

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA



CASA ABIERTA AL TIEMPO

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

ELIMINACION BIOLÓGICA SIMULTANEA
DE NITRÓGENO, CARBONO Y AZUFRE,
POR DESNITRIFICACIÓN

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

ROMEO JESUS REYES AVILA

MEXICO D. F. DICIEMBRE 2000

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

**ELIMINACION BIOLÓGICA SIMULTANEA
DE NITROGENO, CARBONO Y AZUFRE,
POR DESNITRIFICACION**

Tesis presentada por

Romeo Jesús Reyes Avila

Ante el Jurado formado por:

Dr. Rodolfo Quintero Ramírez (Presidente)

Dr. Frederic Thalasso Siret (Secretario)

Dr. Jorge Gómez Hernández (Vocal)

Dr. Elías Razo Flores (Vocal)

Dr. Sergio Alcántara Pérez (Vocal)

México, D.F., 14 de Diciembre, 2000.

Agradecimientos.

Al Dr. Jorge Gómez Hernández, por la dirección de este trabajo. Por recibirme en el laboratorio bajo su responsabilidad y su insistencia en nutrirme con temas de fisiología microbiana y bioquímica.....seguro que no fue en vano.

Al Dr. Elias Razo Flores, del Instituto Mexicano del Petróleo, su colaboración en la dirección fue relevante para los logros alcanzados en este trabajo. Por orientarme en la definición del tema de tesis y su valioso apoyo durante la integración del documento final.

A la Coordinación del Programa de Biotecnología del Petróleo y a la Gerencia de Control Ambiental y Sustentabilidad, del Instituto Mexicano del Petróleo, las facilidades y el apoyo brindado para realizar éste trabajo, en el marco del Programa para la Formación y Desarrollo del Factor Humano.

A Flor, Jaime y Felipe, mis compañeros y guías en el laboratorio inscritos en el doctorado de Biotecnología.....Jaime, tu experiencia en la puesta en marcha del reactor y métodos de análisis disminuyó las dificultades con que pude encontrarme.

A la Maestra Carmen Fajardo Ortiz, del Laboratorio Analítico General del posgrado.

Al Dr. Sergio Alcántara, Marisol y Juan Antonio del grupo sulfo-oxidación de la UAM, así como al grupo del Dr. Razo Flores, que trabaja en el mismo tema, en el IMP. Al respecto, las críticas y comentarios al trabajo, por parte del Dr. Alcántara, fueron importantes para conocer más del tema.

*A mi esposa Uli,
Diego Sebastian y Daniel Philipp.*

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
Indice de figuras	iii
Indice de tablas	iv
1. INTRODUCCION	2
1.1. Panorama actual	2
1.2. Transformación biológica del nitrógeno y azufre.	3
1.3. Impacto ambiental del nitrógeno.	6
1.4. Eliminación de nitrógeno en aguas residuales	7
1.5. Nitrificación.	8
1.6. Desnitrificación.	10
1.7. Bioquímica de la desnitrificación.	11
1.8. Desnitrificación heterotrófica	14
1.9. Desnitrificación litoautotrófica	15
1.10. Impacto del sulfuro en el ambiente	16
1.11. Química del sulfuro y estados de oxidación	17
1.12. Eliminación de sulfuro	19
1.13. Bacterias del azufre asociadas a la desnitrificación	22
1.14. Eliminación de nitrógeno, carbono y sulfuro	24
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y METODOS	31
3.1. Características del Reactor	31

3.2. Inoculo	31
3.3. Reactor desnitrificante heterotrófico en estado estacionario	32
3.4. Comportamiento del proceso desnitrificante en presencia de sulfuro	33
3.5. Restablecimiento de la desnitrificación en heterotrofia. Oxidación de azufre elemental	34
3.6. Pruebas en lote. Influencia de las condiciones ambientales y del consorcio microbiano en la desnitrificación y sulfuro oxidación	35
3.7. Métodos de análisis	36
4. RESULTADOS Y DISCUSION	50
4.1. Estabilización del proceso desnitrificante	50
4.2. Comportamiento del proceso desnitrificante en presencia de sulfuro	53
4.3. Pruebas en lote Influencia de las condiciones ambientales y del consorcio microbiano en la desnitrificación y sulfuro oxidación	61
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
6. BIBLIOGRAFIA	81
ANEXO	

RESUMEN

ELIMINACION BIOLÓGICA SIMULTÁNEA DE NITRÓGENO, CARBONO Y AZUFRE, POR DESNITRIFICACION. Tesis de la maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa (2000). Reyes Avila R. Jesús.

Los efluentes acuosos de una refinería de petróleo representan un problema complejo debido a la presencia de diversos contaminantes entre ellos, de importancia por su impacto adverso en el ambiente, compuestos orgánicos, sulfuro y amonio. El agua residual contaminada debe de ser tratada para eliminar el carbono, nitrógeno y azufre (NCS), comúnmente por procesos de tratamiento en etapas. Entre estos, los procesos biológicos pueden llegar a ser una alternativa favorable. La nitrificación y desnitrificación son parte de una forma de eliminación vía biológica de compuestos nitrogenados. La desnitrificación se lleva a cabo en heterotrofia o litoautotrofia y en anaerobiosis, requiere de la presencia de nitrato como aceptor de electrones. En heterotrofia, el donador de electrones es una fuente orgánica y al mismo tiempo fuente de carbono. Un compuesto adecuado para la desnitrificación es el acetato, que se oxida hasta bióxido de carbono, en tanto que el nitrato es reducido y liberado del sistema en forma de nitrógeno molecular. En litoautotrofia, ésta comprobado que ciertos microorganismos son capaces de desnitrificar usando compuestos reducidos de azufre. Esta capacidad se ha estudiado con azufre elemental y en menor grado con sulfuro, en presencia de *Thiobacillus denitrificans* pero, prácticamente, en ausencia de materia orgánica.

El mecanismo de la desnitrificación en heterotrofia ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, poca información documentada existe de lo que sucede con la presencia simultánea de materia orgánica y sulfuro.

En este trabajo, utilizando un reactor anaerobio de tanque agitado con un volumen de trabajo de 1.3L, se evaluó la desnitrificación biológica para eliminar NCS en presencia de una biomasa desnitrificante de origen heterotrófico. El reactor, operando en heterotrofia a velocidad de carga de 290 mg C-CH₃COO/L.d, 203 mg N-NO₃/L.d, con una relación C/N_{esteq} de 1.4 y tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2d, fue conducido hacia el estado estacionario. Ahí, mantuvo un rendimiento desnitrificante (Y-N₂) de 0.93 con velocidad de producción de N₂ de 197.1 mg/L.d sin detectarse acumulación de intermediarios. La eficiencia de consumo de la fuente de carbono fue de 94 %. Bajo estas condiciones se alimentó sulfuro a diferentes velocidades de carga (44 a 295 mg S²⁻/L.d) hasta alcanzar una relación S/N_{esteq} de 1.43. La eliminación de sulfuro se presentó desde las primeras velocidades de cargas, oxidándose a azufre elemental y alcanzó eficiencias de casi 100%. Respecto a la desnitrificación, el valor de Y-N₂ disminuyó pero se mantuvo en 0.83 con una variación de 2.5%. En el efluente no se detectó NO₃⁻ o intermediarios, excepto una fracción de N₂O en el gas que representó el 3% del nitrógeno en la alimentación. Cálculos efectuados mostraron que el acetato fue la principal fuente reductora y es desplazado en un 33% por el sulfuro. Estos resultados muestran que los cambios de velocidad de carga de sulfuro no modificaron al proceso desnitrificante, pero sí a la eficiencia de consumo de acetato que disminuyó de 94 a 65%.

De experimentos en lote, se observó que el consumo de sustratos en el proceso desnitrificante tanto en heterotrofia como en litoautotrofia, depende de la actividad biológica de la biomasa. A condiciones ambientales y por vía química el proceso ocurre lentamente y de forma incompleta.

Asimismo, fue calculada la velocidad específica de consumo de nitrato y la actividad desnitrificante usando como fuente de energía, acetato, sulfuro y ambos. Los resultados mostraron que en presencia de sulfuro el proceso desnitrificante se llevó a cabo a una velocidad baja y con acumulación de intermediarios, no así cuando se utiliza al acetato.

En presencia de ambas fuentes de energía, la oxidación de sulfuro fue incompleta formando tiosulfato. Por el contrario, en el cultivo en continuo, bajo ninguno de los cambios en la alimentación se presentaron intermediarios de compuestos de azufre ni compuestos nitrogenados. Este trabajo aporta evidencias de que el proceso de desnitrificación en continuo puede ser una alternativa para llevar a cabo la eliminación simultánea de sulfuro, materia orgánica y nitrato.

ABSTRACT

SIMULTANEOUS BIOLOGICAL REMOVAL OF NITROGEN, CARBON AND SULFUR BY DENITRIFICATION. Masters Thesis in Biotechnology. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa (2000). Reyes Avila R. Jesús.

The wastewaters from a petroleum refinery represent a complex problem due to the presence of diverse polluting agents of importance by their adverse impact in the environment, among them organic compounds, sulfide and ammonium. The contaminated wastewaters must be treated to eliminate carbon, nitrogen and sulphur (NCS), commonly by processing in several steps. Between these, the biological processes like the nitrification and denitrification can be a feasible alternative. The denitrification can proceed under heterotrophic or litoautotrophic and anaerobic conditions, and requires nitrate as electron acceptor. Under heterotrophic conditions, generally, an organic compound acts as both electron donor and carbon source. Acetate is a good substrate for the denitrification, whereas nitrate is reduced and released from the system as molecular nitrogen. It is known that under litoautotrophic conditions, certain microorganisms are able to use reduced sulphur compounds as energy source for the denitrification process. This capacity has been observed in *Thiobacillus denitrificans* that its able to use elemental sulphur and sulfide, in minor degree, in absence of organic material.

The mechanism of heterotrophic denitrification has been widely studied. However, there is scarce information about the effect of the simultaneous presence of organic material and sulfide. In this work, using a continuous anaerobic stirred reactor (1.3 L), biological denitrification to eliminate NCS in presence of a heterotrophic biomass was evaluated. The reactor was operated under steady state conditions at loading rates of 290 mg C-CH₃COO/L·d, 203 mg N-NO₃/L·d, with a C/N stoichiometric ratio of 1.4 and a hydraulic retention time of 2 d. At these conditions, the carbon consumption efficiency was 94 % and the reactor maintained a denitrifying yield (Y-N₂) of 0.93 with N₂ production rate of 197.1 mg N/L·d, without accumulation of intermediates. Under these conditions, sulfide was fed at different loading rates (44 to 295 mg S²⁻/L·d) until reaching the S/N stoichiometric ratio of 1.43. At the first sulfide loading rate, the sulfide consumption efficiency was very low. However, as the S/N ratio was increased till the stoichiometric value, the sulfide oxidation efficiency reached almost 100%. In all the cases, sulfide was partially oxidized producing elemental sulfur that accumulates in the reactor. Regarding the denitrification in presence of sulfide, the value of Y-N₂ diminished to 0.83 with a variation of 2.5% and remained constant. N₂O was the only intermediate detected and represented 3% of nitrogen in the feeding. Mass balance calculations showed that acetate and no sulfide was the main electron donor (77 %) for nitrate reduction. These results indicated that the sulfide loading rates changes did not modify the denitrifying process, but it affected the efficiency of acetate consumption that was reduced from 94 to 65%.

According to batch experiments, it was observed that the consumption of substrates in the denitrifying process under heterotrophic and litoautotrophic conditions, depends on the biological activity of the biomass. Chemical oxidation proceeded slowly and was incomplete. Specific nitrate consumption rate was determined in systems supplied with either acetate, sulfide or acetate plus sulfide. Results indicated that the denitrifying process in presence of sulfide exhibited a lower rate and accumulation of intermediaries was detected when compared to the experiment with acetate. In the presence of both energy sources, the sulfide oxidation was incomplete forming thiosulfate. On the contrary, in the continuous reactor experiments, formation of sulfur and nitrogen compound intermediates was not detected at all under all the conditions tested. This work present evidences indicating that the denitrifying process can be an alternative to carry out the simultaneous elimination of sulfide, organic material and nitrate in one single step.

