminada la sulfatorreducción comienza a depender de otros procesos tal que su comportamiento es más errático.

La figura 4.23 muestra el comportamiento del potencial redox para 5 ciclos de sulfatorreducción llevados a cabo consecutivamente a lo largo de los días 189 a 193 de operación. Se puede observar que el perfil del potencial redox es similar para cada ciclo que aquel presentado en la figura 4.22, con un punto mínimo cercano al punto donde el ciclo va terminándose. Una vez que la actividad sulfatorreductora se detiene, el potencial redox tiende a mantenerse en un mínimo por un lapso variable de unas cuantas horas para después comenzar a aumentar de nuevo, muy probablemente por la lenta oxidación que comienza a ocurrir en el reactor en el cual el sulfuro tiende a convertirse en polisulfuros gradualmente.

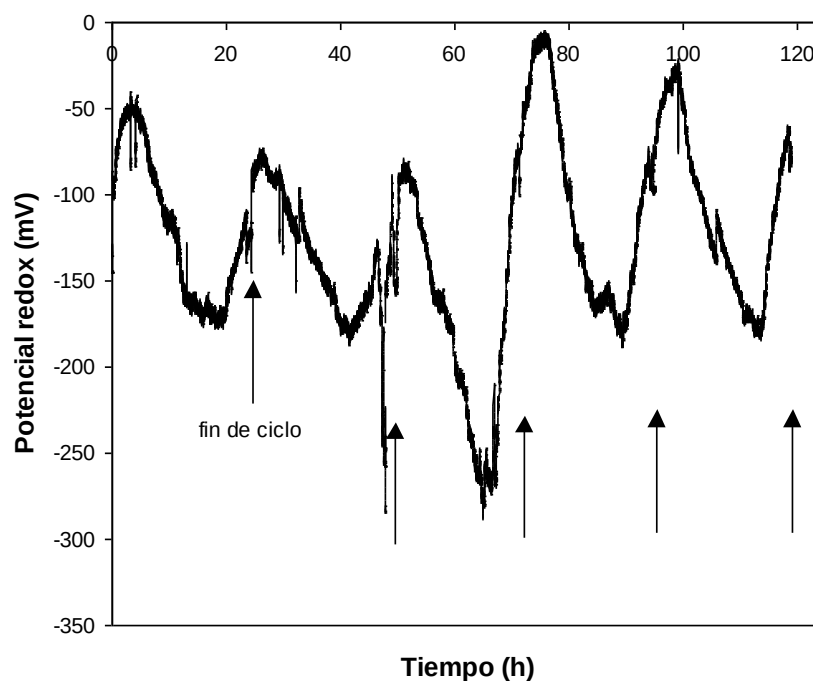


Figura 4.23. Concentración de especies azufradas así como lactato y acetato de un ciclo sulfatorreductor así como su perfil de potencial redox en línea.

Tal como ya se dijo, la caída del potencial redox a lo largo del ciclo anaerobio puede estar en gran medida asociada a la concentración de sulfuro, la cual alcanzaría el punto máximo en el mínimo de potencial redox. Janssen *et al.* (1998) reportaron para un reactor sulfuroxidante de

flujo continuo, variaciones del potencial redox de alrededor de 100 mV cuando la carga continua de sulfuro en el reactor de 10 L es variada de 3 a 8 mM por hora, donde se muestra que conforme la carga de sulfuro disminuye, el potencial redox tiende a ser menos negativo y a mostrar una señal más fluctuante, mientras que conforme aumenta la carga de sulfuro hasta un máximo aproximado de 8 mM el potencial se vuelve más negativo y estable (ver figura 1.6, sección de antecedentes).

Otros trabajos con reactores continuos (Krishnakumar *et al.*, 2005, Jong y Parry, 2006) muestran igualmente significativas variaciones del potencial redox cuando se tienen cambios considerables en la concentración de sulfuro. Las variaciones de sulfuro y los rangos de potencial redox reportados son variados pues el valor del potencial redox no está exclusivamente ligado a la concentración de sulfuro sino al intercambio global de electrones. Khanal y Huang (2006) reportan un cambio significativamente más pequeño del potencial redox con los cambios en la concentración de sulfuro para un filtro anaerobio de flujo ascendente de 4.5 L que lleva a cabo un proceso sulfatorreductor y metanogénico.

En la tabla 4.7 se presenta un resumen comparativo de las variaciones mencionadas y, si bien se observan las diferencias entre cada sistema, se puede establecer una correlación entre las variaciones de concentración de sulfuro y el potencial redox en ciertos casos, tal y como se ha encontrado para la etapa sulfatorreductora del reactor discontinuo, para el cual se presentó una variación promedio de entre -100 y -175 mV del potencial redox, considerando dicho cambio desde que comienza el ciclo hasta que se alcanza el máximo de concentración de sulfuro, esto es de 7 a 23 mM.

Por otro lado, de diferentes ciclos con mediciones en línea se ha determinado que, tomando en cuenta el aumento que el potencial redox presenta al inicio del ciclo y su consecutiva disminución, la caída del potencial redox desde su valor máximo hasta su mínimo en un mismo ciclo ha sido en promedio de 115 ± 10 mV.

Janssen *et al.* (1998), a través de un sensor especial para sulfuro disuelto, determinaron una correlación entre la concentración del mismo y la señal dada por un electrodo de potencial redox para un rango bajo de concentraciones de 0.13 a 0.63 mM de sulfuro, y concluyeron que la razón de cambio de la concentración de sulfuro y con respecto al potencial redox es de aproximadamente $35\text{mV/p[HS}^-]$ entendiéndose que $\text{p[HS}^-] = -\log[\text{HS}^-]$. En el caso del reactor secuencial y de acuerdo con las concentraciones registradas, la correlación encontrada para este

sistema es de 145mV/p[HS⁻]. Es necesario decir que esta correlación no corresponde a mediciones aisladas específicas de sulfuro y potencial redox sino a la variaciones ocurridas en el reactor en el cual ocurren diversos procesos redox simultáneos, sin embargo, para el proceso sulfatorreductor aislado ha resultado significativamente constante de acuerdo con los ciclos en línea registrados.

Tabla 4.7 Comparación de variaciones publicadas de concentración de sulfuro y potencial redox.

Trabajo	Rango de concentraciones de sulfuro	Rango de potencial redox
Janssen <i>et al.</i> , 1998	3 – 8 mM h ⁻¹	-50 – -150mV
Bayoumy <i>et al.</i> , 1999	2.5 – 3.8 mM	< -150 mV
Krishnakumar <i>et al.</i> , 2005	0.23 – 0.78 M d ⁻¹	-200 – -450mV
Jong y Parry, 2006	2 – 25 mM	-120 – -280mV
Khanal y Huang, 2006	3 – 23 mM	-295 – -310mV
Este trabajo. Reactor discontinuo secuencial	7 – 23 mM	-100 – -175mV

La mencionada correlación podría permitir plantear un modelo predictivo de las variaciones del potencial redox y la concentración de sulfuro. Sin embargo, el comportamiento deberá ser consistente también para los ciclos combinados.

El proceso sulfurooxidante y sus variables en línea

Tras el periodo de 120 días de colonización bajo un proceso meramente sulfatorreductor, y el acoplamiento de los sensores en línea, se comenzaron a realizar pruebas de sulfurooxidación tras los ciclos sulfatorreductores. Como se había estudiado con anterioridad, el proceso sulfurooxidante puede ser llevado a cabo mediante un consorcio bacteriano o bien mediante un proceso de mera oxidación química. En este caso se optó por no agregar ningún tipo de biomasa adicional al comenzar a llevar a cabo los ciclos oxidativos por lo que se presume que la oxidación en dichos ciclos debió ser predominantemente química.

Así pues se instaló un controlador de flujo másico y un difusor para el aire y se comenzaron a aplicar ciclos aerobios después del ciclo anaerobio de 24 horas. Se realizó la medición de las especies azufradas involucradas en el proceso sulfuroxidante a lo largo de un ciclo para un flujo constante de 500 mL/min de aire en el controlador de flujo másico, lo que equivaldría a $100 \text{ mL L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de aire.

En un primer ciclo oxidativo se llevó a cabo una prueba de oxidación completa, similar a las pruebas sulfuroxidantes presentadas en la sección 4.2 de los resultados, es decir, aireando el sistema hasta observar la formación de sulfato, aunque tomando mediciones intermedias de azufre también, por lo que el ciclo oxidativo se siguió a lo largo de 30 horas, hasta que se detectó una cantidad significativa de sulfato.

La figura 4.24 muestra los resultados de dicha corrida experimental. La figura A corresponde a las especies azufradas medidas durante el ciclo sulfuroxidante y las figuras B y C presentan el seguimiento del pH y el oxígeno disuelto y del potencial redox respectivamente. Se puede observar que, tal como se había encontrado en los experimentos de sulfuroxidación de la sección 4.2 de resultados, se llega al mismo comportamiento en el cual se puede dividir el proceso en zonas de predominio de especies: la etapa I) donde se presenta un estado de consumo casi total del oxígeno al inicio del ciclo y donde se presenta el consumo prácticamente total del sulfuro y la mayor producción de azufre sin observarse aumento en la concentración de sulfato. Posteriormente la etapa II) donde el consumo de oxígeno parece moderarse permitiendo que la concentración del mismo aumente prácticamente hasta niveles de saturación del medio y donde se sigue detectando azufre elemental y continúa la ausencia de producción de sulfato, para después pasar a la etapa III) donde nuevamente el oxígeno es utilizado para la oxidación final hasta sulfato llevando a así mismo a la desaparición del azufre. Este comportamiento, bajo las condiciones de aereación presentes resulta pues repetible y visible incluso para sistemas diferentes y medidos con distintos sensores.

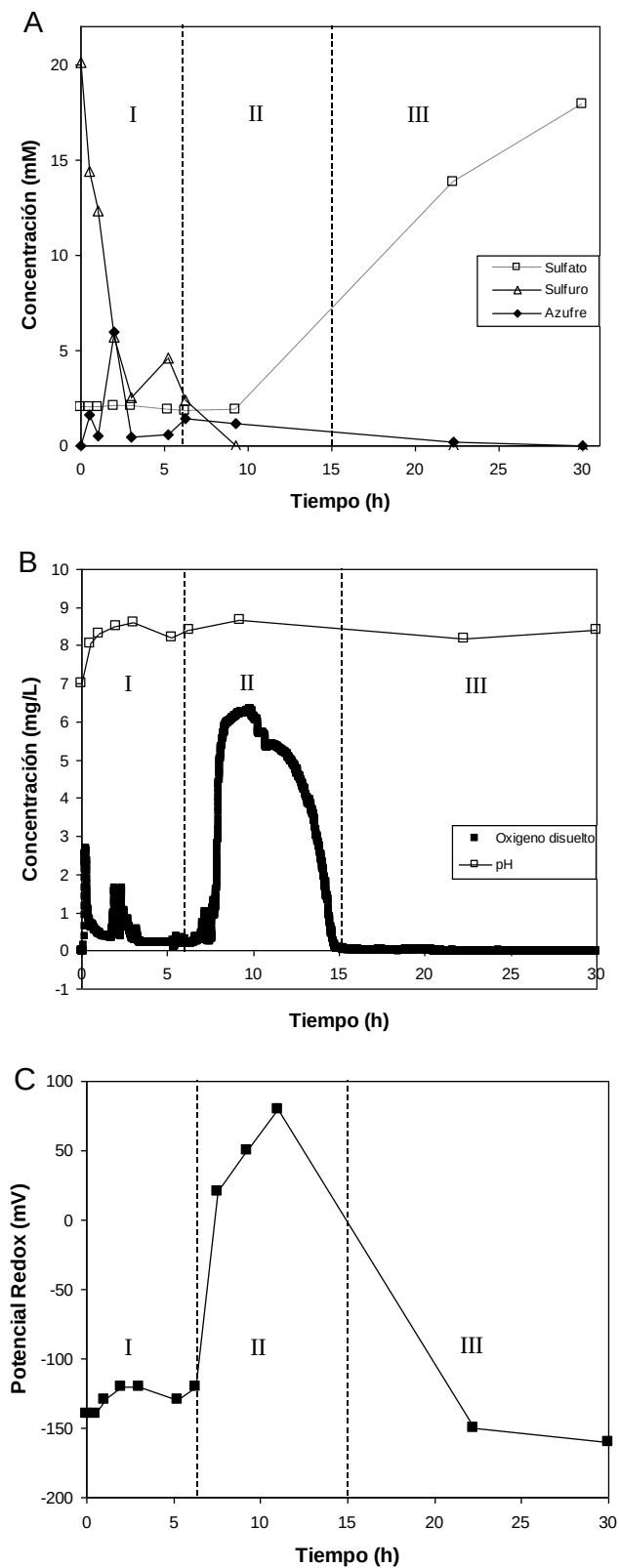


Figura 4.24. A. Predominio de especies azufradas en un ciclo sulfurooxidante de 30 horas para el reactor combinado B. Perfil de oxígeno disuelto y pH, C. Perfil de potencial redox. Se pueden observar 3 etapas (I, II, III).

Es de notar que el pH del sistema tal y como ocurrió en experimentos previos aumentó por encima de 8 llegando hasta valores de 8.5 a lo largo del ciclo oxidativo. Adicionalmente se puede observar que el potencial de óxido reducción presenta un comportamiento similar al perfil de oxígeno disuelto. Las variaciones del potencial redox por oxigenación han sido reportadas con anterioridad (Khanal y Huang 2003, 2006, Janssen *et al.*, 1998) más no en una concordancia tan clara respecto al perfil de oxígeno disuelto. Esto es explicable por el hecho de estar utilizando un reactor discontinuo en el cual las concentraciones no quedan en estado estacionario sino que van cambiando conforme avanza el ciclo.

La coincidencia entre el aumento significativo del potencial redox al momento en que aumenta también significativamente la señal de oxígeno disuelto se debe al predominio del oxígeno como agente redox en el reactor en la etapa II gracias a la eliminación del sulfuro disuelto, el cual permaneció como el principal agente redox del sistema durante la etapa I. Sin embargo se tiene que en la etapa III, a pesar de la ausencia de sulfuro, el potencial redox regresa a valores muy negativos cuando el oxígeno comienza nuevamente a ser consumido de manera importante. Por lo tanto el valor del potencial redox en ausencia del sulfuro se ve fuertemente influido por la presencia del oxígeno disuelto. A pesar del origen multifactorial del POR, sus coincidencias con el perfil de oxígeno disuelto lleva a establecer la posibilidad de controlar el proceso sulfurooxidante a través del potencial redox y no necesariamente a través del oxígeno disuelto.

Al final del ciclo, la producción de sulfato se logra en cantidades que cumplen de manera significativa con el balance de masa considerando la cantidad de sulfuro inicial. Se observa sin embargo que la cantidad máxima de azufre producido es reducida, en gran medida debido a los altos niveles de pH imperantes en el proceso, los cuales favorecen el predominio de los polisulfuros por encima de la formación de azufre elemental. Para aumentar la producción de este último se debería entonces buscar un control de pH en el proceso para mantenerlo en valores iguales o menores de 8 (González-Sánchez y Revah, 2007; Steudel, 2003).

Tras llevar a cabo este largo ciclo oxidativo se observó que el proceso sulfatorreductor posterior no se realizó de manera normal pues, aunque se observó un consumo constante de lactato, la tasa de consumo de sulfato disminuyó radicalmente. Previo a la realización del ciclo aerobio de 30 horas, la etapa anaerobia presentaba una tasa de consumo promedio de $1.01 \pm 0.15 \text{ mM h}^{-1}$. Tras

el ciclo oxidativo dicha tasa disminuyó a 0.23 mM h^{-1} (23% de eficiencia) tardando el consorcio bacteriano 18 días en recuperar nuevamente la tasa normal de sulfatorreducción. Este efecto inhibitor pudo tener varios factores, desde el tiempo excesivo de ayuno, las condiciones oxidativas (30 horas de ciclo sulfuroxidante) y/o los niveles de pH ya que, de acuerdo con la figura 1.1 del capítulo de antecedentes, el pH a niveles de 8.5 o 9 podría llevar a la inhibición de la biomasa.

Este primer experimento marcó la pauta de operación del proceso a seguir para ciclos oxidativos posteriores, ya que dado que la meta era la obtención de azufre elemental, el cambio en la señal de oxígeno disuelto y de potencial redox de la etapa I a la etapa II, representa el punto en el cual se puede dejar de airear el sistema para llevar la oxidación hasta azufre y no hasta sulfato, por lo que el tiempo de ciclo aerobio en las corridas posteriores se redujo. De igual forma se buscaría controlar el pH para mantenerlo en niveles que mejoraran la cantidad de azufre producido.

La figura 4.25 muestra el ciclo completo acoplado llevado a cabo el día 154 de operación. La figura A presenta la concentración de especies azufradas así como la señal en línea del oxígeno disuelto y la figura B presenta el perfil del potencial redox. La flecha en ambas gráficas indica el punto donde comienza la aereación. Se observa que el ciclo completo termina tras detectarse el aumento en la señal de oxígeno disuelto y del potencial redox entre las 3 y 4 horas después de haberse iniciado la aereación. La continuación del ciclo en este punto llevaría a la producción nuevamente de sulfato así como a la disminución nuevamente del potencial redox y del oxígeno disuelto lo cual sería indeseado.

En la primera etapa anaerobia se observa la producción de sulfuro, la remoción de sulfato y una concentración nula de oxígeno disuelto tal como se espera. El potencial redox por su parte presenta un comportamiento similar al ya observado para la etapa anaerobia en las figuras 4.22 y 4.20. Una vez que comienza la aereación se ve un aumento paulatino del potencial redox pero el aumento significativo únicamente lo sufre al momento en que se dispara igualmente la señal de oxígeno disuelto. Durante la etapa oxidativa se aprecia la disminución gradual del sulfuro el cual es totalmente eliminado conforme se produce el azufre elemental, y donde además se observa que no se produce sulfato, todo lo cual ocurre antes del aumento en la concentración de oxígeno disuelto y el potencial redox. Las cantidades de azufre obtenido fueron aún pocas (aproximadamente un 7% de conversión) probablemente por el deficiente control de pH.

