

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bacterias Sulfato-Reductoras.

Las Bacterias Sulfato-Reductoras (BSR) son microorganismos anaerobios obligados, metabólicamente versátiles provenientes de varias familias y diferentes géneros. Utilizan sulfato u otros compuestos oxidados de azufre como aceptor final de electrones (agente oxidante) para la producción de H₂S. Pueden crecer de forma heterotrófica usando moléculas orgánicas de bajo peso molecular y de manera autotrófica usando hidrógeno y dióxido de carbono (Nagpal *et al.*, 2000; Lens & Kuenen, 2001).

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

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

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

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

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

A pesar de que las consideraciones termodinámicas y cinéticas favorecen a las bacterias sulfato-reductoras en la competencia por los sustratos disponibles de la digestión anaerobia (Colleran *et al.*, 1995), en la práctica se ha observado que el resultado de la competencia puede ser afectado por diversos factores como la concentración de la materia orgánica y sulfato, la relación DQO/SO_4^{2-} , el tipo de sustrato, la presencia de metales traza y otros nutrientes, el tipo de inóculo, las propiedades de inmovilización, la duración del experimento, los factores ambientales como pH y temperatura, y la inhibición por sulfuros (Patidar & Tare, 2005).

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

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

Desde el punto de vista ambiental, la demanda química de oxígeno (DQO) es una medida aproximada del contenido total de materia orgánica presente en una muestra de agua

(Romero-Aguilar *et al.*, 2009). Algunas aguas residuales ricas en sulfatos como el DAM y otros efluentes industriales, son usualmente deficientes en materia orgánica.