Indice de Figuras.

Figura		
1.2.1.	Etapas principales del ciclo del nitrógeno y algunos microorganismos asociados.	4
1.2.2.	Ciclo de oxidación-reducción del azufre y algunas especies de microorganismos que participan.	5
3.1.1.	Esquema del reactor anaerobio de tanque agitado y dispositivos, utilizado en el trabajo en continuo.	31
3.7.1.	Curva de calibración con concentraciones estándar de amonio.	37
3.7.2.	Respuesta (Área) para diferentes concentraciones de nitrito y nitrato.	39
3.7.3.	Respuesta del analizador de carbono orgánico, para concentraciones estándar de C-orgánico.	42
3.7.4.	Electroferograma de la electroforesis capilar de una muestra con los estándares que se indican en mezcla.	44
3.7.5.	Respuesta (Área) para diversas concentraciones de sulfato y tiosulfato. (Método análisis capilar de iones. Electrolito base cromato)	44
4.1.1.	Perfil de compuestos nitrogenados en el reactor desnitrificante. Velocidad de carga de N-NO_3 , velocidad de producción de N_2 y N-NO_3 en el efluente.	50
4.1.2.	Perfil de compuestos carbonados en el reactor desnitrificante. Velocidad de carga de $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$, C-CO_2 en el gas producido y $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$ efluente.	52
4.1.3.	Concentración de sólidos suspendidos volátiles dentro del reactor y en el efluente.	53
4.2.1.	Rendimiento desnitrificante, eficiencias de consumo de sulfuro y de $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$ a diferente velocidad de carga de sulfuro, C/N constante.	55
4.2.2.	Acumulación de sólidos totales y azufre elemental, en el reactor contra el incremento gradual de la velocidad de carga de sulfuro (Q-S^{2-}).	57
4.2.3.	Desnitrificación heterotrófica en lote. Con acetato como donador de electrones a relación C/N 1.4.	64
4.2.4.	Desnitrificación litoautotrófica en lote. Sulfuro como donador de electrones a relación S/N 1.43.	65

4.2.5.	Desnitrificación en lote en presencia de ambos donadores de electrones, acetato y sulfuro.	68
4.2.6.	Ruta de oxidación biológica de tiosulfato.	71

Índice de Tablas.

Tabla		
1.6.1.	Estados de oxidación del nitrógeno en diferentes compuestos.	11
1.11.1.	Estados de oxidación del azufre en diferentes compuestos.	19
3.3.1.	Composición del medio de cultivo en la alimentación	32
3.4.1.	Composición del medio de cultivo en la alimentación, (con sulfuro).	34
3.7.1.	Estimadores del área para diferentes concentraciones de nitrito y nitrato.	39
3.7.2.	Valores estadísticos de la respuesta (%vol) de N ₂ y CO ₂ .	41
3.7.3.	Estimadores del área para concentraciones estándar de carbono orgánico.	42
3.7.4.	Estimadores del área para diferentes concentraciones de tiosulfato y sulfato.	45
4.2.1.	Respuesta a la variación de carga de sulfuro	54
4.2.2.	Consumo de sulfuro y acetato en el proceso respiratorio de desnitrificación.	56
4.2.3.	Acumulación y consumo del azufre elemental en el reactor desnitrificante en continuo.	59
4.2.4.	Balance de masa de Azufre	60
4.2.5.	Efecto de la presencia de biomasa y de actividad química, en la desnitrificación, en presencia de: (A) acetato – nitrato; C/N 1.4, (B) sulfuro – nitrato; S/N 1.43.	62
4.3.1.	Velocidades específicas de consumo de substrato en la desnitrificación, usando diferente donador de electrones; A) con CH ₃ COO ⁻ , B) con S ²⁻ y c) En presencia de ambos. En todos los casos el aceptor de electrones fue el NO ₃ ⁻ .	73

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. Panorama actual

Nuestro país enfrenta graves problemas respecto al consumo y contaminación del agua y se manifiesta con la disminución acelerada de la disponibilidad en las zonas más pobladas y su creciente contaminación que plantea efectos adversos sobre mantos acuíferos, ecosistemas y salud pública. El desarrollo acelerado ha propiciado aumento en la extracción y consumo de agua que se traduce, consecuentemente, en una mayor generación de aguas residuales que al ser descargadas sin tratamiento a los cuerpos receptores perjudican sus usos legítimos y disminuyen su potencial de aprovechamiento.

Los escurrimientos a cuerpos de agua subterránea y superficiales varían en su calidad como resultado de los diversos usos: municipales, industriales, servicios y agrícola, principalmente. De acuerdo con cifras del Programa Hidráulico 1995-2000, las descargas de aguas residuales industriales por año son aproximadamente 2.05 km^3 , contra 7.3 km^3 de uso doméstico. Es decir las descargas domésticas son 3.6 veces las descargas industriales de aguas residuales del país (SEMARNAP, 1997).

La afectación del agua subterránea es, por lo general, resultado de actividades humanas, cuando se almacenan o son vertidos sobre terrenos de cultivo contaminantes sujetos a desplazarse en el suelo. El sector agrícola llega a verter en sus descargas el 46% del total de la carga orgánica. Sus principales contaminantes son residuos agroquímicos y restos de suelos erosionados. Le siguen en orden las descargas industriales, con una amplia gama de sustancias tóxicas, persistentes y bioacumulables; y las urbanas, con contenidos de materia orgánica y bacteriológica, principalmente (SEMARNAP, 1997). En algunos efluentes industriales es común encontrar sulfuro junto con materia orgánica y compuestos nitrogenados.

El nitrógeno es un nutriente importante que se adiciona al suelo para mejorar su fertilidad en forma de sales de amonio (NH_4^+) y de nitrato (NO_3^-). Cuando estas especies de nitrógeno alcanzan a los cuerpos de agua como ríos, lagos y lagunas son

causa de graves problemas. Un ejemplo de estos es la eutroficación, la cuál es reconocida como un grave daño ambiental, además de las características tóxicas asociados a ese tipo de compuestos para especies acuáticas y para la salud humana (Baker, 1998, Oenema, y Col. 1998).

1.2. Transformación biológica del nitrógeno y azufre.

1.2.1. Ciclo del nitrógeno.

En la naturaleza el nitrógeno se desplaza en varias formas, según su nivel dentro del ciclo. El nitrógeno es esencial para la vida en la tierra, es un componente de proteínas y ácidos nucleicos. Aunque su reserva en la atmósfera es abundante (78% en vol.) en la forma de nitrógeno molecular no es utilizable por la mayoría de microorganismos. Solo a través de una serie de transformaciones microbianas llega a ser disponible para las plantas, las que a su vez son sustento de toda vida animal. Las etapas que intervienen en la transformación del nitrógeno se clasifican como sigue, aunque no en el orden secuencial: Fijación de nitrógeno, asimilación, amonificación, nitrificación y desnitrificación, las cuáles se encuentran esquematizadas en la Figura 1.2.1 (Madigan y Col. 1998).

En la etapa de fijación del N_2 , una mayor proporción (90%) del nitrógeno molecular es convertida a compuestos de nitrógeno inorgánico, por ciertas bacterias y algas, principalmente. Una pequeña cantidad (10%) de nitrógeno libre es fijada por mecanismos abióticos como la luz solar y radiación ultravioleta.

El nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), resultantes de la fijación de N_2 , son asimilados como componentes específicos en los tejidos de algas y plantas mayores. Los animales que ingieren a estas plantas las incorporan entonces como componentes de su propio cuerpo. Los desechos de los animales, o bien cuando estos llegan a morir, entran en descomposición en presencia de ciertos microorganismos conduciendo así al proceso

de amonificación para producir NH_4^+ . Dependiendo de las condiciones del suelo el NH_4^+ puede ser liberado del suelo o convertido a otros compuestos de nitrógeno. La nitrificación es un proceso que lo llevan a cabo bacterias nitrificantes, transformando el NH_4^+ del suelo a NO_3^- al cuál las plantas incorporan en su tejido. El NO_3^- también es metabolizado por bacterias desnitrificantes, las cuales son especialmente activas en condiciones anaerobias. En el suelo la acción de estas bacterias tiende a disminuir el NO_3^- , formando nitrógeno molecular N_2 que es liberado a la atmósfera.

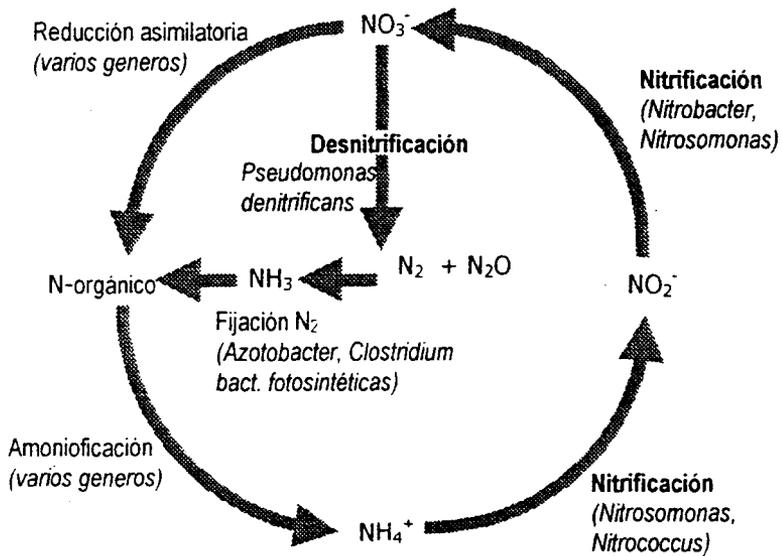


Figura 1.2.1. Etapas principales del ciclo del nitrógeno y algunos microorganismos asociados.

1.2.2. Ciclo del azufre.

Respecto al azufre, este compuesto se encuentra en la naturaleza en diferentes formas. Entre otras fuentes, se encuentra incluso en todos los organismos vivos ya que es un constituyente de ciertos aminoácidos y por lo tanto es importante su presencia en

proteínas. El azufre, a través de una serie de transformaciones biológicas, llega hasta la forma de sulfato (SO_4^{2-}) producto que es utilizado por las plantas. En la Figura 1.2.2, se representan los diferentes cambios que suceden. Casi todos ellos llegan a ocurrir tanto en aerobiosis así como en condiciones anaerobias.

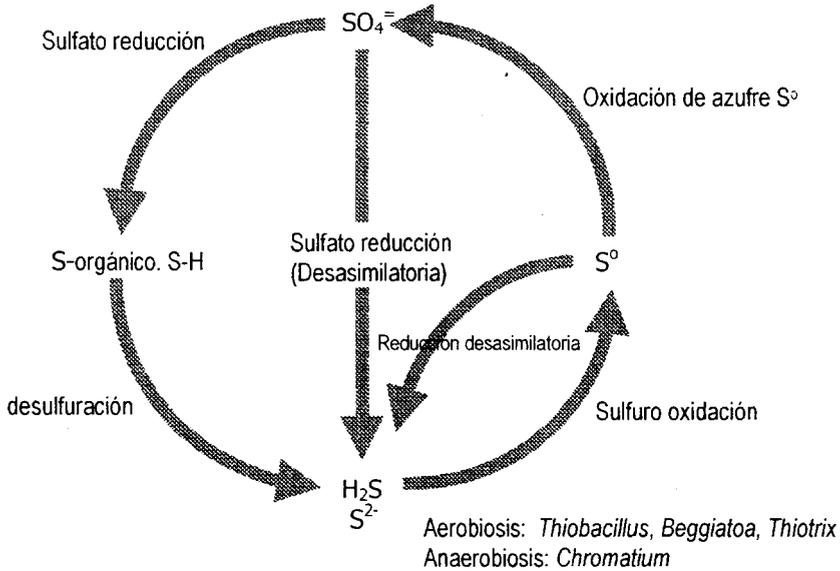


Figura 1.2.2. Ciclo de oxidoreducción del azufre y algunas especies de microorganismos que participan.