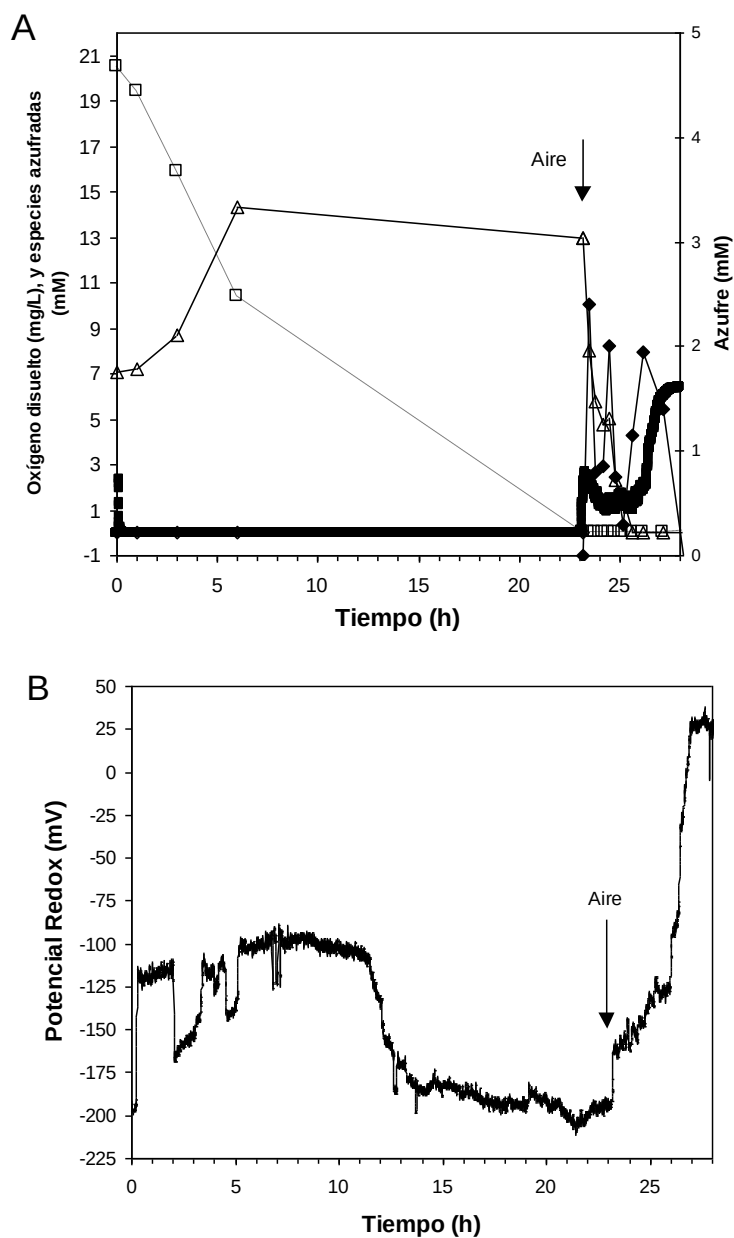


Figura 4.25. A. Concentración de sulfuro mM (Δ), sulfato ($\square$), oxígeno disuelto en mg/L ($\blacksquare$) y azufre ($\blacklozenge$) (eje derecho) para un ciclo completo anaerobio / aerobio (día 154 de operación), el cual se detuvo una vez que aumenta la señal de oxígeno y potencial redox. **B.** Perfil del potencial redox (mV).

Posteriormente, se controló el pH en un valor de 8 o menor, lo que permitió obtener una mejor conversión del sulfuro a azufre elemental en un ciclo posterior (día 168 de operación) como lo muestra la figura 4.26. En la figura A se presentan la cuantificación de especies azufradas y el pH registrado, y en la figura B se presenta el perfil del potencial redox.

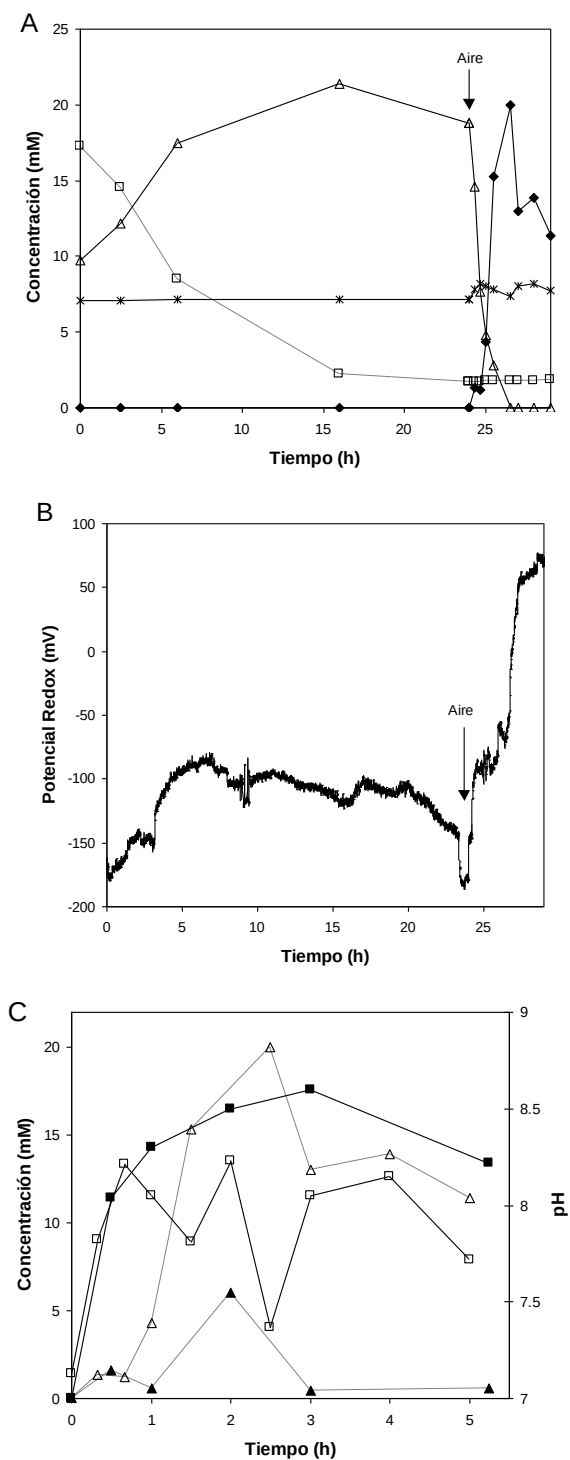


Figura 4.26. A. Concentración mM de sulfuro (-Δ-), sulfato (-□-) y azufre (-◆-) y pH (-*-) para un ciclo completo anaerobio / aerobio el día 168 de operación, el cual se detuvo una vez que aumenta la señal del potencial redox. **B.** Perfil del potencial redox (mV) para el mismo ciclo. **C.** Comparación de obtención de azufre (mM) (-Δ-) en un ciclo con pH controlado (-□-) y el azufre (-▲-) en un ciclo sin control de pH(-■-).

El pH en el ciclo mencionado se mantinene constante en 7 durante la etapa anaerobia, y a partir de que se comienza a airear se mantuvo por debajo de 8 mediante la adición de HCl, lo que favoreció la formación de azufre elemental obteniéndose una conversión máxima del 74% del sulfato y sulfuro iniciales a azufre. Dado el pH menos alcalino al que se operó el proceso oxidativo, la susceptibilidad del sulfuro a ser lavado fuera del reactor aumenta por lo que parte de la pérdida de azufre puede corresponder en gran medida a dicho factor.

Se observa nuevamente que durante la etapa oxidativa prácticamente no existe producción de sulfato en el intervalo en el que se mantuvo la aereación y únicamente se presenta el sulfato remanente de la etapa anaerobia.

El perfil de potencial redox para la etapa anaerobia, si bien se observan algunas diferencias con el ciclo de la figura 4.25, es similar en terminos generales al observado en la figura 4.26. Conforme el ciclo anaerobio termina el potencial va haciendo más negativo por lo que representa una señal para la terminación del proceso anaerobio aunque su disminución parece ser variable y no depender directamente de la concentración de sulfuro pues, en el ciclo de la figura 4.26 se obtienen cantidades mayores de sulfuro que para el de la figura 4.25 y, sin embargo, la disminución del potencial redox ocurre pero es mas lenta en el ciclo con la mayor concentración de sulfuro.

El ciclo combinado corrido bajo un control de pH mejoró la eficiencia del proceso en términos de la conversión de azufre. Esto se observa más claramente en el figura 4.26C, en la cual se presenta el azufre elemental obtenido en un ciclo aerobio con control de pH, y el obtenido en uno sin control de pH, así como los valores de pH registrados a lo largo de un lapso de aereación de aproximadamente 5 horas. La conversión máxima a azufre elemental sin control de pH es del 30% mientras que la conversión con control de pH fue superior al 90%.

Independientemente de la mejora en la conversión de azufre en el ciclo de la figura 4.26, ni la reducción del ciclo oxidativo a 5 horas ni el control del pH del esquema de operación utilizado, llevaron a mejorar sustancialmente la inhibición de la etapa anaerobia inmediata posterior, por lo que el problema de no poder llevar a cabo ciclos anaerobio y aerobio persistió. Después de llevados a cabo estos ciclos con control de pH, la tasa de consumo de sulfato fue de 0.39 mM h^{-1} (39% de eficiencia de la tasa sulfatorreductora habitual ya mencionada de 1.01 mM h^{-1}) y se necesitó de 6 días de ciclos puramente anaerobios para recuperar su eficiencia sulfatorreductora original. La persistencia de la inhibición se atribuyó a tres posibles factores: el

pH, aunque controlado permanecía en la etapa aerobia en niveles cercanos a 8 durante las 4 a 6 horas que duraba la misma, el bajo nivel de sulfuro disuelto tras su eliminación por la etapa aerobia y/o el potencial redox positivo impuesto en el sistema hacia el final de la misma.

Evaluación del pH como factor inhibidor de la sulfatorreducción

Dado que a lo largo de las etapas sulfurooxidantes se mantuvo un pH cercano a 8, es posible que estas condiciones perturbaran el consorcio bacteriano sulfatorreductor. De acuerdo con la tabla 4.2 es posible que un aumento de pH pudiera inhibir el consorcio sulfatorreductor, aunque de acuerdo con publicaciones previas (Lens *et al.*, 1998), el pH no representaría una inhibición para el sistema.

De esta forma se hicieron corridas experimentales para el mismo reactor bajo las mismas condiciones de alimentación excepto que se comenzaron ciclos sulfatorreductores con un pH inicial de 8 por triplicado entre los días 230 y 232 de operación del reactor. La figura 4.27A presenta la comparación de la evolución de las concentraciones de sulfato y sulfuro a lo largo de los ciclos sulfatorreductores a pH inicial 7 y 8. De acuerdo con estos resultados, lejos de inhibirse el proceso sulfatorreductor, se ve ligeramente favorecido puesto que la tasa de sulfatorreducción aumenta de un promedio de $1.01 \pm 0.15 \text{ mM h}^{-1}$ a un promedio de $1.37 \pm 0.3 \text{ mM h}^{-1}$ para los ciclos a pH inicial de 8. En el consumo y producción de las especies carbonadas (figuras 4.27 B y C) se puede ver una ligera diferencia entre ambas condiciones de proceso. Lo anterior resulta suficiente para afirmar que no existe una afectación del pH en valores de 8 en el proceso sulfatorreductor.

Adicionalmente la figura 4.27D presenta el comportamiento del pH conforme avanza el ciclo sulfatorreductor observándose su tendencia a la neutralidad inducida por la producción de ácido sulfhídrico. El proceso sulfatorreductor con pH inicial de 7 mantiene dicho pH prácticamente fijo como se ha visto en resultados previos, y en el caso del pH inicial 8 tiende igualmente al valor de pH 7 sin necesariamente llegar a él. Es pues que la producción del ácido sulfhídrico actúa como el principal agente regulador y amortiguador del sistema evitando que el proceso sulfatorreductor por sí mismo se salga del rango óptimo de pH que mantiene su eficiencia. La evidencia presentada ha llevado entonces a suponer que se trata de los niveles de

IV. RESULTADOS

sulfuro y/o del potencial redox impuesto por el proceso oxidativo el que podría estar inhibiendo al proceso biológico sulfatorreductor.

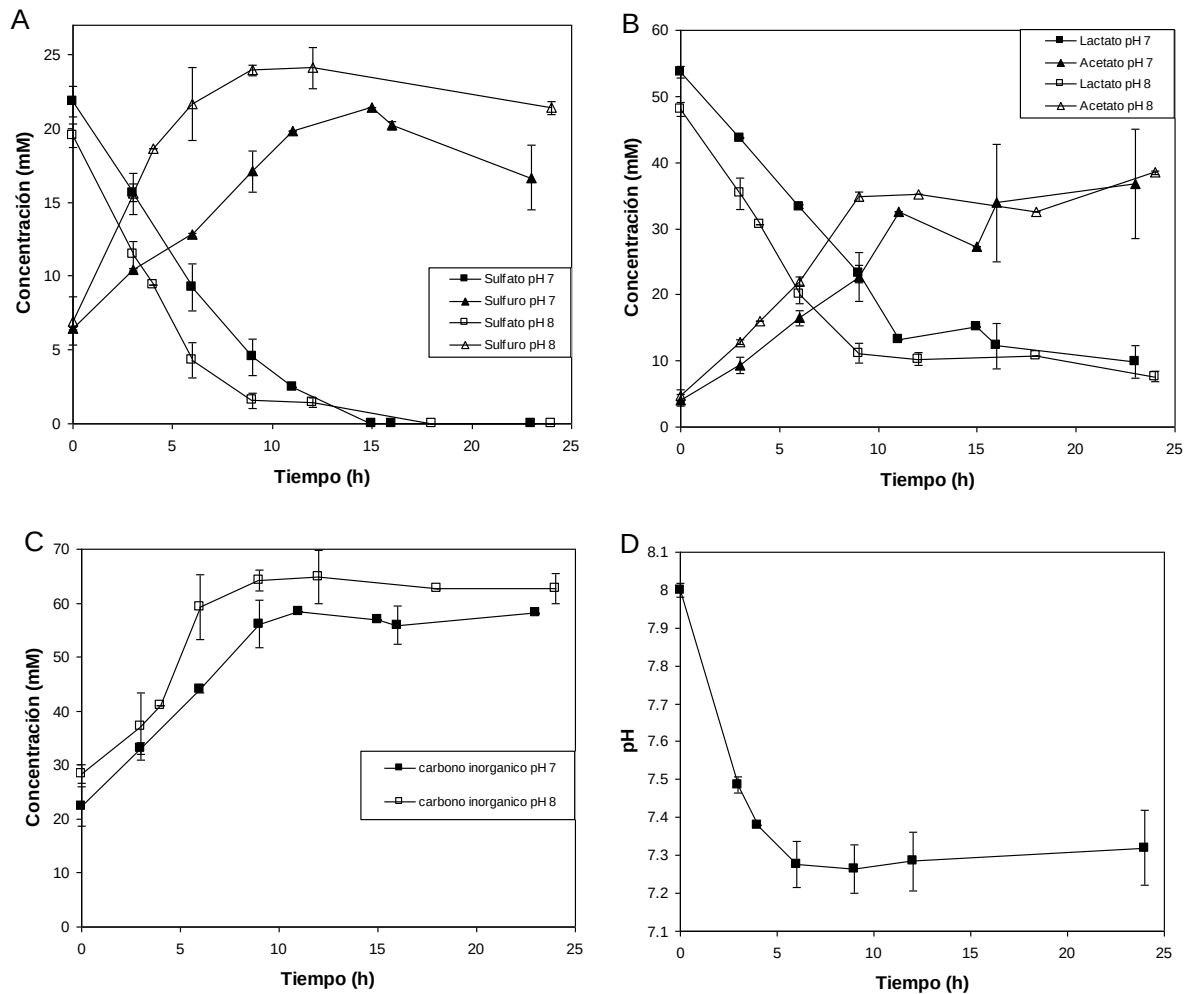


Figura 4.27. A. Comparación de la sulfatorreducción a pH inicial 7 y 8. Concentraciones de sulfuro y sulfato promedio para experimentos por triplicado. B. Concentraciones de lactato y acetato. C. Concentraciones de carbono inorgánico total. D. Evolución del pH cuando el inicial es 8.

Optimización del proceso combinado por medio del potencial redox

Desde que se comenzaron a llevar a cabo ciclos oxidativos tras los ciclos sulfatorreductores, después del día 120 de operación, fue claro que existían factores que obstaculizaban que este proceso combinado de un ciclo tras otro pudiera ser llevado a cabo de manera estable, puesto que tras el ciclo oxidativo, el ciclo sulfatorreductor posterior tenía una eficiencia muy pobre y era

necesario someter al reactor a un proceso de recuperación del proceso biológico antes de volver a tener otro ciclo oxidativo para producir azufre.

Tras haber descartado que los niveles de pH bajo los cuales se opera sean un factor inhibidor del proceso anaerobio, se ha planteado la posibilidad de que sea la ausencia total de sulfuro o el potencial redox los que influyan en la baja eficiencia del proceso sulfatorreductor. Tras cada etapa oxidativa, los niveles de sulfuro caen siempre hasta cero por lo que es posible que el sulfuro, lejos de ser inhibidor como ya se vio en la sección 4.1 de resultados, esté actuando como un favorecedor del proceso sulfatorreductor.

Para probar la hipótesis anterior se realizó el siguiente experimento. Se llevó a cabo el ciclo combinado reductivo y oxidativo bajo las mismas condiciones de los últimos descritos (con control de pH y terminando la aereación después de la subida del potencial redox) pero con una variante: una vez terminado el ciclo, y antes de iniciar el siguiente ciclo reductivo se agregó 1 L de efluente proveniente de la etapa sulfatorreductora, de tal modo que el nuevo ciclo reductivo comenzara con una concentración inicial de sulfuro de 3.4 mM. Este experimento se hizo por duplicado durante los días 238 y 260 de operación. El resultado fue una mejora en la eficiencia del proceso sulfatorreductor respecto a las corridas donde se partía con sulfuro inicial cero, obteniéndose una tasa de remoción de sulfato de $0.6 \pm 0.05 \text{ mM h}^{-1}$ (60% de eficiencia), necesitando únicamente 2 días de ciclos reductivos para la recuperación de la tasa de remoción en el rango promedio.

En la figura 4.28 se presenta el seguimiento en línea del potencial redox para una de estas corridas en la cual se observa el aumento del potencial a valores positivos en la etapa oxidativa y la gradual recuperación del mismo hacia valores negativos conforme avanza el ciclo anaerobio posterior, en el cual paulatinamente se alcanzan los niveles de potencial redox de la etapa anaerobia anterior a la etapa oxidativa.

Lo anterior llevó a plantear una prueba final que consistió en operar de la misma manera el proceso sulfurooxidante (etapa oxidativa) pero deteniendo éste antes de que el potencial redox presente su aumento característico, debido a la disminución de la demanda de oxígeno, pero una vez que se haya consumido todo el sulfuro disuelto. Esta condición experimental arrojó para el ciclo una tasa de remoción de sulfato de $0.78 \pm 0.11 \text{ mM h}^{-1}$ (78% de eficiencia) y cuyo valor, si bien ligeramente más bajo en promedio, se encontró dentro del rango de incertidumbre de la sulfatorreducción operada por sí sola.