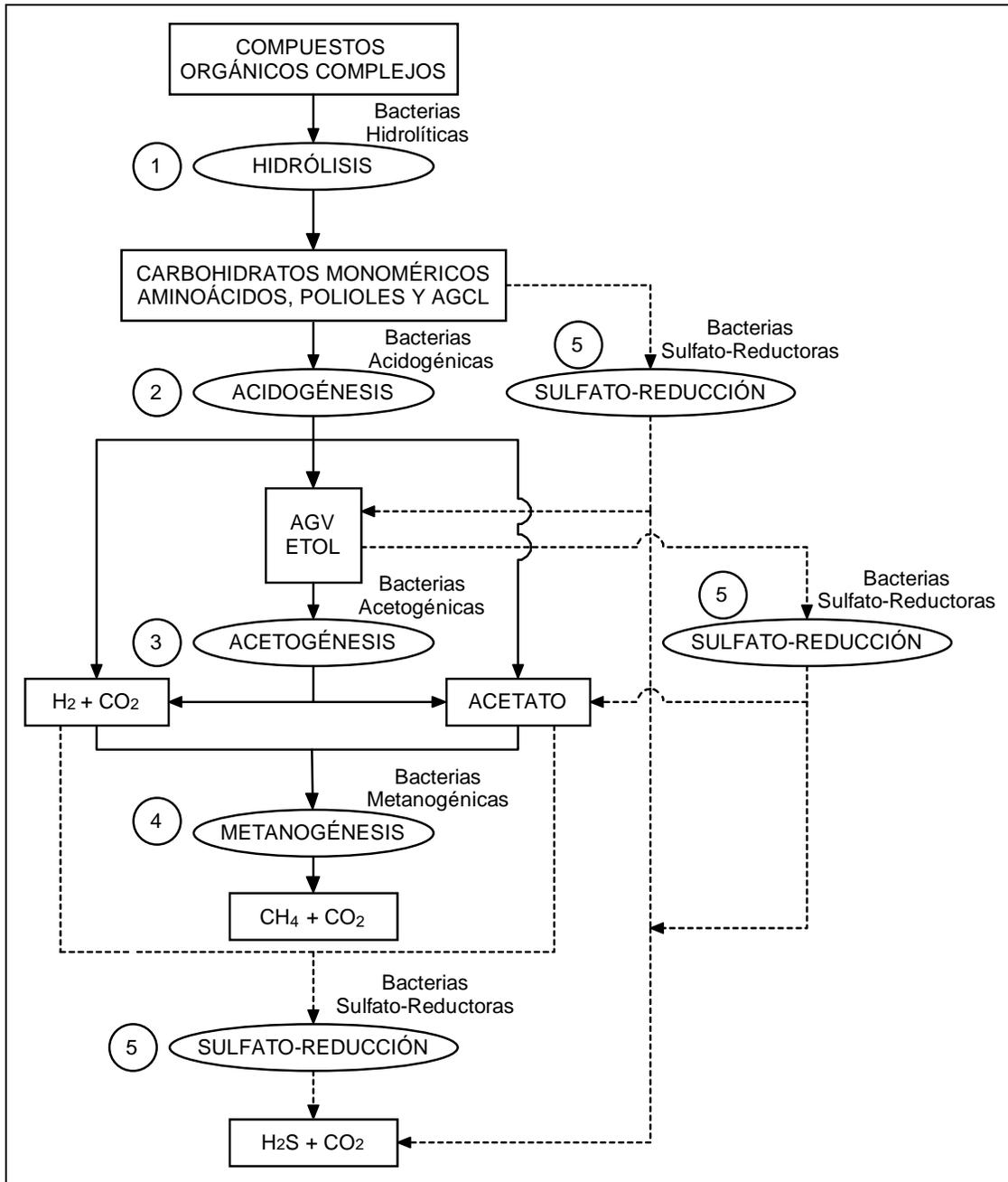


Figura 1. Degradación anaerobia en presencia de sulfato.

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

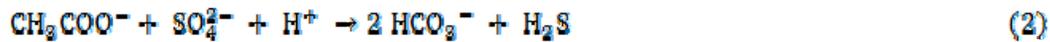
En tales casos es necesario adicionarla con la finalidad de conseguir la reducción completa del sulfato (Liamleam & Annachhatre, 2007). La mínima relación DQO/SO_4^{2-} requerida para conseguir teóricamente la remoción total del sulfato es de 0.67. Lo cual significa que la conversión de 1 gramo de SO_4^{2-} requiere de 0.67 gramos de DQO del compuesto orgánico presente en el agua a tratar (Choi & Rim, 1991).

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

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

Las reacciones estequiométricas de sulfato-reducción para la oxidación completa de etanol (CH_3CH_2OH) y acetato (CH_3COO^-) se muestran en las "Ec. (1) y (2)". Estas pueden ocurrir en un rango de pH de 6.3 a 7.0 (Drury, 1999):





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



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

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

Las ventajas más ampliamente mencionadas del proceso son la baja producción de lodos de sulfuro metálico, con volúmenes más compactos y con baja solubilidad comparado con la precipitación con hidróxidos. Además, de la recuperación de los metales con valor económico, de

los sulfuros metálicos precipitados (Kaksonen *et al.*, 2003). Por otro lado, recientemente se han implementado métodos para la recuperación selectiva de los metales implementando el control de pH y la concentración de sulfuro (Sampaio *et al.*, 2009).

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

El proceso para la remoción de iones metálicos se basa en la formación de sulfuros metálicos de baja solubilidad y la neutralización del agua debido a la alcalinidad producida en la oxidación microbiana de la fuente de carbono (Christensen *et al.*, 1996). Este método ha sido descrito como bioprecipitación (Diels *et al.*, 2001). El proceso puede representarse con las siguientes ecuaciones (Kaksonen & Puhakka, 2007):

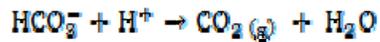
Producción de sulfuro y alcalinidad “Ec. (5)” en donde el metanaldehído (CH₂O) representa la fuente de carbono:



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



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



(7)

2.6. Precipitación Selectiva de los Metales.

La gran ventaja de la bioprecipitación es la posibilidad de la separación selectiva de los sulfuros metálicos. Estos sulfuros son altamente insolubles en pH neutros, mientras que algunos como el sulfuro de cobre (CuS), lo son en valores de pH de dos. Se ha demostrado que cada metal precipita a una concentración única de sulfuro o potencial S^{2-} (pS), la cual está directamente relacionada a la solubilidad del producto de sulfuro metálico. El control de estas concentraciones en un precipitador puede realizarse mediante electrodos de pH y electrodos selectivos de iones sulfuro (electrodo pS). La cualidad única del nivel de pS para cada metal, ha sido aplicada exitosamente como un parámetro de control para precipitar metales selectivamente y obtener sulfuros metálicos puros; los cuales tienen mejor oportunidad de reutilización. El éxito del proceso de precipitación no solo depende de la remoción del metal de la fase soluble, sino también de su separación de la fase líquida. Por consiguiente, los procesos de separación sólido-líquido como la sedimentación o la filtración son de importancia primordial en procesos eficientes de remoción de metales (Lens *et al.*, 2008).