Por ejemplo, las proteínas con azufre (S-H) son degradadas hasta su aminoácido correspondiente por la actividad de diversos microorganismos del suelo. El azufre del aminoácido es convertido a sulfuro de hidrógeno (H_2S) por otra variedad de bacterias. En presencia de oxígeno, el H_2S es oxidado a azufre y después a SO_4^{2-} con la participación de las denominadas bacterias del azufre. Eventualmente el SO_4^{2-} , por actividad reductora de algunos microorganismos en anaerobiosis, llega a formar H_2S . Otras fuentes naturales de H_2S son pantanos, sedimento marino y ambientes anaerobios similares en donde las bacterias sulfato reductoras, a través de un proceso de respiración anaerobio, llegan a formar H_2S que es expulsado hacia la atmósfera. Pero

no sólo estos procesos naturales incorporan azufre al ciclo. Desde la revolución industrial, las actividades humanas contribuyen al movimiento de azufre de la litosfera hacia la atmósfera por el quemado de combustibles fósiles y por el procesamiento de metales con una emisión importante de dióxido de azufre. Estos compuestos contribuyen al fenómeno de la lluvia ácida que afecta especies acuáticas muy sensibles y al deterioro de monumentos y edificios.

Las transformaciones del azufre son complejas debido a la variedad de estados de oxidación que presenta y a que algunas de sus transformaciones ocurren en cantidad significativa, tanto de forma espontánea (química), como por procesos biológicos. Sin embargo es común encontrar que el ciclo de oxido-reducción del azufre hace referencia, por su importancia en la naturaleza, a únicamente tres estados de oxidación; -2 (sulfhidrilo, R-SH y sulfuro, HS⁻), 0 (azufre elemental, S⁰) y +6 (sulfato, SO₄²⁻) (Madigan y col. 1998). El sulfhidrilo es la forma del azufre asociado a compuestos orgánicos, en tanto que los otros son inorgánicos.

1.3. Impacto ambiental del nitrógeno.

Son escasas las descargas de aguas residuales que sin tratamiento podrían ser adecuadas para uso público, la mayoría deben de ser procesadas para mejorar su calidad al nivel requerido. En el procesamiento del agua, el tratamiento convencional para mejorar su calidad antes de descarga a los cuerpos receptores, incluye sistemas biológicos, que es una etapa importante y una forma eficiente de eliminar materia orgánica. A menudo se aplican tratamientos avanzados para remover cantidades adicionales de materia orgánica, fosfatos, compuestos nitrogenados y otros contaminantes que deterioran la calidad de los cuerpos de agua superficial y subterráneos (Haverhoek y col. 1997).

La normatividad nacional vigente, NOM-001-ECOL-96, establece como límite máximo permisible un valor del orden de 40 mg/L de nitrógeno total para las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores (SEMARNAP, 1997). En otros países (USA,

Dinamarca, Alemania, entre otros) el valor permitido es del orden de 5 mg/L, con tendencia a disminuir aún más dicho límite (Rushbrook y col. 1998).

La necesidad de eliminar compuestos nitrogenados es requerida sobre todo si el efluente es vertido a cuerpos de agua sujetos a eutroficación, es decir ricos en nutrientes que favorecen en el agua el desarrollo de plantas y crecimiento de algas microscópicas y convierten en inadecuada la calidad del agua para fines de recreación o suministro. El nitrógeno, en la forma de amoníaco (NH_3) o nitrito (NO_2^-), llega a oxidarse a nitrato (NO_3^-). Consume el oxígeno disuelto en el agua y llega a crear una deficiencia de este componente de importancia para la vida acuática (Ramalho, 1989).

La contaminación por nitrato de fuentes de agua subterránea, es de particular interés debido a los problemas de salud asociados por la presencia de ese compuesto en el agua de consumo humano. En este sentido cobran importancia las tecnologías para eliminar el nitrato y la preocupación por controlar su aporte a través de los vertidos de aguas residuales (Rushbrook y col. 1998).

1.4. Eliminación de nitrógeno en aguas residuales

Los procesos para eliminar nitrógeno incluyen, arrastre de amonio con vapor, intercambio iónico, procesos de precipitación, procesos biológicos como lodos activados, lagunas de estabilización, nitrificación – desnitrificación.

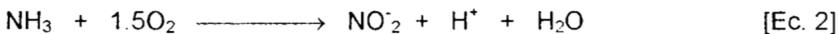
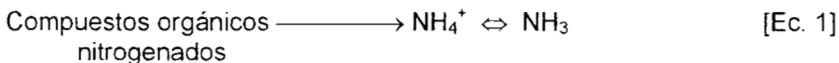
La nitrificación-desnitrificación implica básicamente estos dos procesos. La nitrificación que oxida el amonio hasta nitrato en un ambiente aerobio y litoautótrofo, y la desnitrificación, que reduce el nitrato hasta nitrógeno molecular, en anaerobiosis y heterotrofia. Asimismo, en años recientes ha sido estudiado el proceso Annamox cuyo mecanismo central es la oxidación anaerobia de amonio hasta N_2 (Van de Graaf y col. 1995). Para eliminar nitrato, en particular, las propuestas tecnológicas incluyen además de la desnitrificación, dos de tipo fisicoquímico: intercambio iónico y ósmosis inversa (Matejů y col. 1992).

Las de tipo físico actualmente pueden alcanzar eficiencias de eliminación altas pero esto implica también un alto costo, asociado a operación, mantenimiento y disposición final de los desechos. Asimismo, no representan una solución efectiva de eliminación de nitrato ya que solo se traslada el problema de un punto a otro.

El proceso de desnitrificación biológica, aunado a la alta selectividad para el nitrato, se sabe que puede alcanzar eficiencias de eliminación de nitrato cercanas al 100% y a un bajo costo en comparación a las dos anteriores y sí representa una solución al problema del nitrato, pues éste es transformado y liberado del proceso en forma de nitrógeno molecular N_2 (Matejů y col. 1992). La desnitrificación, como en el ciclo biológico, está asociado a la nitrificación de donde obtiene al nitrato. Ambos, constituyen una alternativa de eliminación biológica de nitrógeno de aguas residuales. Cada uno, se lleva a cabo por vías respiratorias diferentes y en las reacciones intervienen grupos de microorganismos con actividad particular de acuerdo a la vía (Madigan y col. 1998).

1.5. Nitrificación.

El amonio (NH_4^+) se incorpora a las aguas residuales como resultado de la digestión de proteínas o a la transformación de compuestos nitrogenados en los procesos industriales y de las mismas actividades domésticas [Ec. 1]. Bajo condiciones aerobias, las bacterias nitrificantes llevan a cabo la oxidación del amonio a nitrito [Ec. 2] y posteriormente a nitrato [Ec. 3].



Siendo la nitrificación un proceso biológico, los organismos que intervienen son las bacterias amonio oxidantes y bacterias nitro oxidantes. Las más conocidas son del género *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, respectivamente, de la familia *nitrobacteraceae*

(Bock y col. 1991). En la oxidación completa del amonio a nitrato se requiere de la acción cooperativa de los dos grupos de bacterias. Este tipo de bacterias es llamado litótrofas por su capacidad de obtener energía vía oxidación de compuestos inorgánicos como amonio (NH_4^+) o amoniaco (NH_3). otros microorganismos litotrofos lo hacen de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y fierro Fe^{2+} (Watson y col. 1989). Otra característica es que son autótrofos, esto es, que el grupo utiliza al CO_2 como fuente de carbono, fijándolo por la vía reductiva de Benson y Calvin (Bock y col. 1991). Entre los factores que afectan el crecimiento y la actividad de las bacterias amonio oxidantes se pueden mencionar al pH, concentración de NO_2^- , temperatura e incluso la intensidad de luz (Bock y col. 1991). Se ha encontrado que el intervalo mas adecuado de pH es de 7.5 a 8. En el caso de la temperatura, entre 25 a 30°C se ha observado un mejor crecimiento de bacterias amonio oxidantes. Cabe destacar que este grupo de bacterias son autótrofas estrictas, pero algunos géneros como *Nitrosomonas* presentan cierta tolerancia a la materia orgánica (Eilersen y col. 1994).

Las bacterias nitrito oxidantes son las responsables de llevar a cabo la etapa final de la nitrificación. Los géneros mas estudiados son: *Nitrosospira*, *Nitrospira* y *Nitrobacter*. A diferencia de las amonio oxidantes, las nitrito oxidantes, en general, son más tolerantes a la presencia de materia orgánica e incluso pueden presentar mixotrofia (Watson y col. 1989). En el genero *Nitrobacter*, se ha observado crecimiento en ambientes heterotróficos, el cuál es más lento que en condiciones de autotrofia (Bock y col. 1991). Para la nitrito oxidación los intervalos más adecuados son de temperatura 28 a 30°C y de pH 7.6 a 7.8. A nivel bioquímico, la nitrificación es un proceso respiratorio y durante el mismo se lleva a cabo la transferencia de electrones, estando implicadas varias enzimas y productos intermediarios. Una de ellas es la enzima monooxigenasa que participa en la oxidación de amonio a hidroxilamina (NH_2OH) utilizando oxígeno disuelto (Suzuki y col. 1974). Esta enzima se localiza en la membrana en *N. europaea* y también se ha encontrado en otras bacterias, como las metanótrofas, razón por la cuál estas bacterias pueden oxidar el amoniaco, pero

también utilizan otras fuentes alternas de energía. Incluso en la nitrificación, en presencia de ambos sustratos, suele presentarse inhibición competitiva (Gómez, 1994). Después de la amonio oxidación, se lleva a cabo la nitrito oxidación a través del complejo enzimático nitrito oxido reductasa. Entre los componentes que se han detectado en este complejo se encuentran los citocromos c y a1, la quinina y una deshidrogenasa. Cabe mencionar, que a partir de los géneros mas estudiados, una gran parte de los resultados obtenidos se han generalizado a las bacterias amonio oxidantes y nitrito oxidante. En general, la nitrificación es un proceso sensible y sus limitaciones son debidas principalmente a que la microflora nitrificante es inhibida por amonio, pH, temperatura, materia orgánica y bajas tensiones de oxígeno disuelto. (Eilersen y col. 1994; Hanaki y col. 1990; Anthonisen y col. 1976). Por lo que para alcanzar la eliminación de compuestos nitrogenados es necesario garantizar el adecuado funcionamiento de la etapa nitrificante.

1.6. Desnitrificación.

El proceso biológico de desnitrificación implica la reducción de nitrato (NO_3^-) a óxidos nitrogenados. El principal producto es el N_2 , pero pueden formarse óxido nítrico (NO) y oxido nitroso (N_2O).

La desnitrificación [Ec. 4] ocurre en condiciones anóxicas, en donde la materia orgánica es oxidada y el nitrato es utilizado como un aceptor de electrones, liberando N_2 .



En el proceso de respiración anóxica, como la desnitrificación, la oxidación de compuestos orgánicos implica un mecanismo de oxido reducción en donde como parte final de la cadena de transporte de electrones se tiene como aceptor de estos un compuesto inorgánico diferente al O_2 . El aceptor más favorable para las condiciones mencionadas es el NO_3^- , pero pueden también ser utilizados CO_2 o formas oxidadas de azufre (S^0 , SO_4^{2-}) (Halling y Jorgensen, 1993).

El mecanismo de reducción puede tomar dos vías.

- (1) Reducción asimilatoria, en donde el compuesto se reduce para ser usado como elemento nutricional para la célula y satisfacer sus requerimientos de C, N o S.
- (2) Reducción desasimilatoria, el compuesto se reduce como parte del metabolismo energético para la producción de energía. El producto reducido (N_2O , N_2 , H_2S) es normalmente liberado como gas.

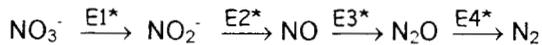
En los procesos de respiración anaerobia los compuestos oxidados de nitrógeno son muy comunes como aceptores de electrones. En la Tabla 1.6.1, se presenta un resumen de las diversas especies de nitrógeno inorgánico con sus estados de oxidación.