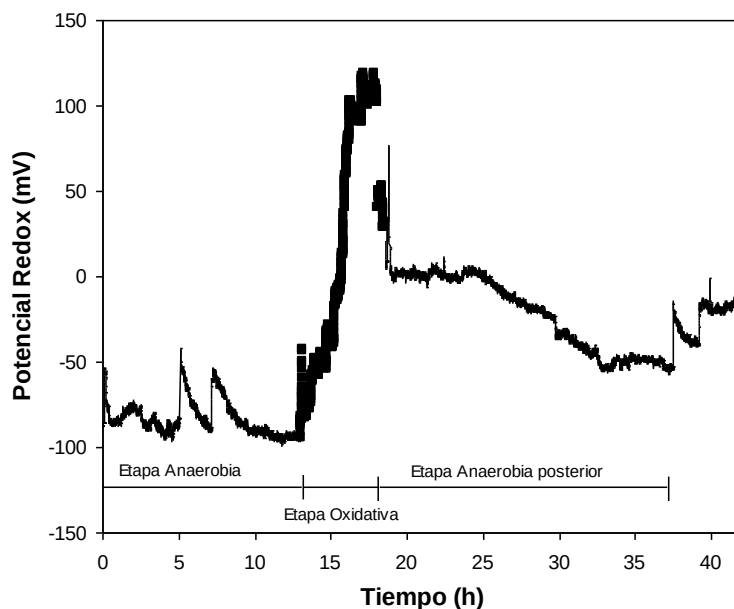


Figura 4.28. Perfil del potencial redox para parte de un ciclo anaerobio previo ($\square$), un ciclo oxidativo ($\blacktriangle$) y otro ciclo anaerobio posterior en el cual se añadió sulfuro inicial en una concentración de 3.4 mM ($\triangle$). Se observa una recuperación lenta del valor original del potencial redox en el ciclo anaerobio previo.

Tabla 4.8. Tasa de remoción de sulfato obtenida para la etapa anaerobia tras las diversas condiciones de operación de un ciclo sulfuroxidante en el mismo reactor discontinuo a $100 \text{ mL L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de aire.

Condición Experimental	Tasa de remoción global de sulfato (mM h^{-1})	Recuperación de la eficiencia anaerobia original	Azufre recuperado en la etapa aerobia
Proceso sulfatorreductor original	1.01 ± 0.15	cero días	0
Tras ciclo oxidativo de 30 horas y sin control de pH	0.23	18 días	6 mM
Tras ciclo oxidativo hasta subida del potencial redox (5h) con control de pH	0.39 ± 0.02	6 días	$8.4 \pm 6.3 \text{ mM}$
Proceso sulfatorreductor a pH inicial de 8	1.37 ± 0.30	cero días	0
Tras ciclo oxidativo hasta subida del potencial redox (5h) con control de pH, y agregando 3.4 mM de sulfuro inicial	0.6 ± 0.05	2 días	$10.7 \pm 2.3 \text{ mM}$
Tras ciclo oxidativo con control de pH y terminado antes de subida del potencial redox (3-4 h) y cuando el sulfuro disuelto ya no se detecta	0.78 ± 0.11	cero días	$13.3 \pm 2.1 \text{ mM}$

En la tabla 4.8 se presenta el comparativo de eficiencias de las diversas condiciones experimentales que fueron probadas para buscar la estabilidad del proceso sulfatorreductor / sulfuroxidante y las tasas de remoción de sulfato obtenidas tras cada condición de operación en el ciclo oxidativo, las cuales se llevaron a cabo por duplicado. En todos los casos el flujo de aire a través del controlador de flujo másico fue de 500 mL/min y, tomando en cuenta los 5 L de operación, esto implica que son 100 mL L⁻¹ min⁻¹. Se observa adicionalmente que con un control de pH es posible aumentar significativamente la cantidad de azufre elemental recuperado.

Por su parte la figura 4.29 presenta el perfil redox de un ciclo oxidativo con su ciclo anaerobio anterior y posterior bajo la estrategia mencionada de terminar la aereación antes de que el potencial redox aumente y al momento en que ya no se detecta sulfuro en el sistema. Se puede observar que el perfil de la etapa aerobia corresponde a una ligera pendiente conforme comienza la oxigenación, la cual está presente en perfiles oxidativos discutidos previamente, sin embargo, no se permite que el potencial redox llegue a niveles positivos. La ligera pendiente del potencial redox en la etapa oxidativa se debe a un doble efecto: la paulatina eliminación del sulfuro disuelto y el control del pH al adicionar ácido clorhídrico. Se ha reportado que el potencial redox aumenta ligeramente conforme el sistema se acidifica (Janssen *et al.*, 1998), llevando a la pendiente que se presenta en la figura y la cual se reproduce en todos los ciclos registrados.

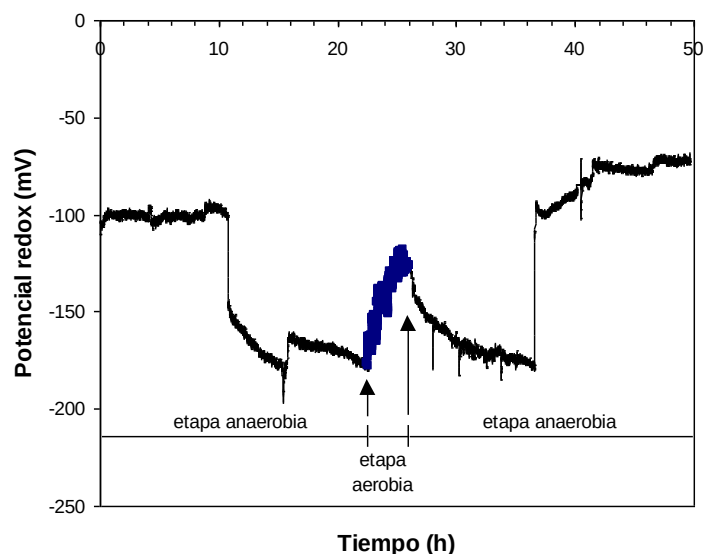


Figura 4.29. Perfil del potencial redox para un ciclo aerobio (—) y sus ciclos anaerobios previo y posterior (□). El ciclo aerobio es terminado en cuanto el sulfuro deja de detectarse y antes de que el potencial redox suba.

En cuanto a las etapas anaerobias, en la figura se puede ver que se tienen comportamientos no iguales pero similares a los que se logran para los ciclos anaerobios continuos (ver figura 4.23). El ciclo anaerobio anterior termina en un punto de mínimo potencial redox en el momento en que la producción de sulfuro ha cesado. Por su parte el ciclo anaerobio posterior comienza en un punto donde el potencial redox aumentó gracias al ciclo oxidativo, pero dado que el proceso anaerobio se ve poco inhibido y que el ciclo aerobio termina en niveles bajos del potencial, durante el ciclo anaerobio posterior, los niveles redox se recuperan más rápidamente, lo que lleva a una paulatina disminución del potencial redox conforme se produce el sulfuro del ciclo anaerobio llegando a un punto mínimo nuevamente.

Todo lo anterior ha llevado a concluir que el factor que afecta al proceso sulfatorreductor para continuar su eficiencia tras un ciclo sulfurooxidante es el ambiente redox predominante una vez que termina dicha etapa. Si el sistema no presenta ciertos valores de potencial redox, el proceso pierde eficiencia y tarda en recuperarse. La sensibilidad del proceso a los niveles redox ha sido observada en otras ocasiones (Bayoumy *et al.*, 1999, Jones y Ingle, 2005). Así pues, la presencia de sulfuro no es necesaria para que el proceso continúe y se puede deducir que el efecto positivo que se presentó en las corridas donde se añadió sulfuro, está relacionado con que es un agente coadyuvante a la recuperación de los niveles del potencial reductor en el proceso.

En la figura 4.30 se presenta el historial de la tasa de consumo global de sulfato a lo largo de toda la operación del reactor y en la cual se pueden apreciar en primer lugar la etapa de colonización que se graficó así mismo en la figura 4.19A y en la cual se logra una tasa de consumo de sulfato constante. Posteriormente la etapa de las pruebas sulfurooxidantes que ya se han descrito y cuyos resultados fueron resumidos en la tabla 4.8 y donde se puede ver las caídas en la tasa global de sulfatorreducción sufridas por el proceso biológico debido a los ciclos aerobios realizados en las diferentes condiciones descritas. Y por último la tercera etapa en la cual se realizaron las pruebas de estabilidad del proceso mediante la propuesta de detener la aereación antes de que el potencial redox subiera a valores positivos, condición experimental que arrojó los mejores resultados.

A continuación en esta última etapa de la operación del reactor, se procedió a aplicar dicha estrategia para controlar la inhibición del proceso sulfatorreductor y se corrieron una serie de ciclos continuos anaerobio/aerobio entre los días 337 y 349 de operación, en los cuales se

logró obtener tasas de remoción de sulfato cercanas a los valores originales del proceso anaerobio tal como se aprecia en los últimos ciclos de la figura 4.30.

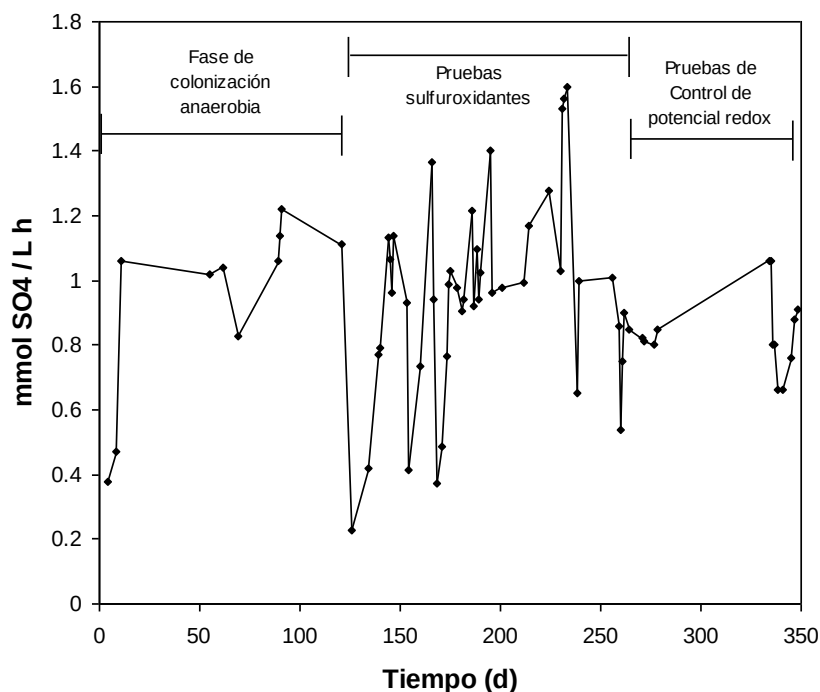


Figura 4.30. Evolución de la tasa global de consumo de sulfato del reactor a lo largo de toda su operación.

De acuerdo con la figura mencionada la eficiencia anaerobia fue mejorando paulatinamente, por lo que se puede decir que el proceso no sólo pudo operar establemente un ciclo tras otro, sino que además se esperaba, con más tiempo de operación, un aumento en el desempeño del proceso biológico por un fenómeno de aclimatación al modo de operación del reactor, pues la tasa de remoción de sulfato pasó de 0.66 mM h^{-1} a 0.91 mM h^{-1} en sólo 4 ciclos combinados.

La figura 4.31 muestra resultados de los ciclos continuos realizados y se puede observar cómo se logra mantener el consumo de sulfato y la producción de sulfuro en niveles estables en los ciclos anaerobios mientras se produce azufre elemental en los ciclos oxidativos.

En la figura 4.32 se presenta de manera más detallada el desempeño promedio de los ciclos oxidativos bajo la estrategia de control, con la cual, la duración de dicha etapa fue de un máximo de 4 horas. Se observa en la figura 4.32A que se lleva a cabo una eliminación total del sulfuro disuelto en el corto lapso de 3 horas y una producción de azufre correspondiente al 74% del sulfuro inicial hacia el final de la etapa oxidativa.

IV. RESULTADOS

Así mismo el sulfato remanente de la etapa anaerobia permanece constante tal y como se espera de acuerdo con los hallazgos en ciclos oxidativos previos.

En cuanto a los compuestos carbonados medidos, se obtiene el comportamiento esperado, es decir, tanto el acetato como el lactato resultantes de la etapa anaerobia permanecen en valores prácticamente constantes a lo largo de la etapa oxidativa (figura 4.32B), lo que descarta la posibilidad de que durante esta etapa se diera el consumo de dichas especies por algún consorcio bacteriano alterno.

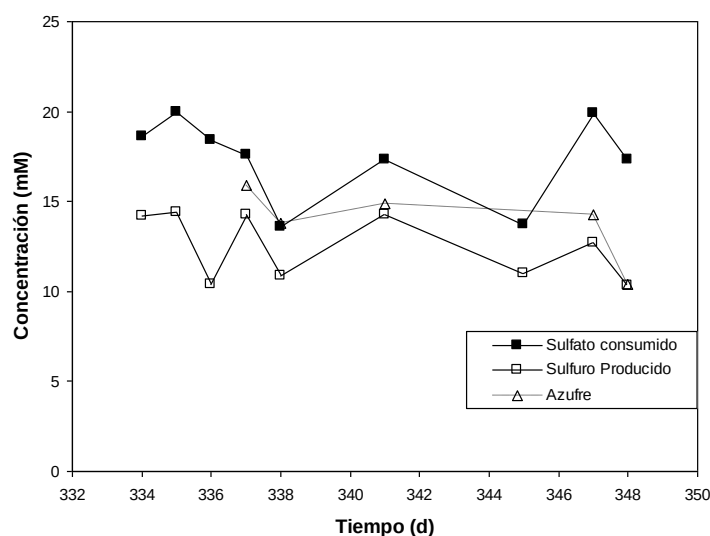


Figura 4.31. Especies azufradas a lo largo de los ciclos continuos llevados a cabo entre los días 334 y 348 de operacion.

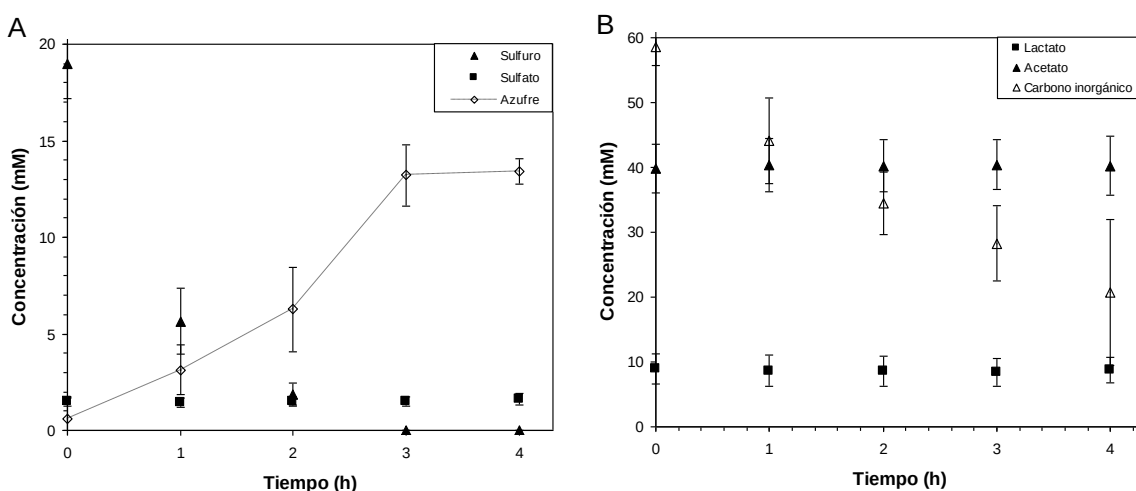


Figura 4.32. A. Especies azufradas durante una etapa sulfurooxidante acoplada en el proceso combinado operado bajo el control de pH y el seguimiento del potencial redox.
B. Evolución de las especies carbonadas en los mismos ciclos.

Adicionalmente, en la tabla 4.9 se resumen las cifras de ambas etapas para los ciclos combinados bajo un esquema de operación de 20 horas de etapa anaerobia y 4 horas de etapa aerobia. Se puede observar que, el consumo de sulfato no es total aunque alcanza un nivel significativo con 76% del sulfato alimentado consumido. La producción neta de sulfuro producido en la sulfatorreducción es similar al consumido en la etapa sulfuroxidante, y el azufre es producido en dicha etapa a partir del sulfuro con un error de balance del 5%. La conversión neta de sulfato a azufre elemental fue del $66 \pm 10 \%$, la cual es una cantidad significativa.

Tabla 4.9. Resumen de cifras de consumo y producción para las etapas anaerobia y aerobia combinadas en el reactor sulfatorreductor / sulfuroxidante discontinuo secuencial bajo la estrategia de control de pH y POR con una duración de la etapa anaerobia de 20 horas y de 4 horas aproximadas de la etapa aerobia.

Variable	Etapla sulfatorreductora	Etapla sulfuroxidante
Consumo de sulfato (mM)	15.4 ± 2.0	0.4 ± 0.5
Producción de sulfuro (mM)	11.6 ± 1.8	-12.6 ± 3.2
Producción de azufre (mM)	0	13.3 ± 2.1
Consumo de lactato (mM)	28.1 ± 2.5	0.2 ± 2.2
Producción de acetato (mM)	16.5 ± 2.6	0.5 ± 4.0
% de sulfato consumido	$76 \pm 10 \%$	$2 \pm 2.5 \%$
% de sulfuro consumido	0	100%
% de conversión sulfato / azufre	0	$66 \pm 10 \%$
% error balance de azufre	19 %	5 %

Los resultados presentados indican que la estrategia de control seguida ha logrado llevar a cabo ciclos combinados continuos de forma estable, mas la eficiencia del proceso sulfatorreductor no llegó del todo a los niveles de operación de los ciclos meramente anaerobios, lográndose una sulfatorreducción del 76% bajo una operación de ciclo completo de 24 horas. Sin embargo, es posible obtener un mayor consumo de sulfato si se deja correr el ciclo anaerobio más de 24 horas hasta el punto de máxima producción de sulfuro. Ha sido bajo la posibilidad de usar el potencial redox para controlar el proceso, que se siguió dicha variable igualmente para los ciclos continuos realizados. La figura 4.33 muestra dos ciclos anaerobios con dos ciclos aerobios. El primer ciclo anaerobio presenta un perfil redox irregular así como un consumo de sulfato normal como se puede ver en la gráfica derecha con un máximo de sulfuro de alrededor de 22 mM.