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

Varios factores como la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$, el pH, la temperatura, las concentraciones de sulfuros y metales en los efluentes industriales como el DAM pueden afectar el crecimiento y la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. El efecto de estos se discute a continuación (Baskaran, 2005).

2.7.1. Relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$.

La relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ es un parámetro importante que define la existencia de la competencia entre los microorganismos sulfato-reductores y los metanogénicos. El grado de esta competencia

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

2.7.2. Efecto del pH.

El efecto del pH en la competencia de los grupos bacterianos está directamente relacionado con el rango óptimo de crecimiento. Para los sulfato-reductores se encuentra entre 6.0 y 9.0 (Zehnder *et al.*, 1982), mientras que para los metanogénicos entre 6.5 y 7.6 (Rittman & McCarty, 2001). Se ha reportado que en lodos granulares las bacterias sulfato-reductoras presentan mayores velocidades de crecimiento a pH superiores a 7.5 y las metanogénicas en pH menores a 7.0. También, se ha observado que al disminuir el pH de 8.0 a 7.0, la actividad metanogénica declina debido a la transformación del sulfuro en su forma no disociada (Visser *et al.*, 1996; O'Flaherty *et al.*, 1998).

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

sulfato-reducción el pH de las aguas es incrementado por la producción de alcalinidad, lo cual puede evitar la necesidad de utilización de biorreactores bajo condiciones ácidas. Por otro lado, en valores altos se ha tenido interés en pH de 8 (Bijmans, 2008).

2.7.3. Efecto de la Temperatura.

Otro factor ambiental importante en la competencia de las bacterias es la temperatura. Existen estudios que indican que las metanogénicas son más sensibles al incremento que las sulfato-reductoras (Rintala & Lettinga, 1992). Las bacterias sulfato-reductoras pueden encontrarse en ambientes con temperaturas extremas. Por tal razón, el proceso de sulfato-reducción puede llevarse a cabo bajo condiciones psicrófilas (0-25°C) y mesófilas (23-35°C), así como en termófilas (35-70°C) (Isaksen & Jørgensen, 1996; Liamleam & Annachhatre, 2007). Sin embargo, las condiciones óptimas de crecimiento se dan en un intervalo de temperatura entre 28 y 32°C (Hao *et al.*, 1996). La mayoría de los biorreactores sulfato-reductores operados hasta hoy son mesófilos, algunos han sido termófilos y muy pocos psicrófilos. Cada especie sulfato-reductora tiene una temperatura óptima y un rango óptimo de crecimiento, pero generalmente las velocidades de conversión y de crecimiento son más altas en temperaturas elevadas. No obstante, también pueden decaer bajo altas temperaturas. Obviamente, la energía requerida para enfriar o calentar un biorreactor contribuye al costo, especialmente para aguas diluidas. Por lo tanto, es sensato operar el reactor bajo temperaturas cercanas a la del agua residual a tratar (Bijmans, 2008).

2.7.4. Efecto del Sulfuro.

El tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato y metales pesados tales como los DAM y aguas residuales del procesamiento de minerales (Nagpal *et al.*, 2000), puede resultar afectado por la potencial toxicidad del sulfuro como producto final de la sulfato-reducción. El sulfuro de hidrógeno es un compuesto tóxico para casi cualquier bacteria (Rinzema y Lettinga, 1988). Su forma no disociada (H₂S) es la especie de sulfuro más tóxica debido a que es una molécula neutra que puede penetrar la membrana celular (González-Silva, 2007). El mecanismo exacto de la toxicidad no ha sido esclarecido. Una posible explicación es la desnaturalización de proteínas mediante la formación de puentes disulfuro entre las cadenas polipeptídicas. Otra teoría es la

interferencia en la ruta metabólica para la fijación de dióxido de carbono. Por otro lado, se piensa que el sulfuro puede afectar el pH interno de la célula. Si bien, las especulaciones anteriores pueden ser posibles, una forma de inhibición más probable puede suceder cuando el sulfuro secuestra el hierro u otros metales esenciales presentes en el medio ambiente o en las biomoléculas; causando que los sistemas de transporte de electrones se inactiven (Celis-García, 2004; Baskaran, 2005).