Tabla 1.6.1. Estados de oxidación del nitrógeno en diferentes compuestos.

Compuesto	Estado de oxidación
Nitrógeno orgánico ($R-NH_2$)	-3
Amoníaco (NH_3)	-3
Gas nitrógeno (N_2)	0
Oxido nitroso (N_2O)	+1
Oxido de nitrógeno (NO)	+2
Nitrito (NO_2^-)	+3
Nitrato (NO_3^-)	+5

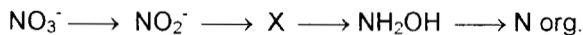
1.7. Bioquímica de la desnitrificación.

La desnitrificación es un proceso respiratorio desasimilatorio donde la reducción de nitrato y nitrito esta acoplada a la fosforilación por transporte de electrones e involucra varias reacciones. En la primera ocurre la conversión de nitrato a nitrito, en una segunda, se lleva al nitrito a través de dos intermediarios, oxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) hasta N_2 . En cada etapa de esta ruta interviene un sistema específico de enzimas (Halling y Jorgensen, 1993).

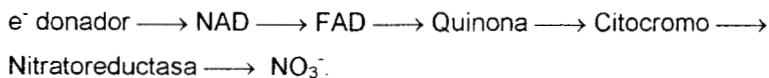


*. Enzimas. E1, nitrato reductasa; E2, nitrito reductasa; E3, nítrico reductasa, E4, nitroso reductasa.

Una vía alterna de la reducción del nitrato es la orientada al crecimiento, síntesis de células, conocida como asimilación.



En el proceso respiratorio desasimilatorio, la transferencia de electrones de la fuente de carbono (donador de electrón) al nitrato o nitrito (aceptor de electrón) para promover la formación de N₂ implica un sistema de transporte de electrones de los desnitrificadores orientado a la producción de energía para el uso en el crecimiento de los organismos. La posible ruta del transporte de electrones podría representarse como:



Las fases del donador de electrones al citocromo son siempre idénticas, en tanto que el último paso depende del aceptor final (nitrato ó nitrito) (Halling y Jorgesen, 1993).

Siendo la desnitrificación un proceso biológico, este puede ser llevado a cabo por una gama relativamente amplia de bacterias. Los géneros de bacterias que se conocen son: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Archromobacter*, *Thiobacillus*, *Bacillus* y *Alcaligenes*. Estas bacterias son muy diversas desde el punto de vista fisiológico y taxonómico. La mayoría son heterótrofas, algunas utilizan compuestos de un solo carbón, mientras que otras son autótrofas y llegan a desarrollarse con H₂ y CO₂ o con compuestos reducidos de azufre (Matejů y col. 1992). Al parecer la mayoría de las bacterias mencionadas podrían tener el conjunto de enzimas para reducir nitrato a nitrógeno molecular. Estos organismos son heterotróficos facultativos ya que pueden crecer en los tres tipos de

fuentes de energía utilizadas por los microorganismos: orgánica (organótrofos), inorgánica (litótrofos) y luz (fotótrofos), pero también se les clasifica como anaerobios facultativos por su capacidad de usar el oxígeno o nitrato como aceptor final de electrones. La desnitrificación ha sido mejor estudiada en las bacterias gram negativas del género *Parococcus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*. Las reacciones reductivas, al parecer, se desarrollan en la membrana plasmática y en el periplasma (Jetten y col. 1997). La enzima nitrato reductasa participa en la reducción de nitrato a nitrito. En *Parococcus denitrificans* se han encontrado dos tipos de esta enzima, una está integrada a la membrana, usa la ubiquinona como donador de electrones y su sitio activo se orienta al citoplasma, la otra es una enzima periplásmica cuyo donador de electrones es desconocido (Bell y col. 1990). Ambas enzimas contienen grupos de Fe-S y un átomo de molibdeno. Se desconoce el mecanismo de acción, pero se piensa que la reducción del nitrato se realiza en el centro molibdeno. En la reducción del nitrito a óxido nítrico, la siguiente etapa de la desnitrificación, participa la enzima nitrito reductasa, la cuál se encuentra en el periplasma. Muchas de ellas contienen cobre y otras contienen un hemo cd_1 , pero ambas son funcionalmente equivalentes (Glockner y col. 1993). En el siguiente paso, la reducción del óxido nítrico a óxido nitroso es realizada por la óxido nítrico reductasa. Esta se encuentra incluida en la membrana plasmática y es la menos caracterizada de la enzimas de la desnitrificación. En experimentos con *Thiospaera pantotropha*, la reducción de NO fue diez veces más rápida que la reducción de N_2O (Kroneck y col. 1992). Algunas bacterias carecen de la nítrico reductasa, por lo que el producto final es óxido nítrico. El último paso, es la reducción de óxido nitroso hasta nitrógeno molecular, por la acción de la óxido nitroso reductasa. Se han purificado varias de ellas que se encontraron en el periplasma de diferentes microorganismos, pero no se han podido cristalizar. Una de las dificultades principales es que la enzima es sensible al oxígeno (Otte, y col. 1996). La enzima purificada contiene cuatro átomos de cobre que se arreglan en dos centros dinucleares, uno de ellos serviría como sitio de entrada de electrones, mientras que el otro parece

ser el sitio de reducción del óxido nitroso. La fuente de electrones para este sistema son citocromos tipo *c* (Wang y col. 1995). La inhibición o represión de la N₂O reductasa puede ser la causa de que se acumule y libere óxido nitroso, durante la eliminación de nitrógeno, en el tratamiento de aguas residuales.

1.8. Desnitrificación heterotrófica.

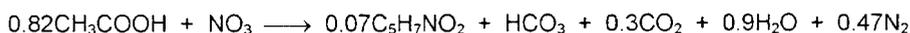
Los microorganismos, con capacidad desnitrificante en heterotrofia, son de importancia tanto por el número de géneros como por la dominancia de sus poblaciones en la naturaleza. Los substratos orgánicos son la fuente de energía más común para los desnitrificantes heterótrofos. Se tienen estudiadas una amplia variedad de microorganismos que pueden consumir ácidos grasos volátiles, metanol, glucosa, lactato, glicerol, propionato, aspartato, entre otros (Akunna y col. 1994; Fass y col. 1994; Bernet y col. 1995; Hendriksen y col. 1996).

En el proceso desnitrificante heterotrófico un factor importante que orienta el proceso es la relación carbono/nitrógeno (C/N) misma que va a depender del tipo de substrato, fuente de carbono orgánico disponible. El acetato parece ser el más adecuado, ya que se puede trabajar bajo diferentes condiciones de C/N, con grandes velocidades y altas eficiencias de eliminación de nitrato sin presentarse acumulación de intermediarios o la desviación a otras rutas metabólicas (Cuervo-López y col. 1999).

Cuando se suministra como ácido acético la relación estequiométrica sería:



Considerando la biomasa:



La disociación del ácido acético forma acetato, el cuál en presencia de una biomasa desnitrificante se oxida hasta dióxido de carbono, en tanto que el nitrato se reduce formando nitrógeno molecular. De este modo, mediante el proceso desnitrificante

además de presentar alta eficiencia de eliminación de nitrato también es posible eliminar materia orgánica al ser oxidada y transformada a gases como CO₂.

Algunos inconvenientes que podrían presentarse son: la reducción desasimilativa de NO₃⁻ a NH₃⁺, lo cuál suele ocurrir cuando se trabaja con relaciones de C/N demasiados altas, o en otras circunstancias puede presentarse acumulación de intermediarios como nitrito (NO₂⁻) u óxido nitroso (N₂O), sobre todo cuando existen desbalances en el medio, como la falta de Cu⁺⁺ (Cervantes y col. 1999).

1.9. Desnitrificación litoautotrófica.

Aunque el proceso heterotrófico ha sido el más estudiado, se ha reportado que algunos microorganismos desnitrificantes autótrofos son capaces de crecer usando compuestos reducidos de azufre como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono (Halling y Jorgesen, 1993). Algunas bacterias del género *Paraccocus*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, entre otras pueden llevar a cabo la desnitrificación autotrófica empleando hidrogeno o diferentes fuentes de azufre como S⁰, S²⁻, S₂O₃²⁻, S₄O₂²⁻ y SO₃²⁻. *Barrenstein y col. (1986)*, propusieron una relación estequiométrica, en donde el sulfuro en condiciones anaerobias sería oxidado hasta formar sulfato como producto final en presencia de NO₃, que es reducido a N₂, sin dejar en claro el papel de la fuente de carbono.



Se ha visto que la relación S/N influye en el desarrollo de la desnitrificación litoautotrófica. Cuando la S/N es baja, se presenta acumulación de nitrito ya que la reducción de nitrato a nitrógeno se encontraría limitada (Matejů y col. 1992), y no existe acumulación de nitrito cuando la S/N es alta. Por otra parte, el coeficiente de consumo de azufre por NO₃ reducido, dependerá también del compuesto de azufre presente, es decir si la fuente de energía es HS⁻, S₂O₃²⁻ ó S⁰. El hierro ferroso, puede ser usado para reducir al nitrato por ciertas especies como *Ferrobacillus* y *Leptothrix*, en condiciones de autotrofia (Acht nich y col. 1995). Esta forma de desnitrificación es de

interés en casos donde no es posible la aplicación de la desnitrificación heterotrófica debido a la disponibilidad baja de carbono orgánico, la cuál requeriría la adición de una fuente externa. La desnitrificación litoautotrófica estaría limitada a situaciones, donde se tienen concentraciones bajas de materia orgánica, tales como cuerpos de agua subterránea, agua superficial y en el tratamiento terciario de efluentes. Pero no sería adecuada para el tratamiento de aguas residuales, tanto de origen urbano y de algunos sectores industriales, que contienen concentraciones variables de materia orgánica.

1.10. Impacto del sulfuro en el ambiente.

El sulfuro se encuentra en el ambiente como resultado de procesos naturales pero también de los procesos industriales. La mayor parte del que se encuentra en la naturaleza en forma de H_2S ha sido producido biológicamente, por lo general bajo condiciones anaerobias. Las principales fuentes antropogénicas son resultado del procesamiento de materiales naturales que contienen azufre como carbón, gas y el petróleo, los cuáles son fuente de energía y materia prima de productos industriales.

El quemado de combustibles fósiles, limpieza de corrientes de hidrocarburos y el procesamiento de metales son una emisión importante de dióxido de azufre y el transporte de la litósfera hacia la atmósfera contribuyen al fenómeno de la lluvia ácida que llega a afectar especies acuáticas muy sensibles, pero también bosques y al deterioro de monumentos y edificios. El H_2S se oxida rápidamente en gases que disueltos por el agua llegan a tomar formas de ácido sulfuroso y sulfúrico (Chang, 1998).

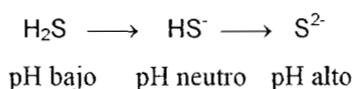
Compuestos reducidos del azufre llegan a encontrarse en las descargas de aguas residuales procedentes de fuentes diversas y en una variedad de formas. Una de ellas es el sulfuro, el cuál disuelto en el agua representa un problema ambiental debido a su toxicidad y, por otro lado, por los malos olores que provoca. El sulfuro cuando alcanza los cuerpos de agua superficiales puede causar una deficiencia de oxígeno, ya sea por la demanda de este para su oxidación biológica o por oxidación química espontánea en

ausencia de microorganismos adecuados (Lesley y col. 1992). Los efluentes deben prácticamente estar libres de sulfuro. Es común encontrar como límite para descargas valores menores que 1 mg/L.

Desde el punto de vista microbiológico, El HS^- puede ser tóxico para muchos microorganismos e inhibitorio para algunos otros. Su formación, llega a presentarse por la reducción del sulfato y puede combinarse con el hierro de los citocromos y con otros compuestos celulares esenciales que contienen hierro, inhibiendo la función de los mismos. Cuando se forma FeS que es insoluble el sedimento adquiere color negro y el ciclo puede continuar con la liberación de H_2S . Por diferentes razones, ambientales (control de olor), de salud (toxicidad), ecológicas (deficiencia de oxígeno en cuerpos de agua) y económicas (corrosión de equipo e infraestructura), las corrientes de agua residual conteniendo sulfuro deben de ser controladas y tratadas antes de ser descargadas al ambiente.