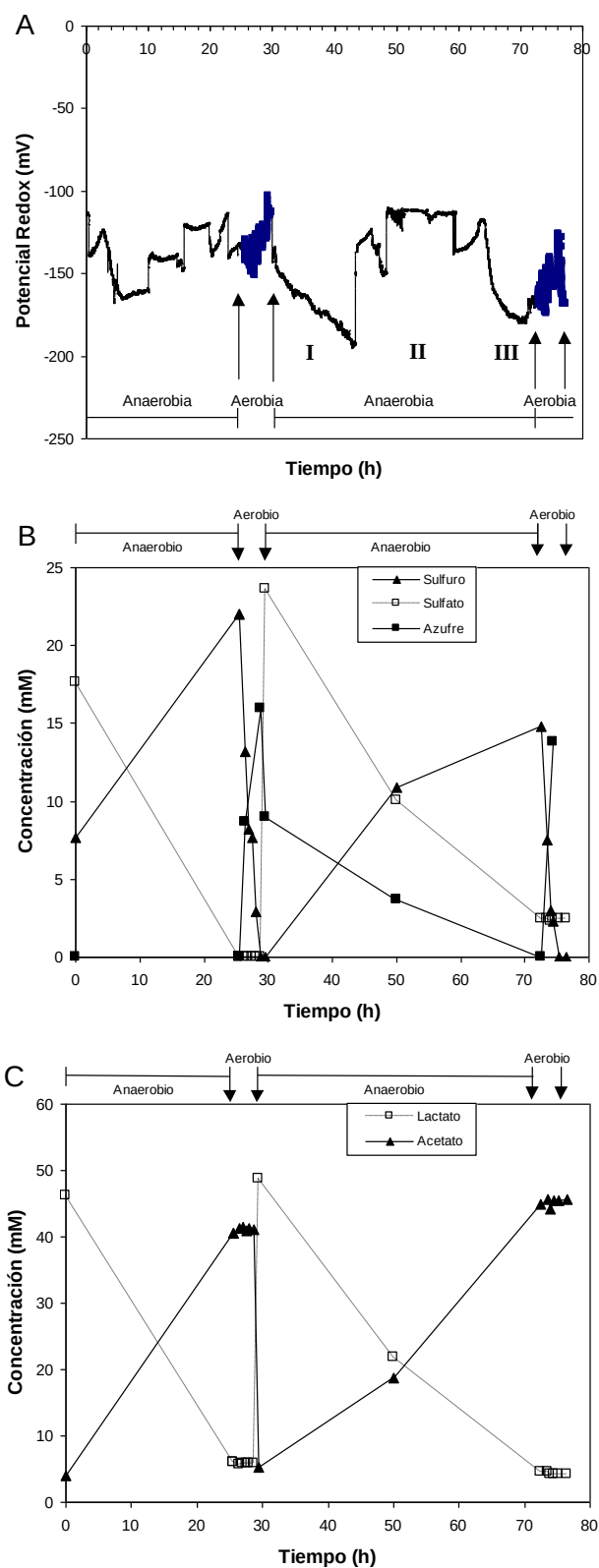


Figura 4.33. A. Perfil redox de dos ciclos continuos aerobios (—) y anaerobios (□).

B. Evolución de la concentración de las especies azufradas para dichos ciclos.

C. Evolución de la concentración del lactato y acetato.

Posteriormente ocurre la etapa aerobia con el consecuente consumo de sulfuro y producción de azufre elemental presentándose un comportamiento similar al de la figura 4.29 en el perfil redox. La siguiente es una etapa anaerobia que inicia con la concentración nula de sulfuro y una alta concentración de sulfato, la cual se lleva a cabo a una tasa menor a la del promedio sulfatorreductor pero logrando una sulfatorreducción completa al término de 40 horas.

En la figura 4.33A, al ciclo anaerobio intermedio se le ha dividido en tres zonas: la zona “I” es una clara disminución del potencial redox al momento en que la etapa comienza, es decir, cuando el sulfato es alimentado y el sulfuro comienza a producirse. Posteriormente la zona “II”, donde aumenta el potencial redox durante un lapso considerable en el que parece estabilizarse en valores menos negativos y finalmente la zona “III” donde la sulfatorreducción reduce su actividad y el potencial regresa a valores más negativos nuevamente.

En la sección donde se reportó el seguimiento redox únicamente de los ciclos anaerobios (figuras 4.22 y 4.23) se observó que el comportamiento usual correspondía a zonas similares, sin embargo, el potencial aumentaba rápidamente al iniciar el ciclo, de tal modo que se presentaban de forma predominante las zonas “II” y “III” de la figura 4.33, es decir, el potencial redox al inicio de un ciclo sulfatorreductor estable debería presentar un aumento inicial y valores menos negativos al inicio, con un punto de estabilización, para finalmente terminar con los valores más negativos hacia el fin del ciclo, hecho que se pensó podría ser correlacionable a la concentración de sulfuro producido.

Aparentemente en el caso de los ciclos combinados, la zona de aumento del potencial (zona “II”) presentaría un retraso, por lo que al inicio del ciclo (zona “I”), el potencial redox que se obtiene corresponde a un valor similar al que tendría al final del ciclo, es decir, en el momento en que la sulfatorreducción está terminando.

De acuerdo con estas observaciones se puede establecer que la zona “II” donde el potencial se hace menos negativo debe de estar gobernada por diversos procesos del sistema biológico que no pueden ser establecidos con claridad, ya que cuando se trata de un sistema meramente anaerobio y estable, es un comportamiento del potencial que inicia casi de inmediato al empezar el ciclo, en cambio en el caso de los ciclos combinados, el ciclo oxidativo produce, en el posterior ciclo anaerobio, que dichos procesos se retrasen.

Si bien esto último sería correlacionable a su vez con la disminución de la tasa global de sulfatorreducción, se puede apreciar en la figura 4.33B que el consumo de sulfato y la producción

de sulfuro se dan independientemente de la zona “I” o de la zona “II” del potencial, por lo que el retraso de la zona “II” no necesariamente implica retraso de la sulfatorreducción. Esta situación se observa también en la figura 4.34 en la cual se presentan otros dos ciclos combinados consecutivos y donde, tras la etapa oxidativa únicamente se presentan las etapas “I” y “II” llevándose a cabo la sulfatorreducción en 24 horas.

Otra evidencia de que el retraso de la zona “II” no implica el retraso en la sulfatorreducción es que el consumo del sustrato orgánico continúa de manera paralela al consumo de sulfato, lo cual descarta que la zona “II” esté ligada de manera directa con la transformación del lactato a carbonatos y acetato en el ámbito de la sulfatorreducción. Esto se puede observar en las figuras 4.33C y 4.34C. En dichas figuras también se puede apreciar que durante el ciclo oxidativo las concentraciones de acetato y lactato prácticamente son constantes por lo que, como ya se había mencionado, se descarta su consumo por cualquier otro grupo bacteriano.

La existencia únicamente de zonas “I” y “II” se ha dado en aquellos ciclos de 24 horas. Es por esto que en la figura 4.29 se presenta también dicho comportamiento tras la etapa sulfurooxidante.

Todo esto lleva a concluir que no se puede establecer una correlación confiable para este sistema combinado entre los cambios en el potencial redox y los cambios de concentración del sulfuro producido a lo largo de esta etapa. Adicionalmente, se puede decir que el valor del potencial redox en el proceso anaerobio presenta dos rangos de valores: valores menos negativos que son impuestos por procesos biológicos redox susceptibles al contacto con el oxígeno y un rango de valores más negativo impuesto por las especies azufradas cuando los primeros procesos dejan de predominar y cuyo término se relaciona directamente con el consumo total del sulfato y del sustrato orgánico.

Desde el punto de vista de control, el uso únicamente del potencial redox tiene ciertas limitaciones para la etapa anaerobia del proceso combinado, pues es posible que la máxima cantidad de sulfuro producido caiga en la zona “II” durante la cual no es posible detectar un cambio que se correlacione con dicho punto. Sin embargo, se puede establecer la zona “I” como valor de referencia en cada ciclo y usar dicho valor para definir el punto de término de la etapa anaerobia una vez que el ciclo alcanza la zona “III”, es decir, cuando el proceso alcanza de nuevo el nivel basal redox de las especies azufradas.

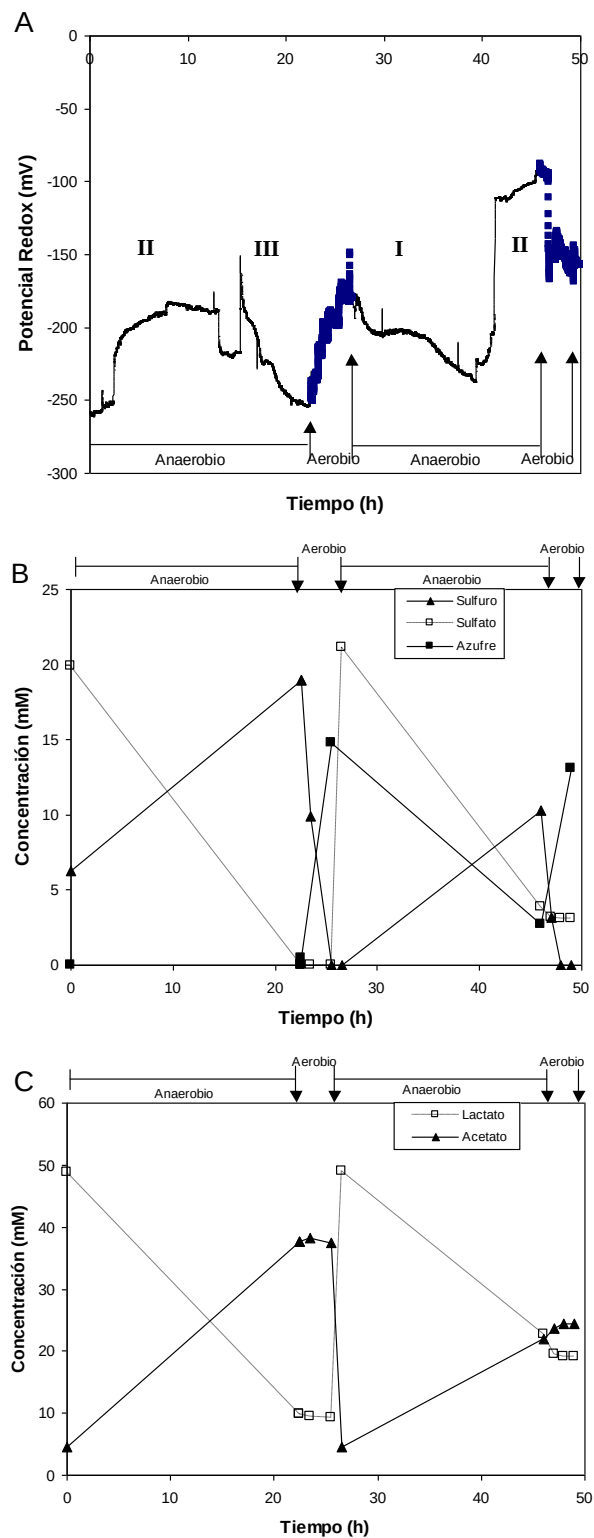


Figura 4.34. A. Perfil redox de dos ciclos continuos aerobios (—) y anaerobios (□).
B. Evolución de la concentración de sulfato y sulfuro para dichos ciclos.
C. Evolución de la concentración del lactato y acetato.

Este esquema de control puede garantizar una sulfatorreducción completa, más no puede informar sobre el punto máximo de producción de sulfuro y podría llevar a un alargamiento innecesario de la etapa anaerobia.

Por otra parte, en el ciclo oxidativo el potencial redox se ha visto como una variable necesaria en su seguimiento ya que el proceso combinado pudo operarse con una eficiencia aceptable, gracias a que se evita que el potencial redox cambie a valores positivos, adaptándose el sistema biológico sulfatorreductor a ciclos continuos intercalando un proceso sulfuroxidante entre cada etapa anaerobia. Sin embargo, dado que el cambio radical que se espera por la oxidación es evitado, los cambios observados en el potencial redox a lo largo de dicha etapa (ver zonas aerobias de figuras 4.33A y 4.34A) si bien son perceptibles, no son directamente correlacionables con lo ocurrido a las especies azufradas en el ciclo oxidativo, aunque es posible que exista un comportamiento consistente entre la pendiente positiva, la eliminación del sulfuro y el valor del pH, pero no se cuenta con evidencia experimental para proponer un modelo que establezca firmemente dicha correlación.

Como conclusión a todo esto, el control de un proceso sulfatorreductor / sulfuroxidante debe considerar el potencial redox como una variable necesaria para mantener la eficiencia del proceso, sin embargo, para poder ser utilizado como la variable de control de ambas etapas, se debe basar en el establecimiento de un valor basal redox para cada ciclo anaerobio y en la correlación a través de un modelo entre el potencial redox y el consumo de sulfuro disuelto a lo largo del proceso oxidativo.

De acuerdo con la experiencia adquirida en el control de este proceso, se hace evidente que la manera más adecuada para detectar el término de cada una de las etapas es conocer la concentración en línea de sulfuro disuelto, pues en el caso de la etapa anaerobia, el máximo de concentración de sulfuro indicaría el punto en el cual ya el proceso sulfatorreductor está deteniéndose, y en el caso de la etapa aerobia, el punto de eliminación completa de sulfuro indica el punto en el que todo el sulfuro disponible ya está siendo oxidado sin haber aún subido el potencial redox, por lo que en todo caso, el control ideal para el proceso sería a través de un sensor en línea de sulfuro pero con un sensor de potencial redox como variable de observación.

La obtención de azufre elemental fue significativa y depende como ya se dijo del pH por lo que un control del mismo es necesario. La eficiencia en su obtención se puede mejorar reduciendo la cantidad de sulfuro perdido por transferencia, por lo cual una recirculación del aire

del espacio de cabeza al reactor podría reducir la cantidad de sulfuro perdido que en los ciclos continuos sumó cerca del 20%. Adicionalmente, la separación del azufre obtenido requiere de un proceso de sedimentación más agresivo que el de sedimentación por no agitación que se aplicó en el proceso. En un proceso implementado a nivel industrial, el azufre es sometido a un tanque centrífugo para ser separado del efluente (Janssen *et al.*, 2009). La figura 4.35 muestra una secuencia de la apariencia del reactor a lo largo del ciclo oxidativo, se puede ver como pasa de su apariencia oscura catacterística del proceso sulfatorreductor, a un licor verdoso asociado a la producción de polisulfuros, para después pasar a la formación de azufre elemental, que si bien debe haberse formado predominantemente como azufre inorgánico, no se percibió una sedimentación suficientemente rápida, sino que quedaba en suspensión en el efluente.

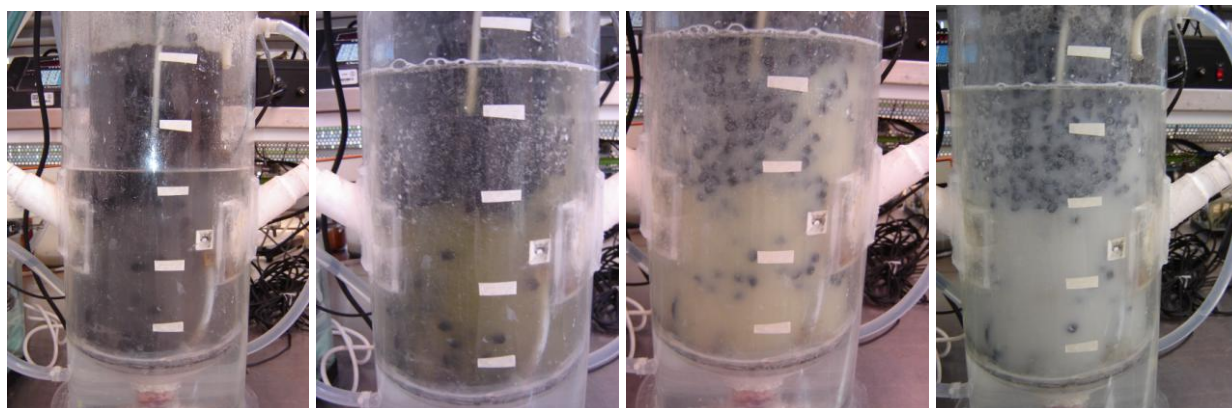


Figura 4.35. Apariencia secuencial del reactor en el ciclo oxidativo, desde el inicio (izquierda) hasta su término en el cual se obtiene el azufre elemental (derecha).

El esquema de operación de la biomasa en el empaque permitió que el azufre no se mezclara con la biomasa suspendida en detrimento del proceso. De acuerdo con los resultados de la figura 4.20 y con los observados para la etapa de ciclos combinados, el empaque colonizado permaneció como un soporte efectivo para mantener el proceso sulfatorreductor a lo largo de todas las etapas de operación.

La operación estable del proceso combinado ha permitido determinar la estrategia de control y las variables centrales para obtener un proceso eficiente de producción de azufre a partir de sulfato, en un mismo reactor discontinuo secuencial de lecho móvil.

Determinación del grado de sulfuroxidación química y biológica

Por último, aunque al proceso no se agregó ningún otro tipo de biomasa más que la que se aclimató para la sulfatorreducción, y dado que la sulfuroxidación se puede llevar a cabo por vía química o biológica, se hicieron pruebas de respirometría para establecer experimentalmente qué tipo de oxidación se estaba llevando a cabo en la etapa aerobia en el reactor. Tras el último ciclo combinado que se llevó a cabo (día 348 de operación), se hicieron pruebas de consumo de oxígeno en presencia de sulfuro tanto químicamente como con los empaques colonizados, así como una prueba de oxidación de sulfuro en presencia de la biomasa suspendida propia del reactor, se realizaron igualmente pruebas de respiración endógena para los empaques y la biomasa suspendida, la cual fue sustraída de la oxidación total de los empaques y de la biomasa suspendida. La metodología de estas pruebas se describe con más detalle en la sección 3.1.4. En la figura 4.36 se presentan las curvas promedio de las tres respirometrías, la de la oxidación química, así como aquellas con los empaques y con la biomasa suspendida.