Los estudios realizados tanto en cultivos puros como en mixtos han demostrado que la inhibición por sulfuro es del tipo no competitivo y puede ser reversible (Okabe *et al.*, 1995; Kaksonen *et al.*, 2004). Se ha reportado que a valores de pH sobre 7.8, el grado de inhibición de las bacterias metanogénicas es más elevado que para las sulfato-reductoras. Sin embargo, por debajo de 7.0 no hay diferencia (Koster *et al.*, 1986). Por otra parte, se ha observado que factores como la biomasa utilizada también afectan el grado de inhibición. Por ejemplo, en especies metanogénicas se ha visto que la inhibición depende de las características de los lodos; siendo el lodo granular menos sensible que los lodos floculentos (Visser *et al.*, 1996).

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

2.7.5. Efecto de los Metales.

Se ha reportado que los metales son agentes inhibitorios o tóxicos para los microorganismos anaerobios, incluyendo las bacterias sulfato-reductoras (Karri *et al.*, 2006; Utgikar *et al.*, 2004). Esto se debe principalmente a que los metales cuentan con la capacidad de desactivar enzimas al reaccionar con grupos funcionales sulfhidrilo (-SH) y remplazan metales que son constituyentes y centros activos de enzimas tales como los cofactores Cu(II), Zn(II), Co(II), Ni(II); provocando impactos negativos sobre el crecimiento y la actividad bacteriana (Sani *et al.*, 2001).

En la literatura existen marcadas diferencias en cuanto a los niveles inhibitorios o de toxicidad de los metales sobre los microorganismos sulfato-reductores, ya que al igual que el caso del sulfuro, los experimentos se han llevado a cabo bajo diferentes condiciones (González-Silva, 2007). La toxicidad de los metales en el proceso de sulfato-reducción es atenuada por la formación de complejos insolubles con el sulfuro biogénico (Karri *et al.*, 2006), por lo que frecuentemente es necesario que el metal sobrepase significativamente las concentraciones de sulfuro para causar inhibición. La toxicidad del sulfuro también es disminuida al ser precipitado con la adición de metales como el hierro (Gupta *et al.*, 1994). Varios estudios de sulfato-reducción se han enfocado en la bioprecipitación de los iones metálicos en contacto directo con la biomasa contenida dentro de los reactores. Sin embargo, esta práctica puede resultar en la toxicidad para las bacterias (Chen *et al.*, 2000). Para reducir los efectos inhibitorios de los metales e incrementar el pH en reactores anaerobios, una parte del agua tratada puede ser reciclada y mezclada con el influente. Con esto, el sulfuro remanente en la recirculación reaccionará con los metales presentes precipitándolos antes de entrar en contacto con el lodo anaerobio (Glombitza, 2001). Para prevenir los efectos tóxicos de los metales en cultivos de bacterias sulfato-reductoras se pueden tomar medidas como buscar nuevas cepas de bacterias tolerantes a metales o empleando biorreactores con diseños especiales (Baskaran, 2005).

Otro problema, asociado con la precipitación de los metales dentro del reactor es que los sulfuros metálicos se depositan sobre la biomasa, de tal modo que hay un aumento de volumen por el sedimento contaminado con metales (Esposito *et al.*, 2006). Además, contrario

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

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

Aunque en las últimas dos décadas se ha llevado a cabo una investigación intensiva, no existe información suficiente para formular una guía práctica para dirigir la competencia entre los grupos bacterianos (Lens *et al.*, 1998). Para lograr aumentar la capacidad de sulfato-reducción de un lodo se ha evaluado la disminución gradual de la relación DQO/SO_4^{2-} hasta alcanzar la relación estequiométrica de 0.67 o inferiores (Celis-García, 2004), la adición de químicos como cloroformo para interrumpir la actividad metanogénica específica (Visser *et al.*, 1993b), la bioaumentación con cepas de bacterias sulfato-reductoras puras (Omil *et al.*, 1997c), la variación del pH (Omil *et al.*, 1996), el cambio de temperatura (Visser *et al.*, 1993c, Weijma *et al.*, 2000a), el tipo de sustrato con el que se alimenta el lodo (Omil *et al.*, 1998 y Visser *et al.*, 1993b) y el tipo de inóculo alimentado al reactor (Lens *et al.*, 1998). El resultado de todas estas estrategias fue que el tiempo requerido para transformar un lodo metanogénico en uno sulfato-reductor no fue menor a 100 días (Espinosa-Chávez, 2007).