1.11. Química del sulfuro y estados de oxidación.

La forma en que el sulfuro está presente en un ambiente depende del pH del mismo. El sulfuro de hidrógeno es el principal gas volátil del azufre, su forma depende del pH en el ambiente, de acuerdo al siguiente equilibrio:



Así a pH alto, la forma dominante es el sulfuro, S^{2-} . A pH neutro, predomina el HS^- y por debajo de pH 6, la principal molécula es H_2S . El HS^- y el S^{2-} son muy hidrosolubles pero el H_2S no lo es e incluso a pH neutro llega a liberarse alguna cantidad de H_2S procedente de HS^- , ya que estas formas se encuentran en equilibrio (Madigan y col. 1998).

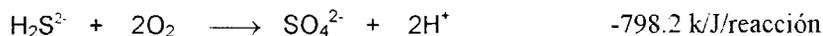
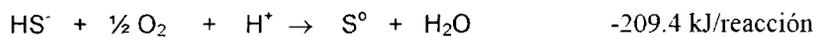
La especie de sulfuro S^{2-} , es la base conjugada del ácido débil H_2S . Tiene una constante de disociación básica (K_b) de 1×10^{-5} siendo una base fuerte, su hidrólisis en medio acuoso forma soluciones muy alcalinas (Chang, 1998).

En forma de $Na_2S \cdot 9H_2O$, la disolución en un medio mineral acuoso que tiene acetato incrementa el valor del pH 6.6 – 7.1 a 9.5-10.2, por lo que este cambio podría afectar al proceso desnitrificante. Aunque un valor de pH de 8.2 sería adecuado para trabajar con el sulfuro ya que a ese valor no existe la posibilidad de pérdidas por volatilización de H_2S , las especies de sulfuro predominante en solución serían HS^- y S^{2-} (Foroulis, 1993).

Cuando la sal de sulfuro se pone en contacto permanente con el aire se transforma lentamente a tiosulfato y con ácido se descompone formando H_2S o simplemente este puede producirse por la exposición permanente de los cristales al aire (Merck, 1996).

El mecanismo de oxido-reducción del sulfuro en condiciones aerobias se conoce mejor que en condiciones anóxicas. Se sabe que, independientemente, si el donador de electrones es H_2S , S^{2-} , S^0 , o tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), con todos ellos el producto final de la oxidación es el sulfato.

A pH neutro el HS^- se oxida rápidamente. Bacterias oxidadoras del azufre pueden catalizar la oxidación de este compuesto, la oxidación ocurre en dos fases teniendo como intermediario al azufre elemental. Las siguientes reacciones estequiométricas indican la oxidación del HS^- en aerobiosis.



Para algunas especies de azufre (Tabla 1.11.1) se indica el estado de oxidación en el que se encuentra el átomo de azufre correspondiente, siendo de importancia en la naturaleza $R-SH$ y H_2S , S^0 y SO_4^{2-} .

Tabla 1.11.1. Estados de oxidación del azufre en diferentes compuestos.

Compuesto	Estado de oxidación
S orgánico (R—SH)	-2
Sulfuro (H ₂ S)	-2
Azufre elemental (S ⁰)	0
Tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)	+2
Dióxido de azufre (SO ₂)	+4
Sulfito (SO ₃ ²⁻)	+4
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	+6

Dentro del ciclo del azufre, que abarca tanto el nivel óxico como anóxico, el sulfuro puede presentar las siguientes reacciones, tanto de forma espontánea o con la participación de microorganismos asociados al azufre.

- Oxidación biológica con O₂ o NO₃⁻: $S^{2-} \longrightarrow SO_4^{2-}$
- Reducción desasimilatoria de SO₄²⁻: \longleftarrow
- Oxidación espontánea: $S^{2-} \longrightarrow S^0$
- Oxidación biológica con O₂ o NO₃⁻: $S^{2-} \longrightarrow S^0 \longrightarrow SO_4^{2-}$
- Oxidación por bacterias fototróficas anaerobias: $S^{2-} \longrightarrow S^0 \longrightarrow SO_4^{2-}$

(Lesley, 1992)

1.12. Eliminación de sulfuro

1.12.1. Métodos Químicos

Para el tratamiento de corrientes contaminadas con sulfuro existe una gama de alternativas que van desde el simple arrastre con aire (para bajas concentraciones en agua subterránea) hasta complejas plantas con recuperación de azufre, utilizadas para

tratar grandes volúmenes por día en refinerías o en plantas de energía a base de carbón. Se conocen procesos químicos que implican oxidación, precipitación, absorción o una combinación de ellos o los de tipo físico: tales como adsorción, volatilización e incineración. En menor grado hay tratamientos biológicos como los biofiltros. La aplicación de uno u otro a menudo es definida por el tamaño y continuidad del tratamiento requerido, por la forma en que se encuentra el sulfuro, en gas o solución, por la concentración presente y la disposición final del residuo producido.

En los procesos para eliminar sulfuro de soluciones acuosas son de importancia las reacciones oxidativas (Steudel, 1996). De las corrientes de hidrocarburos y gases de combustión por ejemplo, el H_2S presente puede ser arrastrado por contacto con soluciones alcalinas formando sulfuro en solución. Existen diferentes procesos que difieren en el tipo de oxidante usado para transformar el sulfuro en azufre elemental: El proceso Stretford y el Sulfolin emplean vanadio (Hamond, 1986; The Stretford, 1994), en el proceso Lo-Cat se aplica hierro (III) (Heisel y col. 1987); con peróxido de hidrógeno, recomendada para la eliminación del olor en efluentes industriales con nivel de sulfuro entre 50 - 10.000 mg/L (US-Peroxide, 2000). Sin embargo muchos de estos procesos, como en otros casos, transfieren el problema a otra corriente de desechos o implican proceso complejos y costosos (Cadena y Peters, 1988). Los procesos mencionados son de costo alto, en particular cuando se trata de eliminar concentraciones bajas de compuestos sulfurados. En este sentido los procesos biológicos pueden llegar a ser una alternativa favorable.

1.12.2. Métodos Biológicos

En la última década se ha propuesto la eliminación de H_2S , principalmente de corrientes de gases, por métodos biológicos (Sublette y Sylvester, 1987). En la literatura se encuentran referencias de procesos que utilizan microorganismos del género *Thiobacillus* para la oxidación de H_2S . Entre ellos, *T. denitrificans* ha sido empleado para la oxidación de sulfuro (H_2S , HS^- , S^{2-}) a sulfato en el tratamiento de

aguas "amargas", efluente producido en procesos de purificación de gas combustible con alto contenido de sulfuro. Una cepa del microorganismo resistente al sulfuro fue coinmovilizada con CaCO_3 en alginato de calcio granular y puesta en contacto con el efluente a tratar bajo condiciones anaerobias en una columna de lecho empacado (Jensen y Webb, 1995). El CaCO_3 actúa además como un amortiguador que neutraliza el ácido, subproducto de la oxidación de sulfuro, transformándose a HCO_3^- y CO_2 para ser utilizado como fuente de carbono para crecimiento. En tanto que el calcio liberado internamente sirve para mantener los mecanismos de estabilización del propio soporte. La oxidación de H_2S por *T. denitrificans* también se ha utilizado para la eliminación de dióxido de azufre mediante su conversión a sulfato en un proceso biológico de dos etapas. En una primera etapa el SO_4^{2-} fue reducido a H_2S con *Desulfovibrio desulfuricans*. A continuación el H_2S fue arrastrado con gas nitrógeno (N_2) y enviado a una segunda etapa donde fue oxidado a SO_4^{2-} (Jensen y Webb, 1995).

Para la eliminación de azufre en efluentes acuosos se han venido haciendo intentos por medio de la sulfuro-oxidación y de la sulfato-reducción. El primero se lleva a cabo en condiciones de aerobiosis y litotrofia, y el segundo, en condiciones anóxicas y de heterotrofia, en donde el lactato puede ser una fuente de electrones. La sulfuro oxidación en presencia de oxígeno ha sido más estudiada que en condiciones anóxicas. Siguiendo la ruta general de oxidación-reducción, un compuesto de interés podría ser el azufre elemental (S^0), pero en general se ha visto que, dentro del ciclo, la ruta puede continuar hasta tener como producto final sulfato, en aerobiosis y anaerobiosis o bien sulfuro en condiciones anaerobias.

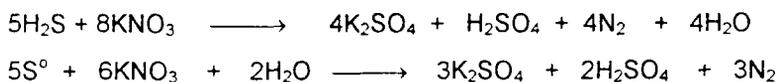
La desnitrificación litotrófica ha sido estudiada en años recientes haciendo énfasis en el uso de azufre elemental como donador de electrones, mientras que el NO_3^- se reduce a N_2 , con una relación C/N muy baja y prácticamente, en ausencia de materia orgánica por lo que el proceso es autotrófico (Koenig y col. 1996; Flere y col. 1998). En pocos trabajos se ha usado sulfuro (Xiushan, y col. 1993). En los estudios realizados con S^0 en presencia de microorganismos oxidantes, éstos conducen el proceso hasta la

formación de SO_4^{2-} y al parecer la producción de sulfato en condiciones aerobias, catalizada por bacterias no desnitrificantes, es más favorable que en condiciones anaerobias. La desnitrificación autotrófica estaría limitada a efluentes con muy baja concentración de materia orgánica. Para la mayoría de las aguas residuales que presentan materia orgánica en concentraciones moderadas el proceso autotrófico no sería una opción adecuada, pues se trata que los microorganismos eliminen la materia orgánica mediante el consumo del carbono ahí presente.

1.13. Bacterias del azufre asociadas a la desnitrificación

En el ámbito de la eliminación biológica de nitrato acoplada a la eliminación de materia orgánica y sulfuro, se presenta a continuación el resultado de la investigación bibliográfica en torno al papel de los microorganismos con actividad sulfo-oxidante en la desnitrificación y, en particular, de las denominadas bacterias incoloras del azufre.

Este género de microorganismos, por lo general, requieren de oxígeno y pocos son capaces de crecer anaeróbicamente usando NO_3^- como aceptor de electrones en un proceso desnitrificante. Las siguientes son reacciones estequiométricas que relacionan precisamente la reducción anaerobia de compuestos de nitrato, con la participación de bacterias incoloras del azufre, usando como fuente de energía compuestos reducidos de azufre:



La energía necesaria para llevar a cabo sus funciones puede ser obtenida de, uno o más compuestos reducidos de azufre incluyendo, sulfuro, azufre elemental, sulfito y politionatos. El sulfato es el principal producto final de la oxidación, aunque el azufre elemental, sulfito y politionatos pueden formarse transitoriamente en la mayoría de las especies. Algunos de los géneros de bacterias del azufre capaces de usar compuestos reducidos de azufre con crecimiento anaerobio y actividad desnitrificante son: *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiosphaera*. Otras bacterias con función similar a las

anteriores son las del género *Paraccocus*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (Lesley y col. 1992).

Como puede observarse, el uso de compuestos reducidos de azufre, como fuente de energía acoplado al uso de NO_3^- como aceptor de electrones, implica un tipo de desnitrificación autotrófica. Nelson y Castenholz (1981) mencionaron que algunas especies de *Beggiatoa* pueden llevar a cabo la reducción anaerobia del azufre almacenado intracelularmente, oxidando compuestos orgánicos, tal como el acetato en el papel de donador de electrones.

Dentro de la clasificación taxonómica de bacterias del azufre se encuentran las del tipo quimiolitótrofas facultativas que crecen usando una fuente de energía inorgánica y CO_2 ; y las del tipo heterótrofas que usan compuestos orgánicos complejos para obtener carbono y energía; o bien las de crecimiento mixotrófico cuyo crecimiento lo basan en el consumo de substratos inorgánicos y orgánicos, como puede ser tiosulfato y acetato.