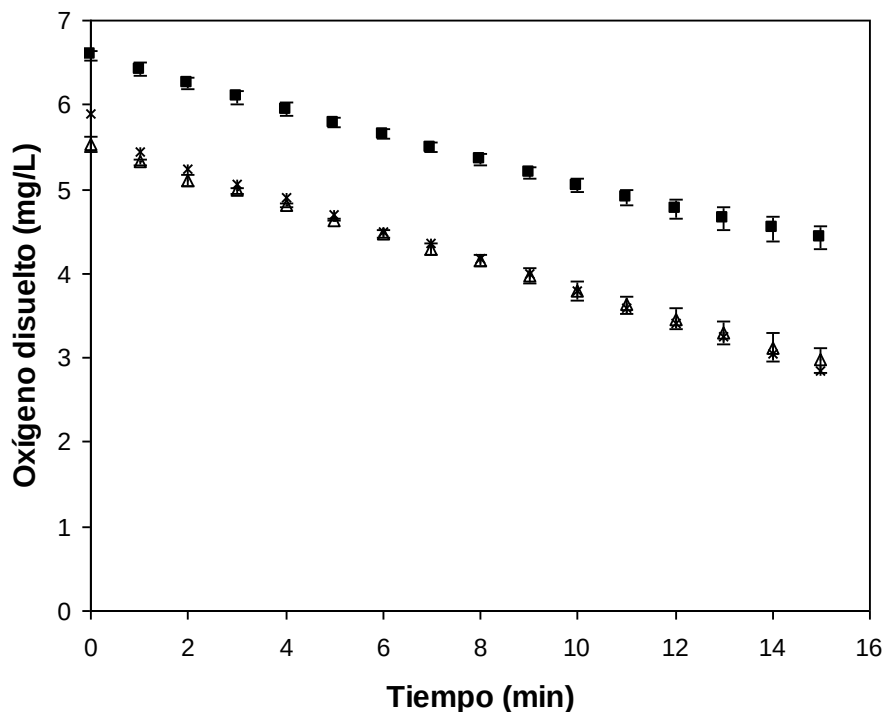


Figura 4.36. Consumo de oxígeno en un respirómetro por un proceso de sulfuroxidación química (■) y en presencia de empaques colonizados (Δ) y biomasa suspendida (*).

De las curvas de la figura 4.36, se obtuvieron las tasas de consumo de oxígeno para cada caso, las cuales se presentan en la tabla 4.10. La tasa de consumo de oxígeno de la sulfuroxidación en el caso de las pruebas con empaques ($0.136 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) no es mayor a la de la sulfuroxidación química por sí sola ($0.1442 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) por lo que se concluye que no existe un proceso sulfuroxidante biológico asociado a los empaques colonizados.

En el caso de la sulfuroxidación llevada a cabo por la biomasa suspendida, se observa en la figura 4.36 que las curvas de consumo de oxígeno de la biomasa suspendida y de los empaques colonizados prácticamente se superponen, aunque existen ligeras diferencias. En el caso de la biomasa suspendida, la tasa de consumo de oxígeno es de $0.1686 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, por lo que existe un margen del 14.5% de diferencia respecto a la sulfuroxidación química ($0.1442 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), el cual se puede atribuir a un proceso biológico de sulfuroxidación. Aún así este porcentaje es pequeño y por tanto está más sujeto a la incertidumbre de la experimentación. Es pues que la evidencia lleva a concluir que el proceso sulfuroxidante en el caso del reactor combinado es predominantemente químico, lo cual es consistente con el hecho de que el reactor nunca fue inoculado con una biomasa sulfuroxidante, por lo que no se espera una sulfuroxidación biológica importante, y sin embargo se obtiene evidencia de una participación marginal de un proceso biológico en la sulfuroxidación, el cual está vinculado a la biomasa suspendida del reactor y no al soporte plástico.

Tabla 4.10. Tasas de consumo de oxígeno para cada prueba de respirometría a 30°C.

Proceso	Tasa de consumo de oxígeno ($\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
Sulfuroxidación química	0.1442
Respiración total de empaques	0.1673
Respiración endógena de empaques	0.0313
Sulfuroxidación en empaques	0.136
Respiración total biomasa suspendida	0.1838
Respiración endógena biomasa suspendida	0.0152
Sulfuroxidación en biomasa suspendida	0.1686
Sulfuroxidación biológica de la biomasa suspendida	0.0244
% de sulfuroxidación biológica	14.5 %

La ausencia de sulfuroxidación biológica en los empaques y su presencia en la biomasa suspendida se puede explicar por el hecho de que las bacterias sulfatorreductoras heterótrofas desplazan en el empaque otro tipo de organismos. Se ha encontrado que en sustratos sólidos donde se tiene una presencia predominante de material orgánico, ocurre inhibición para el crecimiento de bacterias sulfuroxidantes (Visser *et al.*, 1997).

La combinación de un proceso biológico sulfatorreductor y un proceso sulfuroxidante predominantemente químico en un solo reactor discontinuo secuencial se ha realizado con éxito. El incorporar el esquema de control de etapas aerobias a un proceso en lote puede permitir el desarrollo de un proceso sulfuroxidante con un mayor predominio biológico con los beneficios que puede implicar el uso de este tipo de azufre (Seidel *et al.*, 2006, Janssen *et al.*, 2009).

En lo que a posibles mejoras e investigaciones futuras sobre el proceso propuesto se refiere, la etapa sulfatorreductora es la que registra las mayores pérdidas en el balance de azufre. Para reducir dichas pérdidas y aumentar la conversión a azufre elemental, el diseño del reactor no fue suficiente, por lo que un medio de recircular al reactor los gases del espacio de cabeza, así como la operación del proceso sulfatorreductor con un pH inicial de 8, son opciones viables que contribuirían a reducir dicha pérdida por transferencia.

Así mismo, es factible explorar la posibilidad de que el proceso propuesto se lleve a cabo en lote pero separando ambas etapas en reactores distintos, ya que el proceso biológico es predominantemente sulfatorreductor mientras que el proceso sulfuroxidante es mayormente químico, lo que podría mejorar las eficiencias de ambos procesos, utilizando la estrategia de control propuesta en este trabajo.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Fue posible operar un reactor discontinuo secuencial que integra una etapa anaerobia sulfatorreductora y una aerobia sulfuroxidante para tratar aguas residuales ricas en sulfatos. Para controlar la inhibición del proceso biológico y determinar el término de cada etapa se utilizaron sensores en línea de pH y potencial redox, así como el seguimiento del sulfuro disuelto a lo largo del proceso. Por medio de la estrategia desarrollada fue posible la operación secuencial del reactor anaerobio/aerobio para transformar los sulfatos en azufre elemental con una eficiencia significativa.

Sobre el proceso sulfatorreductor

1. Fue posible modelar el proceso sulfatorreductor sin necesidad de terminos de inhibición, considerando únicamente dos terminos de afinidad: por sulfato y por lactato y dejar fuera los términos de inhibición que han sido propuestos en otros trabajos, a saber, la inhibición por sulfuro y por pH, las cuales no fueron significativas.
2. La sulfatorreducción fue más sensible a la concentración del sustrato orgánico que a la concentración de sulfato, dado que la constante de afinidad tipo Monod con respecto al lactato tiene un valor significativamente mayor que la constante para el sulfato, tal que la cinética con respecto al sulfato se puede aproximar al orden cero.
3. Se estableció que la reacción de sulfatorreducción predominante es la correspondiente a la mineralización parcial del lactato, es decir, a la que genera como producto no sólo carbono inorgánico sino también ácido acético. Este hallazgo fue consistente tanto en el reactor que se utilizó en las pruebas cinéticas como en el que se utilizó en el primer ensayo de colonización, e igualmente para el proceso sulfatorreductor presente en el reactor combinado de 5 litros.

4. El nivel del potencial de óxido-reducción es el responsable del efecto inhibitor sobre el proceso sulfatorreductor. Se encontró que el rango óptimo de operación del proceso sulfatorreductor fue entre -50 y -250 mV de potencial redox. Se encontró que las concentraciones habituales de sulfuro para el proceso sulfatorreductor, lejos de ser inhibitorias, son promotoras del mismo al coadyuvar a mantener los niveles redox.
5. Fue posible operar un reactor sulfatorreductor con eficiencia del 100% utilizando el soporte plástico elegido como lecho móvil. La biomasa adherida al lecho móvil fue la más importante para llevar a cabo la sulfatorreducción, mientras que la biomasa suspendida, aunque mantiene su actividad, presentó una menor participación en la actividad sulfatorreductora dado el lavado que esta sufre a lo largo de la operación.
6. El uso de un reactor discontinuo secuencial favorece la producción de biomasa sulfatorreductora con una capacidad reductora mayor por unidad de biomasa que la que se obtiene de un reactor continuo.
7. El potencial redox puede utilizarse como variable de control para un proceso sulfatorreductor independiente al ser correlacionable con la producción máxima de sulfuro.

Sobre el proceso sulfurooxidante

8. El proceso sulfurooxidante en lote permitió separar las etapas de oxidación de azufre y distinguirlas en línea. Estas etapas fueron identificadas no sólo mediante el seguimiento de las especies azufradas sino mediante la detección del oxígeno disuelto en línea. Fue posible pues separar las cinéticas de oxidación química de

transformación de sulfuro a azufre y de azufre a sulfato para efectos de modelado de un reactor en lote.

9. Fue factible utilizar el perfil redox como variable sustituta para diferenciar las etapas de oxidación del azufre en un proceso sulfuroxidante en lote ya que registra un comportamiento análogo a la señal de oxígeno disuelto.

Sobre el proceso combinado, su control y optimización

10. Se encontró que un control del pH por debajo de 8 y el seguimiento del potencial redox, tal que su valor no exceda los niveles negativos durante la etapa oxidativa, evitan la inhibición de la etapa anaerobia posterior. Esto permitió operar de manera estable el reactor discontinuo secuencial sulfatorreductor/sulfuroxidante con etapas alternadas y con una conversión de sulfato a azufre elemental significativa.
11. El seguimiento del potencial redox fue necesario para la operación eficiente del proceso combinado. Sin embargo, para este caso no se le pudo correlacionar directamente con la concentración de las especies azufradas, por lo que no es conveniente como variable de salida para el control de todo el proceso.
12. El término de cada etapa coincide con el máximo de concentración de sulfuro en el caso de la etapa sulfatorreductora, y con su mínimo en el caso de la etapa sulfuroxidante, por lo que el uso de un sensor en línea de sulfuro junto con el control de pH y el seguimiento redox en la etapa oxidativa se propone como la estrategia óptima de control para el proceso combinado.
13. El uso de la biomasa adherida al empaque fue de utilidad para no mezclar el azufre con biomasa suspendida, ya que esta tendió a quedarse en suspensión durante el proceso. Se recomienda un paso posterior de filtrado o centrifugado para separar el azufre elemental.

VI. REFERENCIAS

REFERENCIAS

- APHA-AWWA-WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Ed by American Public Health Association, 21st Edition, Washington DC (2005).
- Barrett, E.K, Clark, M., (1987) Tetrathionate Reduction and Production of Hydrogen Sulfide from Thiosulfate. *Microbiol. Rev.*, **51**, 2, 192-205
- Bartlett, J.K., Skoog, D.A. (1954) Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons, *Anal. Chem.* **26**, 6, 1008-1011
- Batstone, D.J., (2006) Mathematical modeling of anaerobic reactors treating domestic wastewater: rational criteria for model use, *Rev. Environ. Sci. Biotech.*, **5**, 57-71
- Bayoumy, M.A., Bewtra, J.K., Ali, H.I., Biswas, N., (1999) Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor, *Wat. Air Soil Pol.*, **112**, 67-84
- Betancur, M.J., Moreno, J., Buitrón, G., (2004) Event-driven control for treating toxicants in aerobic sequencing batch bioreactors. In *Proceedings of the 9th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB9)*. CD ROM file 1074. 28-31 march, Nancy, France.
- Buisman, C.J.N., Ijspeert, P., Hof, A., Janssen, A.J.H., ten Hagen, R., Lettinga, G., (1991) Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur with oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 813-820
- Buitrón, G., Schoeb, M.E., Moreno-Andrade, I., Moreno, J.A., (2005) Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Wat. Res.* **39**, 1015-1024
- Buitrón, G., Betancur, M.J., Moreno, G., Moreno, J.A., (2003) Oxidation- reduction potential as a control variable for the anaerobic stage during anaerobic-aerobic *p*-nitrophenol degradation. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1822-1827
- Buitrón, G., Martínez, K.M., Vargas, A., (2006) Degradation of acid orange 7 by a controlled anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. *Wat. Sci. Technol.* **54** (2), 187-192
- Celis García, M. L B., (2004) Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, pp.123.
- Celis-García, M.L.B., Ramírez, F., Revah, S., Razo-Flores, E., Monroy, O., (2004) Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: influence of microbial immobilization type, *Environ. Tech.*, **25**, 1265-1275
- Celis-García, L.B., Razo-Flores, E., Monroy, O., (2007) Performance of a down-flow fluidized-bed reactor under sulfate reduction conditions using volatile fatty acids as electron donors, *Biotech. Bioeng.*, **97**, 771-779
- Chen, K.Y., Morris, J.C., (1972) Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂, *Environ. Sci. Tech.*, **6**, 6, 529-537
- Cord-Ruwisch, R., (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria, *J Microbiol. Meth.*, **4**, 33-36
- Drury, W.J., (1999) Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid-substrate reactors. *Wat. Environ. Res.*, **71**, 6, 1244-1250
- Fernández Polanco, M., García Encina, P.A., (2006) Application of biological treatment systems for sulfate-rich wastewaters. In *Advanced Biological Treatment Process for Industrial Wastewaters* (ed. By F.J. Cervantes, S.G. Pavlostathis and A.C. van Haandel) IWA Publishing, London, UK, pp. 213-236

VI. REFERENCIAS

- González Blanco, G., (2007) Conversión de sulfato a azufre elemental en un reactor de lecho fluidificado inverso bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, pp.92.
- González-Sánchez, A., Revah, S., (2007) The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium, *Enz. Micro. Technol.*, **40**, 292-298
- Gupta, A., Flora, J.R.V., Sayles, G.D., Suidan, M.T., (1994) Methanogenesis and sulfate reduction in chemostats-II. Model development and verification, *Wat. Res.*, **28**, 795-803
- Herrera, L., Duarte, S., Hernández, J., (1993a) Sulfate elimination to improve water quality of mine process effluents. I. Sequencing batch bioreactor growth kinetics of *desulfovibrio desulfuricans*, *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, **8**, 279-289
- Herrera, L., Hernández, J., Duarte, S., (1993b) Sulfate elimination to improve water quality of mine process effluents. II. Hydrogen sulfide transport in biological reactors, *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, **8**, 409-424
- Horikoshi, K., (1999), Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 4, 735-750
- Janssen, A.J.H., Sleyster, R., Van der Kaa, C., Jochemsen, A., Bontsema, J., Lettinga, G., (1995) Biological sulfide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 327-333
- Janssen, A.J.H., Meijer, S., Bontsema, J., Lettinga, G., (1998) Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **60** (2), 147-155
- Janssen, A.J.H., Lettinga, G., de Keizer, A., (1999) Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur. Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles, *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **151**, 389-397
- Janssen, A.J.H., Lens, P.N.L., Stams, A.J.M., Plugge, C.M., Sorokin, D.Y., Muyzer, G., Dijkman, H., Van Zessen, E., Luimes, P., Buisman, C.J.N., (2009) Application of bacteria involved in the biological sulphur cycle for paper mill effluent purification, *Sci. Tot. Environ.*, **407**, 1333-1343
- Jones, B.D., Ingle, J.D., (2005) Evaluation of redox indicators for determining sulfate-reducing and dechlorinating conditions. *Wat. Res.* **39**, 4343-4354
- Jong, T., Parry, D.L., (2006) Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor, *Wat. Res.*, **40**, 2561 – 2571
- 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, *Biotech. Bioeng.*, **86**, 3, 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**, 204-213
- Kamyshny, A., Goifman, A., Gun, J., Rizkov, D., Lev, O., (2004) Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at 25°C: a new approach for the study of polysulfides' equilibria, *Environ. Sci. Tech.*, **38**, 6633-6644
- Kamyshny, A., Ekelchik, I., Gun, J., Lev, O., (2006) Method for the determination of inorganic polysulfide distribution in aquatic systems, *Anal. Chem.*, **78**, 2631-2639

- Kariuki, S., Morra, M.J., Umiker, K.J., Cheng, I.F., (2001) Determination of total ionic polysulfides by differential pulse polarography, *Anal. Chim. Acta*, **442**, 277-285
- Kelly, D.P., (1999) Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways, *Arch. Microbiol.*, **171**, 219-229
- Khanal, S.K., Huang, J.C., (2003) Anaerobic Treatment of High Sulfate Wastewater with Oxygenation to Control Sulfide Toxicity, *J. Environ. Eng.*, **129**, 12, 1104-1112
- Khanal, S.K., Huang, J.C., (2006) Online Oxygen Control for Sulfide Oxidation in Anaerobic Treatment of High-Sulfate Wastewater, *Wat. Environ. Res.*, **78**, 4, 397-408
- Kleinjan, W.E., de Keizer, A., Janssen, A.J.H., (2003) Biologically produced sulfur, *Top. Curr. Chem.*, **230**, 167-188
- Kolmert, A., Henrysson, T., Hallberg, R., Mattiasson, B., (1997) Optimization of sulphide production in an anaerobic continuous biofilm process with sulphate reducing bacteria, *Biotechnol. Lett.*, **19**, 10, 971-975
- Krishnakumar, B., Majumdar, S., Manilal, V.B., Haridas, A., (2005) Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLR). *Wat. Res.*, **39**, 639-647
- 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, 41-88
- Lens, P.N.L., Kuenen, J.G., (2001) The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology, *Wat. Sci. Technol.*, **44**, 8, 57-66
- Lowry, O.H., Rosenbrough N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.*, 265-275
- Markwell, M.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., (1978) A modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples, *Anal. Biochem.*, **87**, 206-210
- McGuire, M.M., Hamers, R.J., (2000) Extraction and quantitative analysis of elemental sulfur from sulfide mineral surfaces by high-performance liquid chromatography, *Environ. Sci. Tech.*, **34**, 4651-4655
- Metcalf & Eddy, Inc. Wastewater Engineering, Treatment and Reuse. Fourth edition. McGraw-Hill. New York (2003)
- Moreno-Andrade, I., Buitrón, G., Betancur, M.J., Moreno, J.A., (2006) Optimal degradation of inhibitory wastewaters in a fed-batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 713-720
- Nacheva, P.M., Peña-Loera, B., Morales-Guzmán, F., (2006) Treatment of chemical-pharmaceutical wastewater in packed bed anaerobic reactors, *Wat. Sci. Tech.*, **54** (2), 157-163
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A., Peeva, L., (2000) Ethanol Utilization by Sulfate-Reducing Bacteria: An Experimental and Modeling Study, *Biotech. Bioeng.*, **70** (5), 533-543
- Nanninga, H.J., Gottschal, J.C., (1986) Anaerobic purification of wastewater from potato-starch producing factory. *Wat. Res.* **20** (1), 97-103
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L., Lettinga, G., (1996) Effect of upward velocity and sulfide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. *Process Biochem.* **31**, 699-710
- Omil, F., Lens, P., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G., (1998) Long-Term Competition between Sulfate Reducing and Metanogenic Bacteria in UASB Reactors Treating Volatile Fatty Acids. *Biotech. Bioeng.*, **57**, 676-685