Por otro lado, Omil *et al.* (1997d), mencionaron que la adaptación previa de la biomasa a altos niveles de sulfuro favorece a las bacterias metanogénicas en la competencia por el sustrato, retardando el aumento en la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. Lo cual puede ocurrir de la misma manera cuando la relación DQO/SO_4^{2-} es reducida gradualmente. A esto Celis-García (2004), añadió que la mejor estrategia para tener un reactor sulfato-reductor a partir de

un lodo metanogénico sería no alimentar el reactor con acetato y trabajar con relaciones cercanas a 0.67 desde el arranque del reactor.

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

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

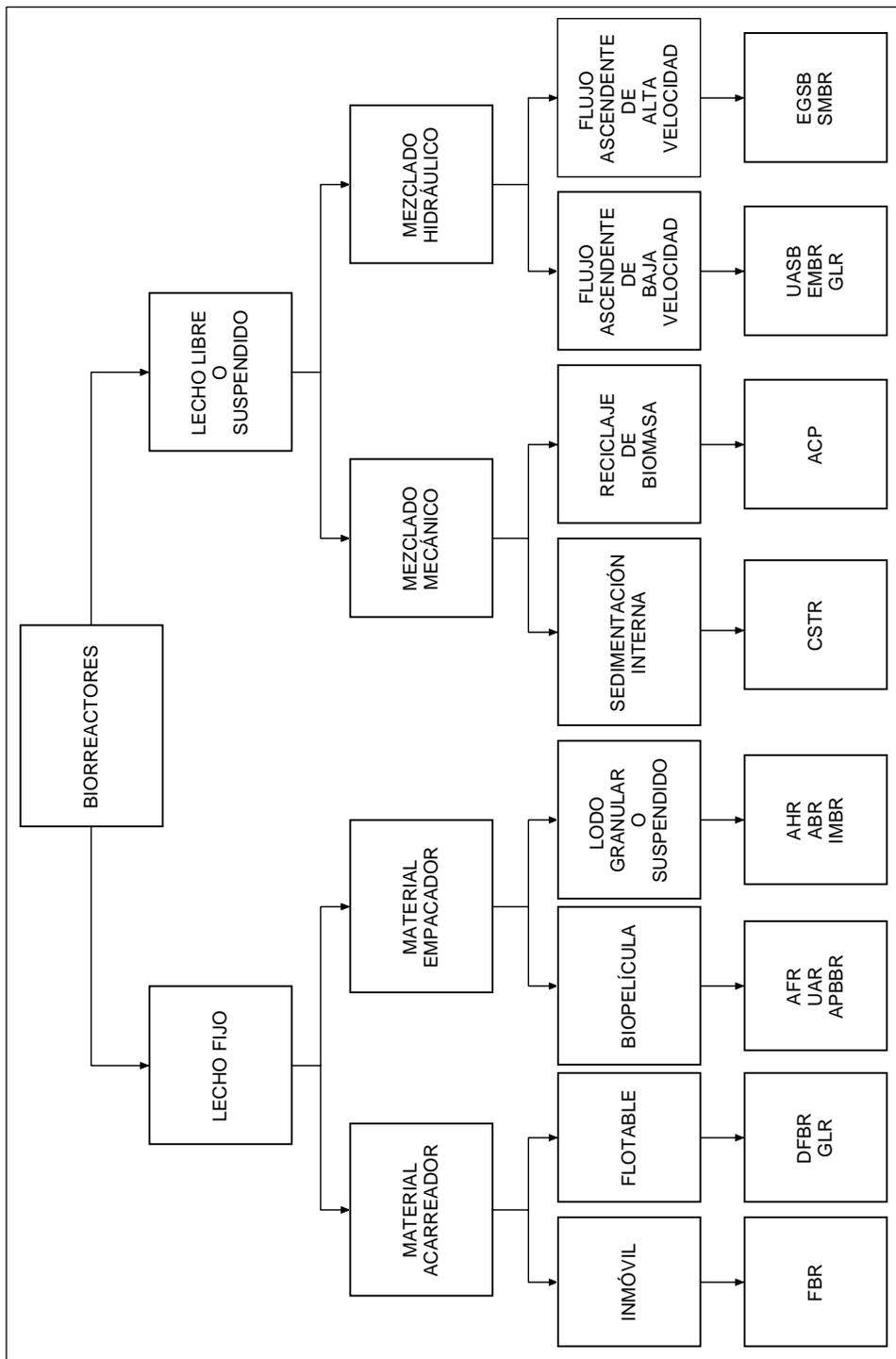


Figura 2. Reactores anaerobios utilizados en aplicaciones de sulfato-reducción.