Algunas especies como *Thiosphaera pantotropha*, *Paraccocus denitrificans* (Friedrich y col. 1981) y ciertas especies del género *Beggiatoa*, se les reconoce capacidad para crecer con mezclas de compuestos reducidos de azufre y substratos orgánicos. Sin embargo, para el caso de *Thiosphaera pantotropha* y *Paraccocus denitrificans*, en substratos combinados, no se ha encontrado respuesta de actividad desnitrificante, aunque a ambas especies en condiciones específicas se les reconoce actividad desnitrificante (Robertson y col. 1983).

Ciertas especies quimiolitótrofas estrictas de bacterias del azufre capaces de llevar a cabo la desnitrificación como *Thiobacillus denitrificans* y *Thiomicrospira denitrificans*, se ha visto que su crecimiento anaerobio y actividad desnitrificante es más eficiente que las especies facultativas, a excepción de *Thiosphaera pantotropha* que al parecer conserva su potencial sulfo-oxidante en condiciones de desnitrificación. Aunque su μ_{max} tiende a ser muy baja, de aproximadamente 0.015 h^{-1} comparada con la μ_{max} de *Thiobacillus denitrificans* y *Thiomicrospira denitrificans* que es del orden de 0.06 h^{-1} (Lesley y col. 1992). *Thiobacillus denitrificans* puede crecer tanto aeróbica

como anaerobicamente y utiliza a la desnitrificación para oxidar azufre o tiosulfato. Esta especie no puede realizar la reducción asimilativa de nitrato, por lo que debe de proporcionársele amoníaco como fuente de nitrógeno, incluso cuando crece con nitrato como aceptor terminal de electrones.

Se sabe que los microorganismos *Paraccocus denitrificans* y *Thiobacillus denitrificans* pueden desnitrificar empleando compuestos reducidos de azufre y tienen la particularidad de crecer en ambiente de heterotrofia, si una fuente de carbono orgánico está presente. Al respecto, grupos de trabajo están llevando a cabo estudios que contribuyan a un mayor conocimiento del papel que juega el microorganismo *T. denitrificans* en la desnitrificación heterotrófica y oxidación de sulfuro a sulfato.

Sobresale el cambio de metabolismo que podrían seguir algunas especies autótrofas facultativas de bacterias del azufre, las cuáles en condiciones de cultivo anaerobio pierden su capacidad sulfo-oxidante, pero aún son capaces de desnitrificar usando compuestos orgánicos, como es el caso de *Thiobacillus versutus* y *Paraccocus denitrificans* (Lesley y col. 1992).

1.14. Eliminación de nitrógeno, carbono y sulfuro

Por lo general, los trabajos relacionados con la desnitrificación han sido abordados en forma independiente, ya sea en heterotrofia o en autotrofia, principalmente. En el primero se ha demostrado su efectividad para eliminar materia orgánica y nitrógeno, y en autotrofia podría también alcanzarse altas eficiencias para eliminar el sulfuro. En ambos casos, la alta eficiencia alcanzada ha sido en presencia de un consorcio desnitrificante, obtenido de lodos acumulados en plantas de tratamiento de agua y posteriormente enriquecidos. Con cultivos puros y en condiciones litotróficas, se ha intentado en lote trabajar con la especie *Thiobacillus denitrificans*, calificado como quimiolitótrofo estricto de crecimiento anaerobio facultativo. Es probable que la diversidad de la población presente en la biomasa de lodos de plantas de tratamiento sea la razón de poder llevar a cabo el metabolismo de sustancias diferentes.

En los esquemas del tratamiento de aguas residuales, la secuencia de sus etapas puede variar. Así por ejemplo, de acuerdo con ciertos autores (Garuti y col. 1992; Xiushan y col. 1993), un efluente que contiene NH_3 , S^{2-} y materia orgánica, su depuración podría llevarse a cabo por medio de un proceso aerobio, seguido de un anaerobio incluida una fase anóxica. En la primera etapa, se asume que el amoníaco se oxida a nitrato (nitrificación) y el sulfuro a sulfato, en tanto que en la segunda se supone que el nitrato se reduce y la materia orgánica disuelta se oxida produciéndose N_2 , CO_2 y CH_4 , en consecuencia, el agua residual quedaría libre de materia orgánica. Es importante notar que el proceso global se realiza en condiciones de heterotrofia, dada la presencia de materia orgánica. No obstante, existe duda de que esto ocurra así al carecer de evidencias suficientes en cuanto a los parámetros de cada una de las fases indicadas, tomando en cuenta que en plantas de tratamiento se miden sólo algunos componentes como los sólidos volátiles, eventualmente amonio, demanda bioquímica de oxígeno y algunos gases, principalmente metano.

Existe escasa información documentada en cuanto a la eliminación de nitrógeno, carbón y sulfuro mediante el proceso desnitrificante, es decir a través de la reducción de nitrato y oxidación de sulfuro en condiciones anóxicas teniendo como productos finales N_2 , azufre y material oxidado.

En el tratamiento biológico de grandes volúmenes de aguas residuales suelen aplicarse diversos esquemas que combinan procesos aerobios, anaerobios y del tipo metanogénicos. De estos últimos sus efluentes pueden contener compuestos en la forma de ácidos grasos volátiles, amonio y sulfuro aunque también dependiendo de la actividad se les encuentra presentes en descargas industriales y municipales. Para su tratamiento, Mulder (1982) propuso un sistema de reactor desnitrificante y de sulfuro oxidación para el post-tratamiento de efluentes de reactores productores de metano y comprende la inclusión de una etapa desnitrificante, previo al tratamiento común de oxidación aerobia de los compuestos reducidos del efluente procedente del reactor metanogénico. De esta forma el sulfuro presente en el efluente podría ser usado como

donador de electrones en la desnitrificación. El remanente de los compuestos reducidos sería oxidado en la aireación. Así, de estar presente el amonio, este sería oxidado a nitrato sin interferencia del sulfuro que fue convertido a sulfato en la desnitrificación. El efluente del reactor metanogénico podría contener una concentración limitada de materia orgánica en forma de ácidos grasos de cadena corta, principalmente, que actuarían en la desnitrificación heterotrófica como donador de electrones y fuente de carbono.

El trabajo anterior condujo a un estudio en laboratorio con reactor desnitrificante de flujo ascendente y lecho fluidificado, alimentado con nitrato (NO_3^-), acetato (CH_3COO^-), y sulfuro (S^{2-}), bajo condiciones limitadas de estos dos últimos y en exceso el nitrato (Gommers y col. 1988). El producto final de la oxidación de S^{2-} fue SO_4^{2-} y en el efluente no detectaron azufre elemental (S^0), SO_3^- , polisulfuros ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) o tionatos mayores. Asociado a la biomasa encontraron acumulación de S^0 en una concentración de 0.026 mg S^0 /mg SV. Los balances llevados a cabo señalan que ocurren periodos de acumulación y posteriormente de consumo de S^0 e indica que este comportamiento no afectó la operación del reactor. Aunque el porcentaje de sulfuro convertido a S^0 fue muy bajo (0.3%) se concluye que este podría ser el único intermediario de la oxidación de sulfuro a sulfato.

La eficiencia desnitrificante estuvo basada en el consumo de nitrato y nitrito, sin considerar el producto final de la reducción, el nitrógeno molecular. Los resultados indican que en el efluente se presentó la acumulación de nitrito y nitrato residual, esto debido principalmente a la operación bajo condiciones limitadas de los donadores de electrones acetato y sulfuro.

En otro trabajo, durante la desnitrificación usando un consorcio metanogénico y en presencia de sulfuro, Percheron y col. (1998) registraron consumo de este compuesto y la presencia de partículas amarillas, lo que podría ser azufre elemental. Esto podría sugerir que los microorganismos ahí presentes, además de desnitrificar fueron también

capaces de usar al sulfuro como donador de electrones, sin tener en claro el papel que en este caso pasaría a desempeñar la materia orgánica.

Por lo anterior en este trabajo se propuso llevar a cabo, en un reactor controlado, el estudio sistemático de la oxidación anaerobia de sulfuro, acoplada a un proceso de desnitrificación heterotrófica, que elimine azufre, nitrógeno y carbón. Básicamente consiste en incorporar sulfuro en relación estequiométrica a un proceso desnitrificante en régimen estacionario para reducir nitrato a N_2 y de ser posible conducir la oxidación de sulfuro a SO_4^{2-} en condiciones anaerobias empleando un lodo desnitrificante fisiológicamente estable.

El sulfuro se sabe posee un importante potencial reductor por lo que su adición en el sistema junto con el acetato aumentaría la fuente de electrones con un limitado aceptor de electrones representado por el nitrato. Desde el punto de vista termodinámico, se esperaría el consumo de ambos reductores aunque posiblemente ocurra primero la oxidación del carbón orgánico y luego el sulfuro, por otra parte, se desconoce el papel que podría desempeñar la biomasa presente y su afinidad por el sustrato, puntos que serán abordados en este trabajo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar en el proceso desnitrificante en continuo, la eliminación simultánea de sulfuro y realizar un estudio fisiológico de su efecto a través del análisis de los intermediarios de la desnitrificación.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Estudiar y evaluar el efecto de la velocidad de carga de sulfuro en la eficiencia desnitrificante del sistema en régimen estacionario manteniendo invariable la relación C/N, con pH, agitación y temperatura constantes.
- 2.2.2. Evaluar la velocidad desnitrificante con un lodo fisiológicamente estable empleando sulfuro o acetato como fuente de energía, en cultivo en lote.

3. MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Características del reactor

Se utilizó un reactor (Applikon) anaerobio desnitrificante de tanque agitado de 1.5L, con bombas peristálticas para el control del flujo de alimentación, salida y ácido. El sistema integrado contó con dispositivos para el control de temperatura, de pH, mezclado homogéneo y un sistema para la recolección y medición de la velocidad de producción de gas. El gas fue recolectado por desplazamiento de solución salina saturada en una columna invertida (Figura 3.1.1). El sistema fue sometido a pruebas para comprobar la ausencia de fugas y asegurar las condiciones anaerobias dentro del reactor.

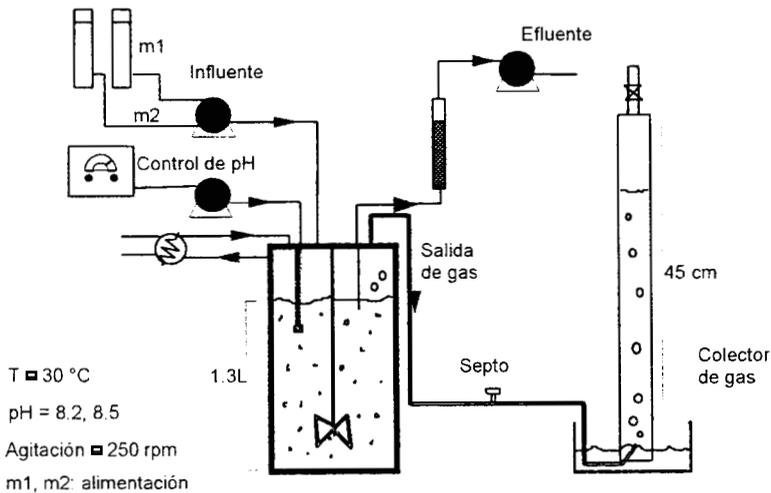


Figura 3.1.1. Esquema del reactor anaerobio de tanque agitado y dispositivos, utilizado en el trabajo en continuo.

3.2. Inóculo

El inóculo que se adicionó fue lodo metanogénico procedente de la planta de tratamiento de agua residual de la UAM – Iztapalapa. Antes de la inoculación, el lodo se lavó dos veces con una solución isotónica (0.9%) de cloruro de sodio para eliminar

el amonio presente (Pérez, 1998). La concentración de biomasa medida como sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el lodo después del lavado fue de 16.6 g SSV/L. En el reactor, a un volumen de trabajo de 1.3 L. se adicionó el 10% vol. de inóculo, para tener una concentración de aproximadamente 1.7 g SSV/L.