VI. REFERENCIAS

- Ribes, J., Keesman, K., Spanjers, H., (2004) Modelling anaerobic biomass growth kinetics with a substrate threshold concentration, *Wat. Res.*, **38**, 4502-4510
- Seidel, H., Wennrich, R., Hoffman, P., Löser, C., (2006) Effect of different types of elemental sulfur on bioleaching of heavy metals from contaminated sediments, *Chemosphere*, **64**, 1444-1453
- Sorokin, D.Y., Kuenen, J.G., (2005) Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 685-702
- Steudel, R., (1996) Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 1417-1423
- Steudel, R., (2003a) Aqueous sulfur sols, *Top Curr. Chem.*, **230**, 153-166
- Steudel, R., (2003b) Inorganic polysulfides S_n^{2-} and radical anions $S_n^{\cdot-}$, *Top Curr. Chem.*, **231**, 127-152
- Stoscheck, C.M. (1990) Quantification of Protein, *Methods Enzym.*, **182**, 50-68
- Tichy, R., Janssen, A., Grotenhuis, J.T.C., Lettinga, G., Rulkens, W., (1994) Possibilities for using biologically-produced sulfur for cultivation of *thiobacilli* with respect to bioleaching processes. *Biores. Technol.* **48**, 221-227
- Van den Ende, F.P., Meier, J., van Gernerden, H., (1997) Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **23**, 65-80
- Vargas, A., Buitrón, G., (2006) On-line concentration measurements in wastewater using nonlinear deconvolution and partial least squares of spectrophotometric data. *Wat. Sci. Technol.* **53** (4-5), 457-463
- Vavilin, V.A., Vasiliev, B.V., Rytov, S.V., Ponomarev, A.V., (1994) Self-oscillating coexistence of methanogens and sulphate-reducers under hydrogen sulphide inhibition and the pH-regulating effect. *Biores. Technol.*, **49**, 105-119
- Vavilin, V.A., Lokshina, L.Y., (1996) Modeling of volatile fatty acids degradation kinetics and evaluation of microorganism activity, *Biores. Technol.*, **57**, 69-80
- Velasco, A., Alcantara, S., Razo-Flores, E., Revah, S., (2004) Partial thiosulfate oxidation by steady-state continuous culture in a birreactor-settler system. *Chem. Technol. Biotechnol.*, **79**, 132-139
- Venkata Mohan, S., Chandrasekhara Rao, N., Krishna Prasad, K., Murali Krishna, P., Sreenivas Rao, R., Sarma, P.N., (2005) Anaerobic Treatment of Complex Chemical Wastewater in a Sequencing Batch Biofilm Reactor: Process Optimization and Evaluation of Factor Interactions Using the Taguchi Dynamic DOE Methodology, *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 6, 732-745
- Visser, A., Gao, Y., Lettinga, G., (1993) Effects of short-term temperature increases on the mesophilic anaerobic breakdown of sulfate containing sythetic wastewater. *Wat. Res.* **27**, 541-550
- Visser, J.M., Stefess, G.C., Robertson, L.A., Kuenen, J.G., (1997) *Thiobacillus* sp. W5, the dominant autotroph oxidizing sulfide to sulfur in a reactor for aerobic treatment of sulfidic wastes, *Antonie van Leeuwenhoek* **72**, 127-134
- Wirsén, C.O., Sievert, S.M., Cavanaugh, C.M., Molyneaux, S.J., Ahmad, A., Taylor, L.T., DeLong, E.F., Taylor, C.D., (2002) Characterization of an Autotrophic Sulfide-Oxidizing Marine *Arcobacter* sp. That Produces Filamentous Sulfur, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1, 316-325

ANEXO I

ANEXO I

AJUSTES INDIVIDUALES DE LOS MODELOS

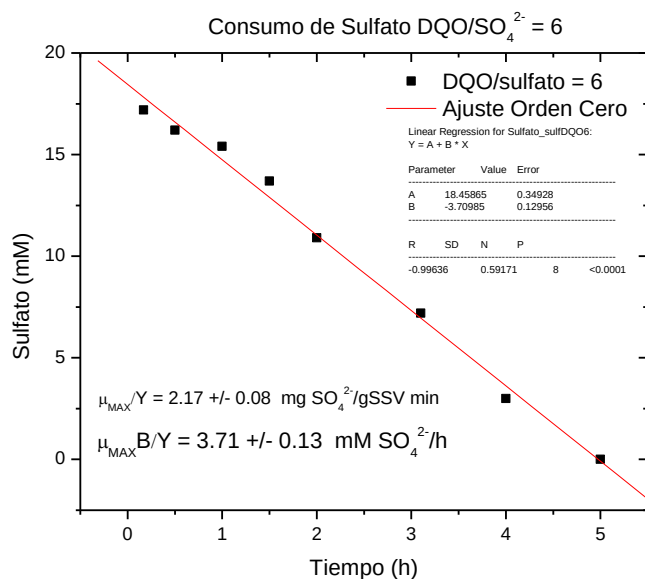


Figura 1. Ajuste de un modelo cinético de orden cero a los datos experimentales de consumo de sulfato para una relación de alimentación DQO/sulfato de 6.

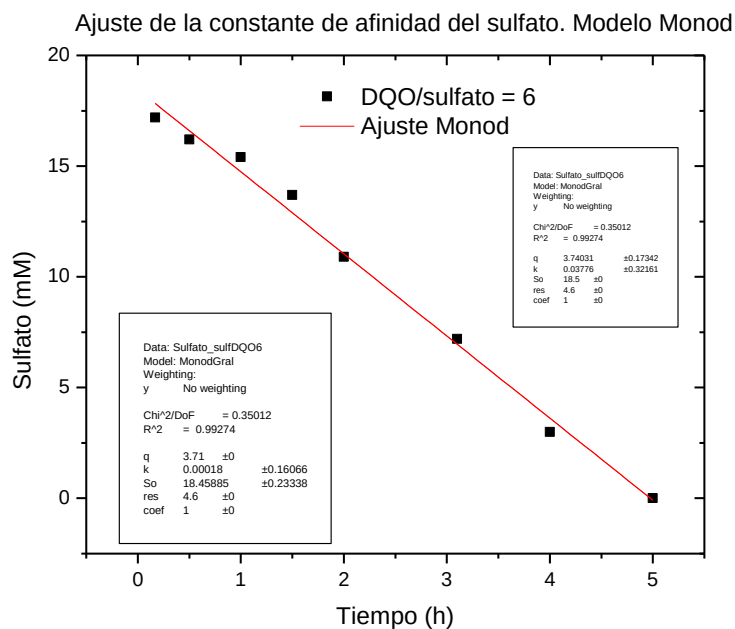


Figura 2. Ajuste de un modelo cinético tipo Monod a los datos experimentales de consumo de sulfato para una relación de alimentación DQO/sulfato de 6.

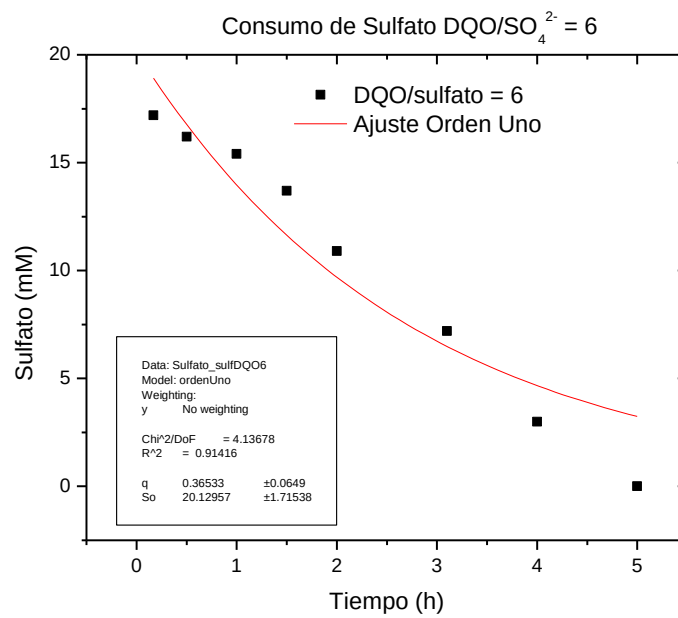


Figura 3. Ajuste de un modelo cinético de orden uno a los datos experimentales de consumo de sulfato para una relación de alimentación DQO/sulfato de 6.

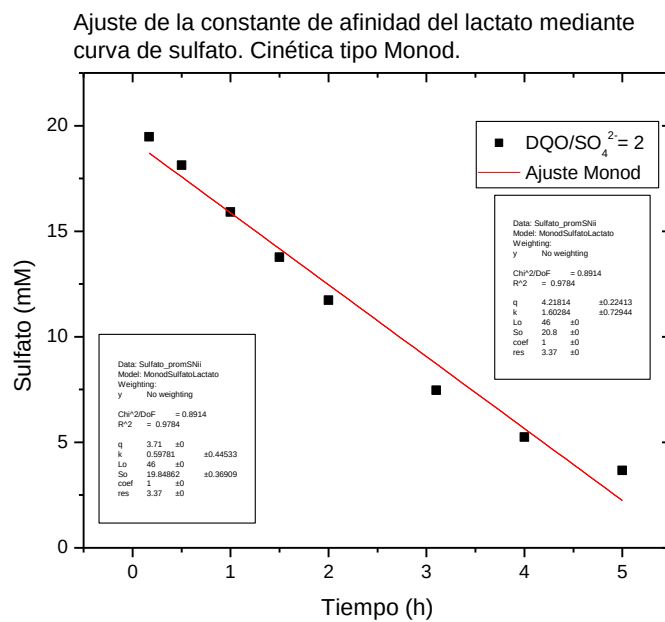


Figura 4. Ajuste de la constante de afinidad del lactato mediante la curva de consumo de sulfato Utilizando un modelo cinético tipo Monod para una relación de alimentación DQO/sulfato de 2.

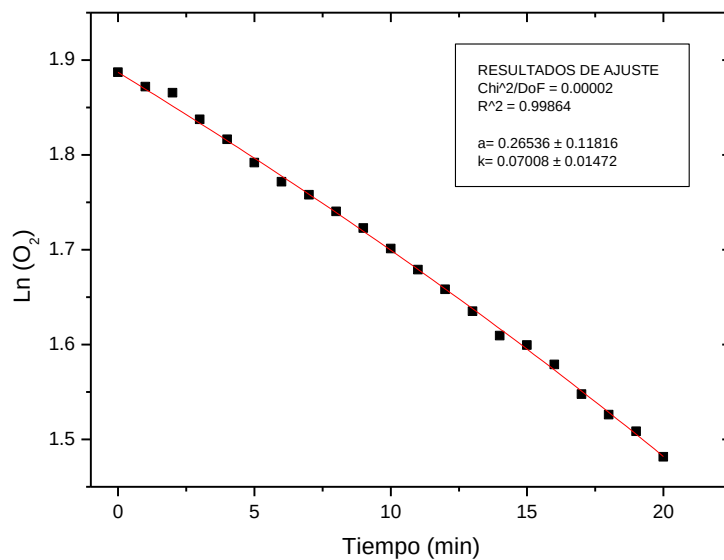


Figura 5. Ajuste individual de datos experimentales para obtener el orden de reacción con respecto al oxígeno.
Datos experimentales (■), Ajuste del modelo (—).

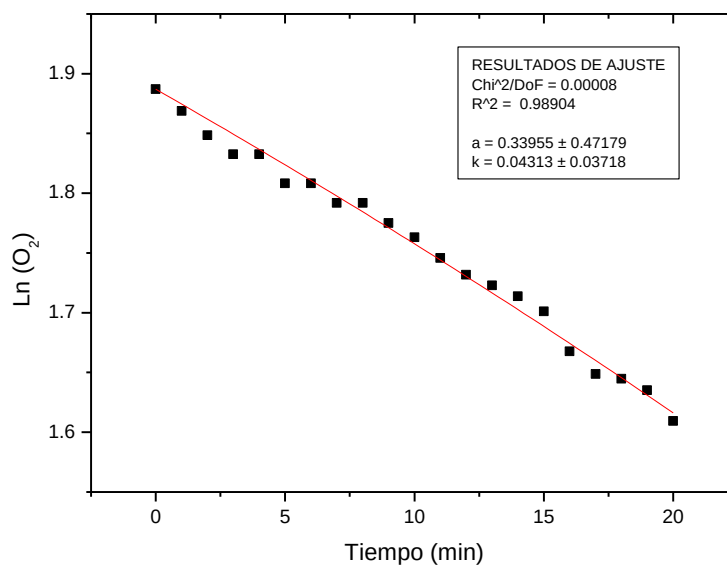


Figura 6. Ajuste individual de datos experimentales para obtener el orden de reacción con respecto al oxígeno.
Datos experimentales (■), Ajuste del modelo (—).

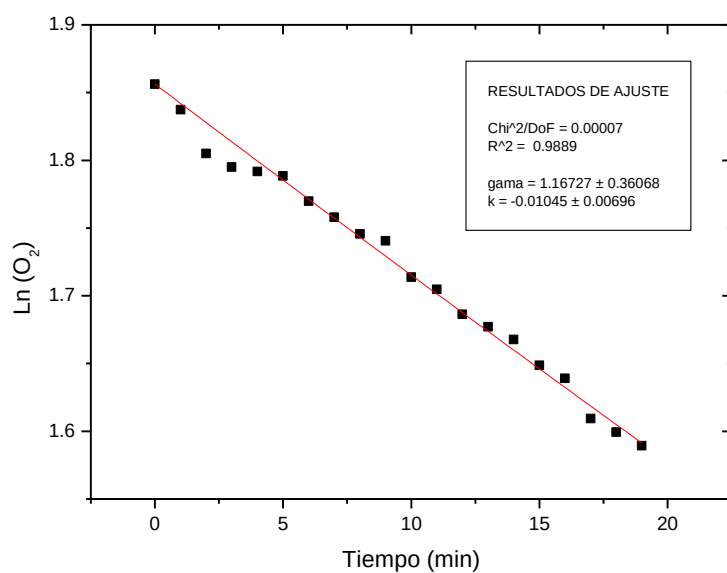


Figura 7. Ajuste individual de datos experimentales para obtener el orden de reacción con respecto al oxígeno. Datos experimentales (■), Ajuste del modelo (—).

ANEXO II

ANEXO II

RESULTADOS PUBLICADOS

Parte de este trabajo ha sido presentado en los siguientes congresos:

1. Torner-Morales, F.J., Buitrón, G., Vargas, A., (2010) “The redox potential as the limiting factor to carry out a combined sulfate-reducing / sulfide-oxidizing process in a single SBR”, 12th World Congress on Anaerobic Digestion. International Water Association.
2. Prato-García, D., Buitrón, G., Torner-Morales, F.J., (2010) “Chemical and Biological Reduction of the Azo Dye AB113 Assisted By Sulphate-Reducing Bacteria in Attached-Growth Sequencing Batch Reactors (SBRs)”, 12th World Congress on Anaerobic Digestion. International Water Association.
3. Torner-Morales, F.J., Buitrón, G., Vargas, A., (2010) “Sulfide-oxidizing process stage identification by on line dissolved oxygen signal”, II Young Water Professional Conference. International Water Association México.
4. Torner-Morales, F.J., González-Martínez, J., Meraz, M., Buitrón, G., (2008) “Kintetic characterization for modeling purposes of an anaerobic sulfate reducing batch process”, IX Taller y simposio latinoamericano de digestión anaerobia. International Water Association.

Adicionalmente, al momento se cuenta con la siguiente publicación salida de este trabajo, la cual se incluye en este anexo:

Torner-Morales, F.J., Buitrón, G., (2010) Kinetic characterization and modeling simplification of an anaerobic sulfate reducing batch process, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **85**, 4, 453-459

Artículos en preparación:

Torner-Morales, F.J., Buitrón, G., (2010) Sulfate-reducing and sulfide-oxidizing processes. Application and need of control strategies: a review.

Torner-Morales, F.J., Buitrón, G., (2010) An efficient plastic support used as mobile phase of a sulfate-reducing process.

Torner-Morales, F.J., Buitrón, G., Vargas, A., (2010) Mobile phase SBR control strategy for elemental sulphur production from a sulfate wastewater treatment process.

Kinetic characterization and modeling simplification of an anaerobic sulfate reducing batch process

Francisco J. Torner-Morales and Germán Buitrón*

Abstract

BACKGROUND: A series of kinetic experiments for a sulfate reducing process was carried out in a batch laboratory reactor that allowed simplification of a model initially proposed for this system enabling establishment of the kinetic parameters.

RESULTS: It was found that an incomplete oxidation of lactate is the most significant bio-reaction occurring in the reactor; this fact led to model simplifications that allowed determination of the kinetic parameters. Sulfide and pH inhibition can be described using one inhibition term within the model equation, given the fact that sulfide inhibition is not present in the system. Kinetic parameters were obtained, yielding a maximum specific rate ($\mu_{\max}/Y$) of $2.17 \pm 0.08 \text{ mg sulfate mg}^{-1} \text{ VSS min}^{-1}$. A zero-order kinetics with respect to sulfate and a Monod affinity constant of $142.7 \pm 64.9 \text{ mg L}^{-1}$ for the lactate were found.

CONCLUSIONS: The final model for the process can be described by a single Monod term involving the lactate. This model resulted from the lack of sulfide inhibition in the system and the predominance of the partial lactate oxidation to acetate reaction over the complete lactate and acetate oxidation.