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

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

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

2.9.1. Biorreactores de Alta Tasa.

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

Tabla 1. Desempeño de reactores sulfato-reductores en general, para tratamiento de efluentes que contienen metales.												
Referencia	Tipo de Reactor	Fuente de Carbono	Tipo de Efluente	Relación DQO/SO ₄ ²⁻	DQO (g/L)	SO ₄ ²⁻ (g/L)	S ²⁻ (mg/L)	Ión Metálico		Eficiencia de Remoción		
								Esp ^d	M ⁺ (%)	DQO (%)	M ²⁺ (%)	SO ₄ ²⁻ (%)
De Lima <i>et al.</i> (2001)	UASB	Aguas Negras	ARS ^a	1.5 2.2	0.12 0.17	0.08 0.14	≈24 ^c ≈33 ^c	Ni ²⁺	15.9 22.4	96 97	57 34	91 71
La <i>et al.</i> (2003)	AFR	Estiércol	DAMa ^b	>0.54	>0.97	1.52	≈482 ^c	Fe ²⁺ Al ³⁺ Cu ²⁺ Cd ²⁺ Mn ²⁺ Zn ²⁺	56.2 2.66 17.3 28.6 7.50 7.51	>98 >62 >94 >96 >94 >86	ND	>95
Kaksonen <i>et al.</i> (2004)	FBR	Etanol	ARS ^a	0.73	1.50	2.00	370	Zn ²⁺ Fe ²⁺	200 100	100 99.9	61	96
Kaksonen <i>et al.</i> (2006)	FBR	Etanol	ARS ^a	0.72	1.50	2.08	400	Zn ²⁺ Fe ²⁺	176 87	99.9 99.9	ND	57
Sierra-Alvarez <i>et al.</i> (2006)	UASB	Etanol	DAMa ^b	0.43	0.90	2.10	≈283 ^c	Cu ²⁺ Ni ²⁺ Zn ²⁺	100 15 15	100 99.5 99.6	86	40
Sahinkaya <i>et al.</i> (2007)	FBR	Etanol	ARS ^a	0.66 0.67	0.66 1.01	1.00 1.50	50 70	Fe ²⁺	40-60 40-90	100 100	50 71	35 60
Velasco <i>et al.</i> (2007)	UASB	Etanol	ARS ^a	0.67-2.5	1.0-3.7	1.5	145-470	Pb ²⁺	20- 200	>99	AA ^e	38-94

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

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

2.9.2. Reactor Anaerobio de Lodos Granulares Expandidos.

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

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

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

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

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

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

Las características anteriores hacen del EGSB una herramienta útil en el proceso de sulfato-reducción. Sin embargo, Omil y *col.*, (1996) mencionaron que la utilización del reactor EGSB para el tratamiento sulfidogénico de aguas residuales ricas en sulfato no es recomendable, ya que las altas velocidades ascensionales pueden afectar negativamente el desempeño del proceso por pérdida de biomasa y disminución de la eficiencia de remoción de DQO. Además, indicaron que las bacterias sulfato-reductoras tienen menor capacidad de adhesión a superficies que las metanogénicas, por lo que pueden ser selectivamente lavadas a altas velocidades ascensionales. En este contexto se propuso que la máxima velocidad ascensional para reducir el lavado selectivo de las bacterias sulfato-reductoras acetogénicas en reactores de lodos granulares es de aproximadamente 4.5 m/h.

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

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

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

^a volumen del reactor; ^b agua residual sintética; ^c influente; ^d efluente; ^e datos no disponibles; ^f dato calculado teóricamente.

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

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

^a volumen del reactor; ^b escala piloto; ^c Medio mineral; ^d Agua residual sintética; ^e influente; ^f efluente; ^g pH del medio mineral; ^h pH del agua residual sintética; ⁱ dato calculado teóricamente; ^j especie del ión metálico; ^k no aplicado; ^l dato no disponible.