3.3. Reactor desnitrificante heterotrófico en estado estacionario.

3.3.1. Medio de cultivo.

Fueron dos los medios de cultivo que componen la alimentación heterotrófica. Se suministraron en forma separada para evitar problemas de precipitación. Uno contiene la fuente de carbono en forma de CH_3COONa , el otro contiene el aceptor de electrones (NO_3^-) adicionado como NaNO_3 , en las concentraciones que se indican en la Tabla 3.3.1, además de los nutrientes y microelementos necesarios. En la alimentación la relación carbono nitrógeno (C/N) fue de 1.7.

Tabla 3.3.1. Composición del medio de cultivo en la alimentación.

Medio 1: Fuente de carbono		Medio 2: Fuente de Nitrato	
CH_3COONa ($3\text{H}_2\text{O}$)	12.5 g/L	NaNO_3	7.6 g/L
CaCl_2 ($2\text{H}_2\text{O}$)	1.0	KH_2PO_4	1.5
Na_2MoO_4 ($2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	MgSO_4 ($7\text{H}_2\text{O}$)	0.8
CuSO_4 ($5\text{H}_2\text{O}$)	0.015	FeCl_3 ($6\text{H}_2\text{O}$)	0.01
		CuSO_4 ($5\text{H}_2\text{O}$)	0.015

El volumen de trabajo del reactor fue de 1.3 L. La alimentación, se llevó a cabo a una velocidad de 0.22 L/d. para cada medio de cultivo ($2 \times 0.22\text{L/d}$), con un valor para pH de 8.2 ± 0.2 . temperatura 30°C y agitación a 250 rpm. El tiempo de residencia hidráulico, en esta etapa de estabilización, fue de 3 d. Durante la operación del reactor fue medida la velocidad de producción de biogas y se dio seguimiento al comportamiento del proceso a través de la medición de compuestos nitrogenados y de carbono en la alimentación y efluentes del reactor. Conducir la operación del reactor

hasta alcanzar el régimen estacionario fue una condición previa al estudio del comportamiento del proceso desnitrificante en presencia de sulfuro.

3.4. Comportamiento del proceso desnitrificante en presencia de sulfuro

La evaluación de los cambios de velocidad de carga de sulfuro, se llevo a cabo en el reactor desnitrificante una vez que alcanzó condiciones de régimen estacionario. La velocidad de carga de acetato y de nitrato se mantuvieron fijas en: 209.4 mg N-NO₃/L-d y 303 mg C-CH₃COO /L-d. El sulfuro que se adicionó en la alimentación fue en forma de la sal Na₂S·9H₂O disuelta en el medio que contenía al acetato. La disolución de Na₂S·9H₂O en el medio con acetato incrementó el valor del pH de 6.6 – 7.1 a 9.5-10.2. Por otro lado la misma actividad desnitrificante en el reactor, por lo general, tiende a incrementar el valor de pH. Para evitar cambios importantes durante el estudio en presencia de sulfuro el pH en el reactor se controló a un valor de 8.5. A este valor, las especies predominantes de sulfuro son HS⁻ y S²⁻ (Foroulis, 1993).

La afinidad del sulfuro por ciertos metales formando complejos que precipitan, así como la posible formación de sulfato producto de la oxidación de sulfuro, fueron tomados en cuenta para introducir algunos cambios en la composición de la alimentación. La composición final de la alimentación se indica en la Tabla 3.4.1. En el caso del sulfato se ajustó la concentración del MgSO₄·H₂O de 0.8 g/L a 0.5 g/L. La disminución de Mg⁺⁺ fue compensada con la adición MgCl₂·6H₂O.

La concentración de Na₂S·9H₂O utilizada fue variable en función de las velocidades de carga de sulfuro a evaluar. Las velocidades de carga de sulfuro fueron establecidas con base a la ecuación estequiométrica [3.4.1], en donde la relación teórica azufre / nitrógeno (S/N) es de 1.43.



Se evaluaron cinco velocidades de carga; 42.2, 83.6, 167.1, 258.3, 294 mg S-S²⁻/L-d, la última corresponde a la relación S/N estequiométrica.

Tabla 3.4.1. Composición del medio de cultivo en la alimentación

Medio 1: Fuente de carbono		Medio 2: Fuente de Nitrato	
CH ₃ COONa (3H ₂ O)	6.9 g/L	NaNO ₃	4.49 g/L
Na ₂ S (9H ₂ O)	(a)	MgSO ₄ (7H ₂ O)	0.5
CaCl ₂ (2H ₂ O)	1.0	KH ₂ PO ₄	1.5
Na ₂ MoO ₄ (2H ₂ O)	0.05	FeCl ₃ (6H ₂ O)	0.01
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.48	CuSO ₄ (5H ₂ O)	0.03

(a) Concentración variable: 1.1, 2.2, 4.4, 6.8 y 7.8 g/L.

La alimentación se llevó a cabo con un flujo de entrada de 0.37 L/d, para cada medio de cultivo (2 x 0.37 L/d) y el flujo de salida fue de 0.74 L/d. En las cinco pruebas el tiempo de residencia hidráulico fue de 2 d. con velocidad de agitación de 250 rpm y temperatura de 30°C. El comportamiento del proceso fue evaluado a través del monitoreo de compuestos nitrogenados, de carbono y especies azufradas en la alimentación y efluentes del reactor.

3.5. Restablecimiento de la desnitrificación en heterotrofia. Oxidación de azufre elemental

Durante la evaluación en presencia de sulfuro, se presentó la acumulación de azufre elemental en el reactor. Para llevar el reactor a las condiciones de partida, es decir en heterotrofia, fue necesario orientar el proceso primero a la oxidación del azufre elemental acumulado. La operación del reactor se mantuvo en continuo. Fue suspendida la adición de sulfuro en el medio, manteniendo la misma velocidad de carga de acetato (303 mg C-CH₃COO /L·d) pero la de nitrato fue incrementada de 207 a 291 mg N-NO₃/L·d. En el transcurso se cuantificó los cambios en la concentración de S⁰, de C-orgánico y N-NO₃.

3.6. Pruebas en lote.

3.6.1. Influencia de las condiciones ambientales y del consorcio microbiano en la desnitrificación y sulfuro oxidación

El objeto de la prueba fue evaluar en lote el papel de la biomasa y de la acción química en la desnitrificación para lo cual se usaron botellas serológicas de 120 mL con tapón de hule herméticamente cerradas. El volumen de trabajo fue de 100 mL. El medio mineral en solución en todas las pruebas tuvo la composición siguiente (g/L): $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$, 0.09; $\text{Na}_2\text{MoO}_4(2\text{H}_2\text{O})$, 0.005; $\text{MgCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$, 0.044; $\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$, 0.002; KH_2PO_4 , 0.12; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$; 0.02; $\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})$; 0.0008; $\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$, 0.002.

Para evaluar el comportamiento con acetato se adicionaron $\text{CH}_3\text{COONa}(3\text{H}_2\text{O})$ y NaNO_3 con una concentración equivalente a 102 mg C- $\text{CH}_3\text{COO/L}$ y 73 mg N- NO_3/L . En la evaluación con sulfuro se agregó $\text{Na}_2\text{S}(9\text{H}_2\text{O})$ con una concentración de 104 mg S^{2-}/L y de N- NO_3 , 73 mg/L. además de 0.065 g/L de NaHCO_3 , como fuente de carbono. Cada mezcla fue evaluada de dos formas: una en presencia de inóculo y un control libre de él. Se adicionaron 0.12 mL de inóculo, obtenido del reactor desnitrificante en estado estacionario, para tener una concentración de 1.3 – 1.7 g SSV/L. El pH fue ajustado a 8.5 ± 0.2 . Los recipientes fueron mantenidos bajo agitación rotatoria a 100 rpm y temperatura de 30°C.

3.6.2. Consumo de sustratos y actividad desnitrificante

En esta parte se evaluó en lote el comportamiento del consumo de sustrato en la desnitrificación en presencia de una biomasa desnitrificante fisiológicamente estable, utilizando como fuente de energía: (a) acetato, (b) sulfuro y (c) ambos, acetato y sulfuro para reducir el nitrato a nitrógeno molecular.

Se utilizó un reactor (Applikon) de 1.5 L igual al utilizado en las pruebas en continuo (Figura 3.1.1), excepto las bombas del control de alimentación y efluente. Cada evaluación se realizó por duplicado. El volumen de trabajo fue de 1.3L y el medio

mineral en solución en todas las pruebas tuvo la composición siguiente (g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot (2\text{H}_2\text{O})$, 0.09; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot (2\text{H}_2\text{O})$, 0.005; $\text{MgCl}_2 \cdot (6\text{H}_2\text{O})$, 0.044; $\text{CuSO}_4 \cdot (5\text{H}_2\text{O})$, 0.002; KH_2PO_4 , 0.12; $\text{MgSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$; 0.02; $\text{FeCl}_3 \cdot (6\text{H}_2\text{O})$; 0.0008; $\text{CuSO}_4 \cdot (5\text{H}_2\text{O})$, 0.002.

La concentración de nitrato se mantuvo constante en $73 \text{ N-NO}_3^- \text{ mg/L}$ en los tres experimentos, siendo la variable de trabajo la fuente reductora. En el experimento (a) se utilizó acetato a $102.2 \text{ mg C-CH}_3\text{COO-}/\text{L}$, relación C/N de 1.4. Para el experimento (b) sulfuro a $104.4 \text{ mg S-S}^{2-}/\text{L}$, relación S/N 1.43, adicionando además 0.065 g/L de NaHCO_3 , como fuente de carbono. El experimento (c) consistió de la mezcla de ambos, sulfuro y acetato en las mismas concentraciones indicadas en a y b. Se adicionaron 0.12 L de inóculo obtenido del reactor desnitrificante en estado estacionario, para tener una concentración de $1.3 - 1.9 \text{ g SSV/L}$. El pH fue ajustado a 8.5 ± 0.2 . El reactor fue mantenido en agitación homogénea a una velocidad de 250 rpm y temperatura de 30°C .

3.7. Métodos de análisis

3.7.1. Compuestos nitrogenados

3.7.1.1. Cuantificación de amonio.

El método utilizado fue es por electrodo selectivo del ion amoniaco (pHoenix Electrode Co.), cuya respuesta de linealidad se produce en un intervalo de 0.01 a 100 mg/L de amoniaco. La muestra se hace alcalina con hidróxido de sodio para convertir el ion amonio a amoniaco. El amoniaco pasa a través de una membrana permeable al gas colocada en el fondo del electrodo de ion selectivo modificando el pH de la solución interna (ASTM, 1992). El cambio es detectado por un electrodo interno de pH. La medición del potencial en mvolts se hizo con un potenciómetro Cole-Parmer (DigiSense), bajo agitación constante y a 25°C . El electrodo se coloca con una inclinación de 45° para evitar la formación de burbujas que pueden interferir en la lectura.

La concentración de amoníaco es determinado de una curva de calibración construida a partir de una solución estándar de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En cada ocasión que se va a cuantificar NH_3 en muestras, es necesario construir la curva de calibración, con por lo menos tres estándares de concentración conocida. El valor es proporcional al logaritmo de la concentración cuyo valor puede ser calculado directamente de la gráfica o de la ecuación de la recta ajustada por el método de mínimos cuadrado. La Figura 3.7.1 presenta los valores obtenidos en tres estándares en un intervalo de 1 a 100 mg NH_4/L . El valor promedio de la pendiente de la recta estimado en 8 curvas de calibración construidas fue de $25.94, \pm 1.3$, con un grado de reproducibilidad del 95%. Desviaciones mayores del valor de la pendiente son indicio de anomalías en el equipo que afectarían la confiabilidad de las mediciones.