© 2010 Society of Chemical Industry

Keywords: sulfate reducing bacteria; modeling; kinetics; batch process

NOTATION

μ	bacterial specific growth rate
$\mu_{\max}$	maximum bacterial specific growth rate
$[A^-]$	acetate concentration
$[B]$	biomass concentration in g L^{-1} of volatile suspended solids
$[H_2S]$	sulfide concentration
$[I]$	concentration of a generic inhibitory species
K_i	sulfide inhibition constant
K_S	Monod affinity constant for the organic substrate, in this case lactate
K_{SO_4}	Monod affinity constant for sulfate
$[L^-]$	lactate concentration
$[S]$	generic substrate concentration
$[SO_4^{2-}]$	sulfate concentration
Y	yield

INTRODUCTION

The reuse of water is becoming a strategic issue for all communities that do not possess such resource in abundance. Water treatment processes should consider the source and kind of pollutants present in wastewaters, as well as the cleaning requirements. Together with organic matter, sulfate is a common compound present in the discharges of industries such as tanneries, pharmaceuticals, distilleries, edible oil refineries, the pulp and paper industry, among others.¹ Under anaerobic conditions sulfate becomes sulfide, which is toxic, corrosive and bad-odorous, representing an environmental and process efficiency problem.²

The reuse of water requires decrease of the sulfate concentration; however, its conversion to sulfide is not the best option, so that decreasing the total sulfur content in wastewaters has been proposed by transforming the dissolved sulfate into elemental sulfur that eventually could be separated from the water, obtaining an added value product, while the organic matter content in the wastewater is reduced simultaneously. The biological treatment presents itself as a feasible option by using both sulfate reducing and sulfide oxidizing processes; the former transforms the sulfate into sulfide under anaerobic conditions and the latter converts the sulfide, in the presence of oxygen, into sulfate or elemental sulfur depending on the medium's oxygenation degree. Few studies have confirmed the feasibility of using both processes combined in a single reactor,³ where it would be convenient to have an on-line control of the process to manage efficiently either an anaerobic or an aerobic stage. Mathematical models for those processes are useful tools to better understand and to predict their behavior and as a basis to control the processes. In this work, some of the most relevant factors previously proposed for modeling the anaerobic sulfate reducing process are evaluated, in order to assess its

* Correspondence to: Germán Buitrón, Laboratory for Research on Advanced Processes for Water Treatment, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, México.
E-mail: gbuitronm@ii.unam.mx

Laboratory for Research on Advanced Processes for Water Treatment, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, México

applicability in an operational laboratory reactor. Different model proposals have been developed to describe the main phenomena around the bio-consumption of diverse pollutants, including both affinity (Monod-type) and inhibitory (Haldane-type) equations to describe the dependence of the bacterial specific growth rate (μ) on the presence of a concrete substrate. Vavilin *et al.*⁴ set out a model for a sulfate-fed continuous reactor, modifying the growth Monod function with two additional terms considering the pH and the sulfide concentration as inhibitory factors of the sulfate reducing process, leading to:

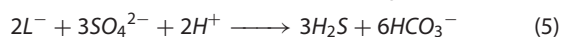
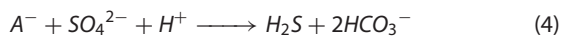
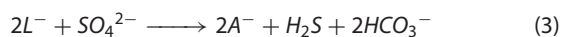
$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]f([H_2S])f(pH)}{K_S + [S]} \quad (1)$$

where $\mu_{\max}$ is the maximum specific growth rate, $[S]$ is the organic substrate concentration, K_S is the affinity constant of the substrate, and the inhibition functions for $[I] = pH$ or for $[I] = [H_2S]$ had the form:

$$f(I, K_2, K_{100}) = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{K_2} \right)^{\frac{\ln 99}{\ln \frac{K_{100}}{K_2}}}} \quad (2)$$

where K_2 and K_{100} correspond to the inhibitor concentrations $[I]$ at which the specific growth rate decreases to 50% (half) and 1%, respectively, of its maximum. Simulations with this model showed sulfate reduction and inhibition of methane production when the COD/sulfate ratio between the chemical oxygen demand (COD) and the sulfate concentration fell below 10/1. The model was calibrated with experimental data of a system fed with acetate. The conclusion of the system inhibition was attributed to pH and $[H_2S]$.⁴ Later it was found that sulfate reducing bacteria that utilize acetate as carbon source are more prone to sulfide inhibition than those that utilize other organic substrates.^{5,6} Sulfide inhibition of the sulfate reducing process has been largely reported but the values have a wide range of variation depending on the process conditions, such as the organic substrate that is being utilized, the pH at which the inhibition is measured, the reactor configuration, the biomass acclimation, etc. Such values oscillate between 248 and 926 mg L⁻¹ of total dissolved sulfide for a pH close to 7.0,⁶ and most of the existing data are for acetate and ethanol utilizing processes.⁷

Lactate can be used as the organic substrate because of its low volatility and its considerable biodegradability. Then, if lactate is chosen as organic carbon source for a sulfate reducing process, the lactate utilizing bio-reactions should be the core of the process; such reactions are described by Equations (3) to (5). Equation (3) describes the partial lactate (L^-) oxidation to acetate,⁸ Equation (4) describes the acetate (A^-) mineralizing reaction,^{9,10} and Equation (5) describes the complete one step lactate mineralizing reaction:⁸



An initial approach proposed to model this process considered that these three individual reactions were independent and simultaneously happening, although the occurrence of each one was unknown. The specific growth rate for the system was that proposed by Kalyuzhnyi *et al.*,¹¹ who considered two affinity Monod terms: one for the organic substrate and another one

for the sulfate, and two additional inhibition terms: a pH term and a first-order sulfide term. Then the specific growth rate equation for the reaction (3) would be described by Equation (6), which also would be similar for reactions (4) and (5),

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[SO_4^{2-}]}{K_{SO_4} + [SO_4^{2-}]} \frac{[L^-]}{K_S + [L^-]} \frac{(K_I - [H_2S])}{K_I} f_1(pH) \quad (6)$$

where K_{SO_4} and K_S are the affinity constants for the sulfate and lactate, respectively, and K_I corresponds to the sulfide inhibition constant.

The present work reports a series of kinetic experiments for a sulfate reducing process, carried out in a batch laboratory reactor, that led to simplify the model approach proposed above for this system and thus allowed to find the kinetic parameters.

EXPERIMENTAL METHODS AND MATERIALS

Reactor and inoculum

A 2 L sequencing batch reactor (SBR) was implemented to carry out an anaerobic bio-sulfate reducing process. The operation of the SBR consisted of three daily cycles of 8 h each, with the following stages: 30 min of settling, 2 min for drawing out 60% of the total volume, 2 min for filling, and the rest of the cycle time in continuous stirring while the reaction is carried out. The reactor was inoculated with granular sludge coming from a wastewater treatment plant with an upflow anaerobic reactor treating a brewery effluent and enriched also with sludge from a municipal wastewater treatment plant. The average biomass in the reactor during its operation was 2.7 g L⁻¹ as VSS (volatile suspended solids). The reactor was fed initially in time decreasing cycles with sodium sulfate, lactic acid and mineral medium^{12,13}. Once the sludge was acclimated to reduce at least 90% of the sulfate feed (with a constant initial lactic acid concentration) during a fixed short cycle time (8 h), it was fed and operated to perform the experiments described later. All the compounds utilized were analytical grade except the lactic acid with 87% purity.

Analysis

Reactor samples were taken with specific time intervals within the 8 h cycles and measurements of each relevant species were performed. Lactic acid concentration was determined using an HP Wilmington (DE, USA) 1100 UV diode detector high performance liquid chromatograph (HPLC) using a C8 Phenomenex[®] (Torrance, CA, USA) column with a 0.1 mol L⁻¹ ammonia phosphate mobile phase at pH 7.0 and absorbance at 210 nm. Acetic acid was measured by gas chromatography using an Agilent (Sta Clara, CA, USA) 6890N equipment with flame ionization detector using a Zebron[®] ZB-FFPA column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Determinations of total organic and inorganic carbons were obtained using a Shimadzu TOC Analyser (Shimadzu Corporation, Japan). Sulfate was determined by HPLC using a Varian[®] (Lake Forrest, CA, USA) IonoSpher 5A column with a 0.04 mol L⁻¹ potassium bifalate mobile phase at pH 4.0 and absorbance at 302 nm. Sulfide was measured by the Cord–Ruwisch method¹⁴ utilizing a Perkin–Elmer (Waltham, Mass., USA) UV-Vis spectrophotometer at 480 nm. The pH and ORP signals were determined by properly calibrated electrodes. ORP signal was corrected with respect to the hydrogen electrode. Volatile suspended solids were determined by standard methods.¹⁵

Kinetics

A series of kinetic experiments were performed in the 2 L SBR to obtain a wider insight about the main terms to be considered for modeling the sulfate reduction process performed by an already acclimated sulfate reducing sludge. In all the different experiments that were run, the batch reactor was filled to give 20 mmol L⁻¹ sulfate initial concentration, operating constantly at 30 °C and 7.0 initial pH. Under these conditions it was possible to obtain 90% of sulfate conversion by feeding the reactor with a COD/sulfate ratio of 2, considering the COD as a theoretical calculation for the lactate fed in grams per liter. The acclimation of the bioprocess to yield such efficiency was the starting point for the rest of the experiments. To evaluate the effect of increasing the organic load, two initial concentrations of lactate were tested: the normal operating concentration at a COD/sulfate ratio of 2, and another one at a COD/sulfate ratio of 6. On the other hand, to evaluate the bacterial inhibition by sulfide, the experiment was run under the two already mentioned initial conditions, but with continuous nitrogen bubbling during the entire operation cycle to strip out the accumulating sulfide in the reactor's liquor. The decreasing sulfide presence should theoretically increase the sulfate removal speed or at least it should remain constant. So, in combination, four different experimental conditions were applied. Each condition was run by triplicate. The kinetic parameters obtained were evaluated using linear and non-linear fitting protocols according to the considerations presented in the results and discussion section. A Levenberg–Marquardt optimization approach was used for the non-linear fittings. The model simplifications and their justification were made following the reactor's kinetic findings.

RESULTS AND DISCUSSION

Four different experimental conditions were tested in the already acclimated sulfate reducing system. Figure 1(A) shows the sulfate consumption over time at the experimental conditions described. It can be seen that a sulfate reduction of 90% is achieved in 7 h for a COD/sulfate ratio of 2 (the reactor's normal operating condition). On the other hand, an improvement of the process is observed when the COD is increased: 100% sulfate reduction in 5 h with a COD/sulfate ratio of 6. So, under these two experimental conditions the result obtained is as expected for the COD increment: an increase in the speed of the sulfate reducing process. However, the experiments with sulfide stripping did not improve the sulfate removal efficiency; on the contrary, the removal efficiency fell to 80% with a COD/sulfate ratio of 6 and to 50% for the COD/sulfate ratio of 2. It is unexpected that the sulfide stripping experiments presented a lower sulfate consumption in the reactor because, in principle, the most important inhibition factor would have been eliminated as it can be seen in the sulfide levels obtained from such experiments (Fig. 1(B)), where the runs with sulfide stripping present almost zero sulfide concentration along the entire experiment. Regarding these findings, and having into account that the experiment with no sulfide stripping and a COD/sulfate ratio of 6 had the most efficient sulfate removal, with the highest levels of accumulated sulfide (up to 350 mg L⁻¹ of dissolved sulfide), it must be concluded that the sulfide inhibition phenomenon is not present at these operating conditions. In the case that these conditions are going to be the standard operational conditions for the reactor, the sulfide inhibition term can therefore be neglected for the process modeling as long as the sulfate levels to be treated remain near 20 mmol L⁻¹ concentration. In the case of exceeding this concentration, the sulfide accumulation would

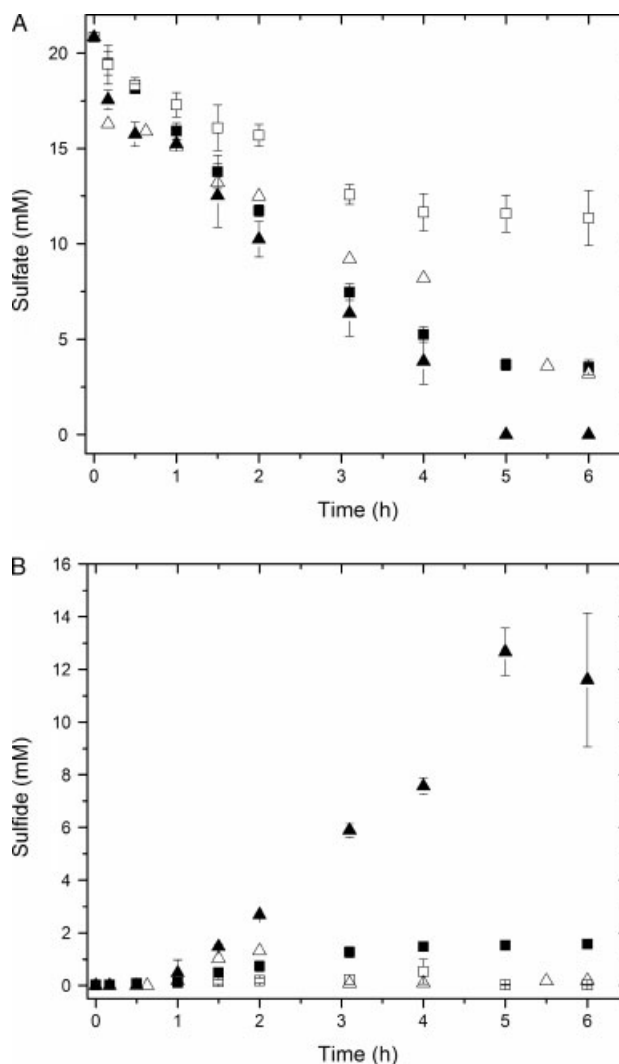


Figure 1. Sulfate reduction (A) and sulfide accumulation (B) during a sulfate reducing cycle operated under four different conditions: with a fed COD/SO₄²⁻ ratio of 2 (■) and 6 (▲) without using (□) and using (△) nitrogen as sulfide stripper.

be greater and would certainly reach a higher concentration; however, it can be seen in Fig. 1(B) that for a COD/sulfate ratio of 6, the high efficiency of the process remained despite a sulfide accumulation much higher than that obtained for the standard operating condition (COD/sulfate ratio of 2), which allows to conclude that there is a considerable non-inhibitory margin for sulfide accumulation in the process studied.

Despite the negligible sulfide inhibitory effect, the process was indeed inhibited in experiments with sulfide stripping. In Fig. 2 the pH (2(A)) and redox potential (ORP) (2(B)) evolution during the experiments described are shown.

It can be seen in Fig 2(A) that, under sulfide stripping conditions, the pH increased by almost 1 pH unit whereas in the non-stripping cases it decreased by 0.3 pH units. The obvious explanation for this pH increase is precisely the sulfide stripping procedure, since the extraction of sulfide from the system causes a rise in pH, along with simultaneous but less important carbon dioxide and acetic acid stripping. These last facts are shown by observing Fig. 3(A) and 3(B), which show, respectively, total organic carbon (TOC) and inorganic carbon evolution for the cases considered. For the

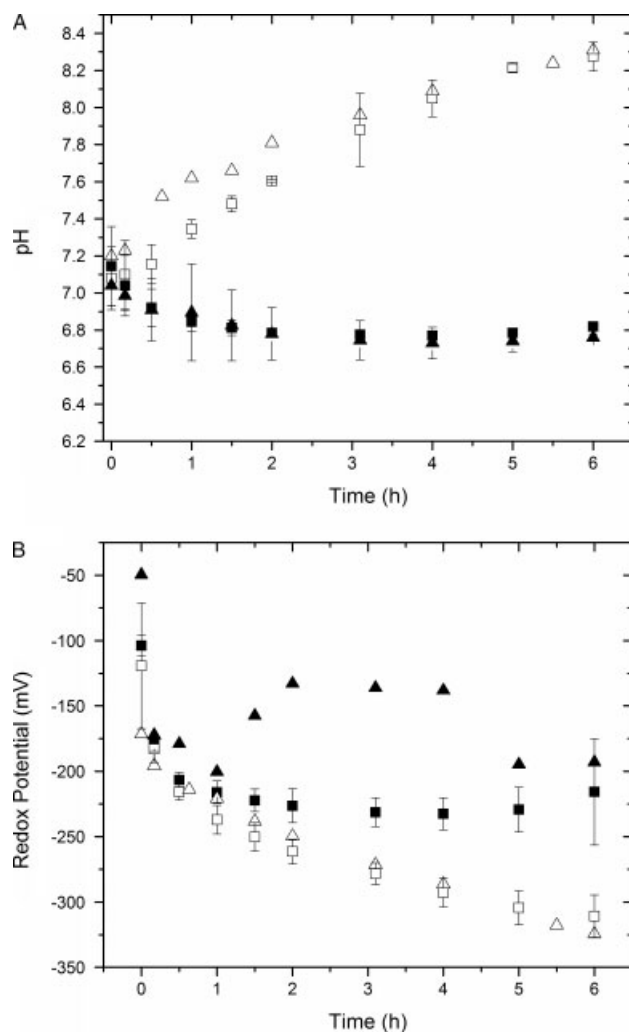


Figure 2. pH (A) and redox potential (B) evolution during a sulfate reducing cycle operated under four different conditions: with a fed COD/SO₄²⁻ ratio of 2 (■) and 6 (▲) without using (□) and using (△) nitrogen as sulfide stripper.

two nitrogen bubbling conditions, TOC falls faster than in the non-stripping cases. During the sulfate reducing cycle, acetic acid is produced as well as carbonates, as is shown in Equations (3) to (5). So when nitrogen bubbling is present, a certain amount of the organic compounds, especially the acetic acid produced, are stripped out causing faster decrease in TOC, as shown in Fig. 3(A). However, this decrease is not enough to be a limiting factor for the consumption of the remaining sulfate if the COD/sulfate remaining ratio is considered. On the other hand, the inorganic carbon that should be produced during the cycle also decreases when nitrogen bubbling is present (see Fig. 3(B)). This effect is a combination of CO₂ stripping and inhibition of the sulfate reducing process, which generates in turn a lower amount of CO₂. The main cause is probably the inhibition, because of the pH conditions prevailing in the system.

Therefore, it is possible that the pH increase observed in Fig. 2 is the inhibitory factor reducing the process efficiency in such cases. However, the resultant pH range of these sulfide stripping experiments is still within a range reported as safe for the efficiency of the sulfate reducing process^{10,16} and could not be the cause or the only cause of the process inhibition. Another possible

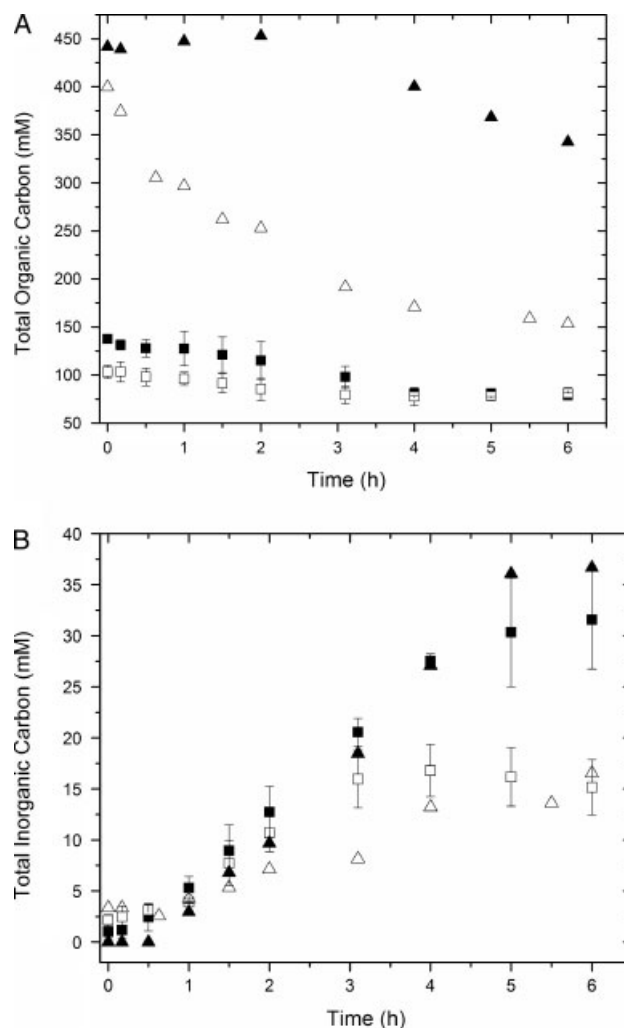


Figure 3. Total organic carbon (TOC) (A) and total inorganic carbon (B) evolution during a sulfate reducing cycle operated under four different conditions: with a fed COD/SO₄²⁻ ratio of 2 (■) and 6 (▲) without using (□) and using (△) nitrogen as sulfide stripper.

inhibitory factor could be the reducing environment imposed by the nitrogen bubbling used for sulfide stripping. Figure 2(B) shows that the ORP range for the runs with no sulfide stripping is between -125 mV to -225 mV, whereas for the sulfide stripping runs the range of ORP values is from -150 mV to -325 mV and is continuously decreasing even when the presence of sulfide under those conditions is almost eliminated. There is evidence of the sensitivity of sulfate reducing systems to change their stability according to the ORP levels present in the environment^{17,18} where the range -150 to -250 mV is reported to be the optimum for sulfate reducing bacteria. Some of the ORP values obtained in the sulfide stripping experiments are far below -250 mV, which suggests that inhibition had been carried out by the redox environment.

These findings suggest that further investigations should be carried out to distinguish between a possible sulfate reducing pH and/or ORP inhibitory effect in the system, for cases when a reducing environment is imposed without sulfide presence. Nevertheless, results indicate that the model could work with only one of the two originally proposed inhibitory terms, neglecting the inhibition term due to sulfide concentration and maintaining

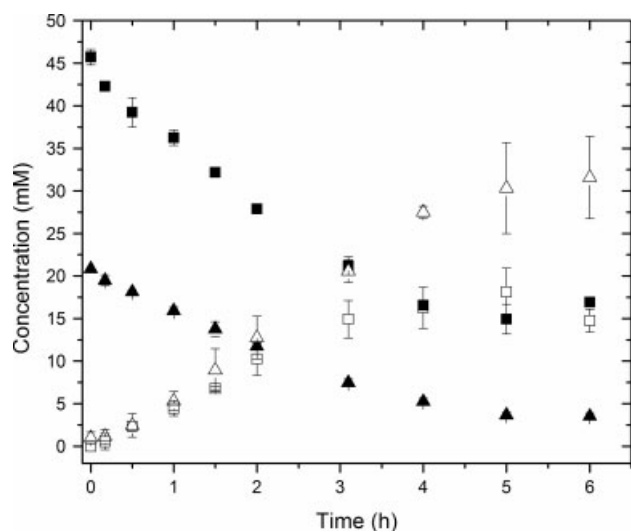


Figure 4. Average concentrations for the normal operating cycle of the sulfate reducing SBR at a fed COD/sulfate ratio of 2; lactate (■), sulfate (▲), acetate (□) and total inorganic carbon (TIC) (△).

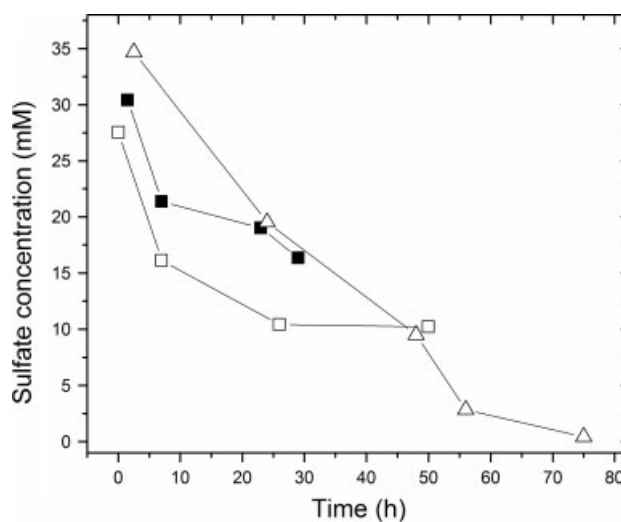


Figure 5. Sulfate consumption response profile of the sulfate reducing biomass of an SBR fed with a molar lactate/ SO_4^{2-} ratio of 1.77 (■), 2 (□), and 2.4 (△).

a pH inhibition term. The possibility of adding an ORP term to the model is not a clear option, since the anaerobic sulfate reducing process would not work with a nitrogen bubbling system under normal operating conditions. However, some correlation between ORP and sulfide concentration has been found, as can be seen in Figs 1(B) and 2(B), where a considerable rise in sulfide concentration leads to detectable changes in ORP. The sulfide presence in the reactor yields a moderate negative ORP signal while the much more reductive environment imposed by nitrogen bubbling induces a more negative ORP. The significant fact is that the ORP signal is detectably affected by the sulfide concentration changes between experiments with a fed COD/sulfate ratio of 2 and 6, where sulfide variations are present. The sensitivity of ORP to changes in sulfide concentration can be used as a tool to control the sulfate reducing process. Nevertheless, further ORP/sulfide concentration correlations are needed to consider use of these variables for control or process modeling.

From the experimental results it is possible to conclude that there is a predominance of the acetate producing reaction described by equation (3) over the complete mineralizing reaction (Equation (5)). This was deduced by calculating the consumption lactate/sulfate molar ratio. If the first reaction (Equation (3)) was the only one that had occurred, the consumed lactate/sulfate ratio should have a value close to 2, which is the stoichiometric consumption ratio value. In contrast, if Equation (5) was the predominant reaction, the consumption lactate/sulfate ratio should then be 0.67. In this study, a mean ratio of 1.83 ± 0.20 was found, indicating that reaction (3) for this system is more significant than reaction (5). This fact is supported by the continuous acetate accumulation found in the system and the total inorganic carbon produced (see Fig. 4), which is $33.6 \pm 3.1 \text{ mmol L}^{-1}$ as an average for both COD/sulfate ratio conditions (6 and 2). This value is very close to the average lactate consumed in the same experiments ($28.7 \pm 2.0 \text{ mmol L}^{-1}$), and which is in accordance with reaction (3). These consumption trends are not modified with pH changes, which suggests that this ratio is constant for both normal and inhibited conditions. On the other hand, despite the results, uncertainty gives a small margin for the occurrence of the acetate utilizing reaction (Equation (4)), but the evidence of accumulation

of this compound implies a much less important occurrence with respect to reaction (3). The poor capability of a sulfate reducing process to achieve a significant acetotrophic reaction has been reported.¹⁹ These findings made it possible to simplify the model described in the introduction by considering just one sulfate reducing reaction occurring in a significant amount, and thus obtaining the approximate sulfate reducing kinetic parameters for sulfate and lactate as main carbon substrate.

The predominance of a lactate partial oxidation phenomenon has already been observed even in systems that have been capable of achieving sulfate reducing processes with a fed COD/sulfate of 0.67, which reported non-complete sulfate reduction under these feed conditions.^{10,16} Fig. 5 shows the sulfate reducing response of the biomass utilized for the present process in the decreasing-time cycles stage before the 8 h efficiency was reached. It can be seen that the fed lactate/sulfate molar ratio has a direct impact on the process efficiency, and the value required to achieve complete sulfate reduction is close to 2.4 for this biomass system. This finding was consistent with the observed results for the COD/sulfate consumption ratio, and its relation with the main lactate oxidation reaction for the acclimated system.

It has been reported that this phenomenon is present due to possible competition from methanogenic bacteria for the acetate produced in such systems;¹⁶ however, if a methanogenic process was present in this system, there is considerable acetate accumulation and a good sulfate reducing efficiency, so that it would not be significant for the purpose of modeling this sulfate reducing system.

Considering all the results, which allow simplification of the model to one sulfate reducing reaction (Equation (3)) with only one inhibition term, the sulfate mass balance equation can be written as follows:

$$\frac{d[\text{SO}_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{\max}[\text{B}]}{Y} \left(\frac{[\text{SO}_4^{2-}]}{K_{\text{SO}_4} + [\text{SO}_4^{2-}]} \right) \left(\frac{[\text{L}^-]}{K_{\text{S}} + [\text{L}^-]} \right) f_1(\text{pH}) \quad (7)$$

Equation (7) contains only one inhibition term (pH) and two affinity Monod terms for sulfate and lactate presence as both can be considered necessary substrates for the process. Other mass

Table 1. Values for the kinetic constants from two model fittings for the results of the sulfate reducing process in a cycle with a fed COD/SO₄²⁻ ratio of 6

	Zero-order model	Monod model
K_{SO_4} (mmol L ⁻¹)	NA	0.038 ± 0.322
$\mu_{max}B/Y$ (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	3.71 ± 0.13	3.74 ± 0.17
r^2	0.99273	0.99274
NA: not applicable.		

balance equations for the remaining main species involved in the process can be written in the same manner considering the molar stoichiometric relations imposed by Equation (3).

Using the data for sulfate consumption as a function of time it was possible to determine some kinetic parameters involved in Equation (7). The results of the experiment with a fed COD/sulfate ratio of 6 without sulfide stripping were used to determine the kinetics with respect to the sulfate. This was possible considering that for these data the pH inhibitory term could be neglected because there was no evidence of inhibition. Also the lactate affinity term (the third factor in equation (7)) can be discarded because its value is close to one, since under such conditions, lactate would be in excess amount with respect to sulfate. In other words, lactate concentration was always greater than its affinity constant value (K_S). It was then found that the sulfate kinetics could be well described as a zero-order kinetics, which implies that K_{SO_4} is very small with respect to the standard sulfate concentration, and the second term in Equation (7) can also be neglected (made equal to one). Table 1 reports the constants found for the data fitting process. It can be seen that although a Monod model is feasible to describe the influence of sulfate concentration in the process, it is also true that the sulfate term in Equation (7) could be considered a zero-order term, because the K_{SO_4} obtained is very small in comparison with the concentrations managed in the process (from 20 to 1 mmol L⁻¹ of sulfate against its value of 0.038 ± 0.322 mmol L⁻¹). The difference between the $\mu_{max}B/Y$ found with one or another model falls within the range of uncertainty of both model adjustments.

The same data were utilized to find the maximum specific rate of sulfate consumption (μ_{max}/Y), which was 2.17 ± 0.08 mg mg⁻¹ VSS min⁻¹. Given the result of sulfate zero-order kinetics, Equation (7) would contain only one affinity term regarding the lactate and the pH inhibitory term:

$$\frac{d[SO_4^{2-}]}{dt} = -\frac{\mu_{max}[B]}{Y} \frac{[L^-]}{K_S + [L^-]} f_1(pH) \quad (8)$$

The sulfate results with a fed COD/sulfate ratio of 2 without stripping were used to determine the kinetics with respect to the lactate, yielding an affinity constant K_S of 1.603 ± 0.729 mmol L⁻¹, which can be expressed also as 142.7 ± 64.9 mg L⁻¹. So, due to the predominance of reaction (3), it was possible to obtain the main kinetic parameters to model the sulfate reducing process in this system by establishing simplifications based on the experiments performed. It is noticeable that the Monod constant for the lactate results, even if greater than the one for the sulfate, is much lower than the lactate concentrations managed. Nevertheless, the inclusion of the constant in the model is necessary due to the observed influence of organic substrate concentrations on the

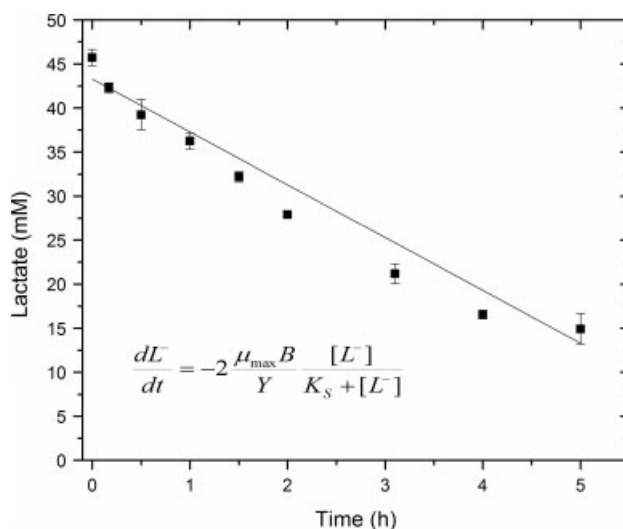


Figure 6. Lactate consumption response in time of the sulfate reducing SBR fed with a molar lactate/SO₄²⁻ ratio of 2 (■). The line corresponds to the model simulation of the lactate concentration using the kinetic parameters found according to the inset equation. It can be noticed that, given the sulfate limiting concentration, the lactate concentration finally remains constant for the experimental data.

sulfate reducing process efficiency, as pointed out by the different results obtained with different COD/sulfate ratios fed.

According to Fig. 2(A), the pH for the sulfate reducing process under normal operating conditions (without nitrogen bubbling) remains practically constant, only changing within a range of 0.3 pH units at most. Under acclimated stable conditions, it is possible then to consider Equation (8) without the pH inhibition term, and use such an equation for the modeling of the sulfate reducing system.

Figure 6 shows the lactate consumption for the process at normal operating conditions with a fed COD/sulfate ratio of 2. Using the kinetic parameters found, it was possible to simulate the lactate concentration behavior throughout the cycle as represented by the black line in Fig. 6. This modeling approach could be applied to other sulfate reducing systems utilizing lactate as carbon source if enough tests are run to find the specific rates of the system.

CONCLUSIONS

The final model for this sulfate reducing process is described by a single Monod term concerning the lactate. Model simplifications were made based on the lack of sulfide inhibition in the system, and the predominance of the partial lactate oxidation to acetate reaction over complete lactate and acetate oxidation.

The lack of sulfide inhibition under the managed sulfate loads, and the possible pH inhibition involved led to consideration of only one inhibitory term in the process modeling or none in the case that the system works on stable low pH variation cycles.

In this work nitrogen bubbling was used to carry out the sulfide stripping and a reductive environment was imposed in the sulfate reducing reactor with greatly negative ORP values that coincided with partial inhibition of the system.

This work has allowed a better understanding of the sulfate reducing process under batch operating conditions enabling the build and simplification of a model to describe the process. The model simplifications and its applicability for this system allow

integration in a bigger framework in order to develop a SBR simulator that can be used to establish a control path for the sulfate reducing/sulfide oxidizing process.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding of this research was provided through a PAPIIT grant (IN101707) from DGAPA-UNAM. Francisco J Torner acknowledges the scholarship provided by CEP-UNAM. Technical assistance and data collection by Jaime González Martínez, Gloria Moreno Rodríguez and Jaime Pérez Trevilla is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- 1 Fernández-Polanco M and García-Encina PA, Application of biological treatment systems for sulfate-rich wastewaters. in *Advanced Biological Treatment Process for Industrial Wastewaters*, ed by Cervantes FJ, Pavlostathis SG and van Haandel AC. IWA Publishing, London, pp. 213–236 (2006).
- 2 Buisman CJN, Ijspeert P, Hof A, Janssen AJH, Hagen RT and Lettinga G, Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur with oxygen. *Biotechnol Bioeng* **38**:813–820 (1991).
- 3 Van den Ende FP, Meier J and van Gernerden H, Syntrophic growth of sulfate reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiol Ecol* **23**:65–80 (1997).
- 4 Vavilin VA, Vasiliev BV, Rytov SV and Ponomarev AV, Self-oscillating coexistence of methanogens and sulphate-reducers under hydrogen sulphide inhibition and the pH-regulating effect. *Biores Technol* **49**:105–119 (1994).
- 5 Yamaguchi T, Harada H, Hisano T, Yamazaki S and Tseng IC, Process behavior of UASB reactor treating a wastewater containing high strength sulfate. *Water Res* **33**:3182–3190 (1999).
- 6 Kaksonen AH, Franzmann PD and Puhakka JA, Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. *Biotechnol Bioeng* **86**:332–343 (2004).
- 7 Kaksonen AH, Plumb JJ, Robertson WJ, Riekkola-Venhanen M, Franzmann PD and Puhakka JA, The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Hydromet* **83**:204–213 (2006).
- 8 Jong T and Parry DL, Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Water Res* **40**:2561–2571 (2006).
- 9 Janssen AJH, Ma SC, Lens P and Lettinga G, Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnol Bioeng* **53**:32–40 (1997).
- 10 Lens PNL, Visser A, Janssen AJH, Hulshoff Pol LW and Lettinga G, Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit Rev Environ Sci Technol* **28**:41–88 (1998).
- 11 Kalyuzhnyi S, Fedorovich V, Lens P, Hulshoff Pol L and Lettinga G, Mathematical modelling as a tool to study population dynamics between sulfate reducing and methanogenic bacteria. *Biodegradation* **9**:187–199 (1998).
- 12 Celis-García M, Ramírez F, Revah S, Razo-Flores E and Monroy O, Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: influence of microbial immobilization type. *Environ Technol* **25**:1265–1275 (2004).
- 13 Bayoumy MA, Bewtra JK, Ali HI and Biswas N, Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. *Water Air Soil Pollut* **112**:67–84 (1999).
- 14 Cord-Ruwisch R, A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**:33–36 (1985).
- 15 APHA-AWWA-WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st edn. American Public Health Association, Washington DC (2005).
- 16 Celis-García MLB, Razo-Flores E and Monroy O, Performance of a down-flow fluidized-bed reactor under sulfate reduction conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol Bioeng* **97**:771–779 (2007).
- 17 Postgate JR, *The Sulfate Reducing Bacteria*. Cambridge University Press (1984).
- 18 Jones BD and Ingle JD, Evaluation of redox indicators for determining sulfate reducing and dechlorinating conditions. *Water Res* **39**:4343–4354 (2005).
- 19 Nagpal S, Chuichulcherm S, Peeva L and Livingston A, Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng* **70**:370–380 (2000).