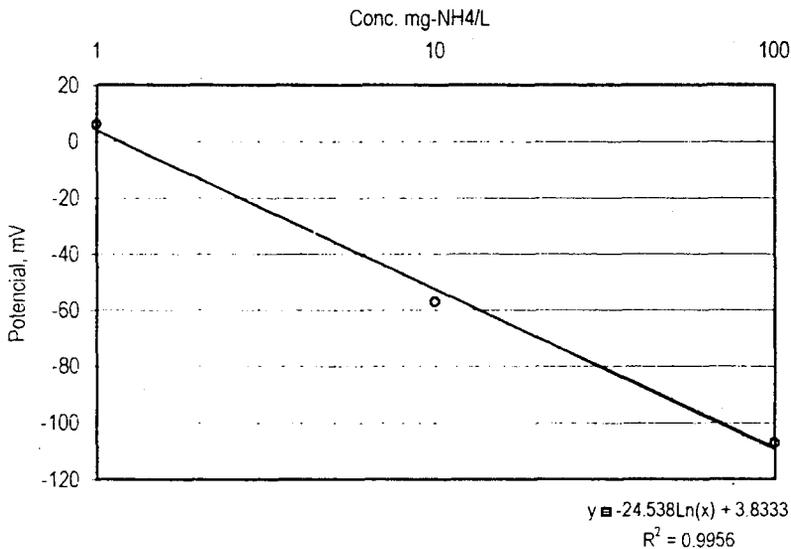


Figura 3.7.1. Curva de calibración con concentraciones estándar de amonio.

Procedimiento. 50 mL de muestra se alcalinizan con 0.5 mL de NaOH 10N. Con las soluciones estándar se corroboran la calibración del equipo y se construye la curva de calibración. Las muestras deben medirse inmediatamente después de prepararse. Para

evitar pérdidas por arrastre, la lectura se toma cuando el valor en mvolts del potenciómetro es estable.

3.7.1.2. Cuantificación de nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-).

La detección y cuantificación de nitrato y nitrito se ha podido realizar en forma rápida y precisa por electroforesis capilar (Li, 1993; Wang y col. 1995; Gómez y col. 1996) El método seleccionado es por análisis capilar de iones. El método se basa en la migración electroforética de iones al aplicar un voltaje a través de un capilar, causando una migración diferencial de los componentes de la muestra "cargada" eléctricamente hacia el electrodo respectivo. Dependiendo de la polaridad de la energía suministrada y la composición del electrolito, el analito separado pasa a través del detector.

Este método se realizó con un analizador capilar de iones (CIA 4000, MilliporeTM), a una temperatura de 25°C. Como capilar se empleó una columna de sílice fundida, de 60 cm largo y 75 μm diámetro interno, con una corriente de 18 μA y un suministro de energía negativo con un voltaje de 20 KV. El modo de la inyección fue hidrostática a 10 cm de altura por 30 seg. La absorbancia se midió en la región ultravioleta con lámpara de mercurio a 254 nm. Los tiempos de toma muestra y de corrida fueron de 4 segundos y 4.2 minutos, respectivamente.

Solución de electrolito para la electroforesis: El electrolito empleado es basado en cromato de sodio solución 4.6 mM que se incorpora en la siguiente solución:

Para un volumen de 100 mL. Medir 2.3 mL de la solución CIA-Pak OFM Anion-BT (Waters) + 4.6 mL de concentrado de electrolito base cromato 4.6mM. Se afora a 100 mL con agua desionizada. Mezclar y previo a su uso filtrar en membrana de 0.45 micras. La solución electrolito resultante tiene un pH de 8.0

Para verificar la forma de la respuesta del equipo se emplearon diferentes estándares de nitrato y nitrito. Los estándares fueron preparados a partir de soluciones patrón de

5000 mg/L de nitrito y nitrato, cada uno preparado en agua desionizada. Se hicieron mezclas con diferente concentración en un intervalo de 5 a 80 mg/L de cada ion, incluyendo al sulfato y tiosulfato. Se construyó una gráfica del valor del área bajo la curva reportada contra la concentración de NO_3^- y NO_2^- en mg/L, encontrándose que la respuesta del método es lineal (Figura 3.7.2). El área bajo la curva es proporcional a la concentración, observándose una mayor dispersión de la respuesta a concentraciones mayores de 60 mg/L (Tabla 3.7.1), abajo de este valor la reproducibilidad de la medida fue mayor al 93%.

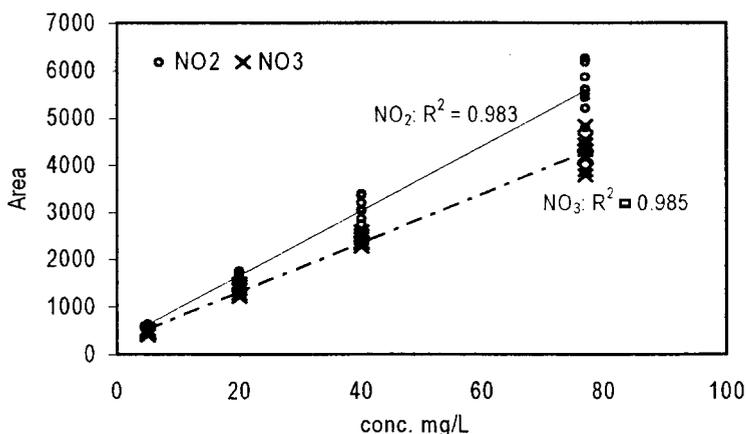


Figura 3.7.2. Respuesta (Área) para diferentes concentraciones de nitrito y nitrato.

	NO_2^- , mg/l				NO_3^- , mg/l			
	5	20	40	80	5	20	40	80
Área (media)	589.3	1673.7	3081.5	5560.8	446.1	1346.2	2415.9	4247.9
DS	±40.9	±44.7	±177.8	±310.0	±31.8	±48.2	±109.3	±216.4
CV.%	3.9	2.7	5.7	5.6	7.1	3.6	4.5	5.1

Tabla 3.7.1. Estimadores del área para diferentes concentraciones de nitrito y nitrato.

En la muestra la cuantificación de NO_3^- y NO_2^- se hace con base a un estándar de referencia, que en este caso fue de 50 mg/L de NO_3^- y de NO_2^- .

Preparación de muestras para análisis en el CIA: La muestra primero se somete a centrifugación a 12000 rpm por 10 min. se filtra con una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro. Se depositan 0.5 mL del filtrado y se colocan en un vial Eppendorf, evitando la formación de burbujas. La concentración de nitrato en el influente se mide haciendo una dilución 1:25 en agua desionizada, para mayor confiabilidad.

Durante la rutina del análisis en el equipo, después de cada tres muestras, se incluyó una solución de concentración conocida para determinar el estado de calibración del equipo. a su vez sirve como estándar de referencia para calcular la concentración en la muestra. El análisis se hizo por duplicado. La programación del equipo y análisis de resultados se realizó con el paquete de software *Máxima*.

3.7.1.3. Nitrógeno y óxido nitroso.

El análisis de estos gases es por cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3350 con un detector de conductividad térmica (TCD) (Shomburg, 1990) y un integrador Shimadzu CR501 Chromatopac. Como fase móvil se utilizó helio a un flujo de 16 mL/min, con una columna de acero de 1.20 m de largo y 1/8" de diámetro, empacada con Poropak Q de malla 80 – 100. Las condiciones de temperatura fueron: Columna, 35°C; inyector, 100°C; detector, 110°C; filamento, 135°C (Varian Ass., 1996) y un volumen de inyección de 50 μL de muestra. La calibración del cromatógrafo se hizo con una mezcla estándar de nitrógeno (60%), dióxido de carbono (15%), metano (15%) y óxido nitroso (10%).

La muestra del biogas producido en el reactor se obtiene a través del septo colocado en la línea de recolección del gas (Figura 3.1.1), con una jeringa de 0.5 mL hermética (Mca. Hamilton).

La medición de los gases se realiza directamente con inyecciones repetidas de la misma muestra. Bajo las condiciones del método es posible en la misma corrida la identificación de metano y bióxido de carbono. En la Tabla 3.7.2 se tienen los

estimadores estadísticos de la concentración de gases presentes en una muestra de gas producido reportando un valor medio en %vol de 85.03 para N₂ y 14.96 de CO₂, con coeficiente de variación menor a 3. El grado de reproducibilidad es mayor que 97%.

Tabla 3.7.2. Valores estadísticos de la respuesta (%vol) de N₂ y CO₂.

	N ₂	CO ₂
<i>Media (%vol)</i>	85.03	14.96
<i>DS</i>	± 0.39	± 0.39
<i>CV, %</i>	0.46	2.61

3.7.2. Compuestos carbonados.

3.7.2.1. Carbono orgánico.

El principio de su medición se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presentan moléculas poliatómicas de gas como el CO₂ y CH₄, a diferencia de moléculas monoatómicas como N₂, O₂ y H₂ que no presentan esa propiedad. El equipo utilizado es un analizador de carbón orgánico total modelo TOC-5000 de ShimadzuTM. Cuenta con un tubo de combustión para carbón total que contiene catalizador para la combustión y es calentado a 680°C. Como gas de arrastre utiliza aire de alta pureza. La muestra se introduce mediante un inyector al tubo de combustión en donde los componentes del carbón total se descomponen. Los productos de la combustión pasan por un analizador de gas infrarrojo en donde es detectado el CO₂ generando como señal un pico cuya área es calculada por un procesador de datos. El área es proporcional a la concentración de carbono en la muestra y es calculada con base a una curva de calibración previamente preparada (Shimadzu Co.).

Para la medición de carbono orgánico, antes de la inyección al equipo, la muestra es acidificada (70 µL de HCl 3N para un volumen de 10 mL) y se somete a burbujeo con el gas de arrastre en donde los compuestos de carbón inorgánico como carbonato y bicarbonato se eliminan en forma de CO₂. A continuación un volumen mínimo de muestra se inyecta repetidas veces (4 a 5), siguiendo el proceso de combustión y

detección del CO₂ producido y en función del área se obtiene el valor medio de la concentración de carbono orgánico.

En la Figura 3.7.3 se muestra la curva de calibración para diferentes concentraciones de carbono orgánico preparados con una solución estándar de biftalato hidrógeno de potasio de concentración equivalente a 1,000 mg C-org./L (2.125 g del reactivo en un litro de agua destilada).

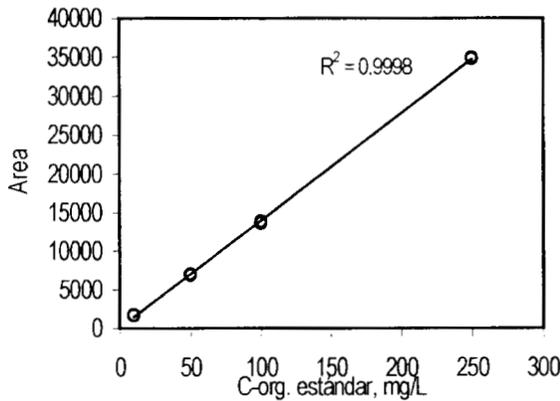


Figura 3.7.3. Respuesta del analizador de carbono orgánico, para concentraciones estándar de C-orgánico.

	<i>C-orgánico estándar, mg L</i>			
	<i>10</i>	<i>50</i>	<i>100</i>	<i>250</i>
<i>Area (media)</i>	±1637.7	6930	13699.5	34811.2
<i>DS</i>	±30.2	±65	±116.5	±77.4
<i>CV, %</i>	1.8	0.94	0.85	0.22

Tabla 3.7.3. Estimadores del área para concentraciones estándar de carbono orgánico.

En el intervalo de concentración de 0 a 250 mg/L de carbono orgánico se observa un comportamiento lineal de la respuesta. De acuerdo a los estimadores del área, en general, el coeficiente de variación fue menor al 2% (Tabla 3.7.3).

Por otra parte, para el medio de cultivo preparado con $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dada la concentración alta, con respecto al intervalo de la curva de calibración, se hizo una dilución 1:10, con agua destilada. El análisis de 9 alícuotas del medio preparado con una concentración de C- CH_3COO a 1,159 mg/L, dio un valor medio de 1,105 mg/L con un coeficiente de variación de 4.6%.

3.7.2.2. Bióxido de carbono y metano.

El análisis de estos gases es por cromatografía de gas y se determinaron en la misma corrida junto con el nitrógeno y óxido nítrico.

3.7.3. Análisis de compuestos de azufre.

3.7.3.1. Cuantificación de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) y sulfato (SO_4^{2-}).

La detección y cuantificación de tiosulfato y sulfato, se hizo con el método de análisis capilar de iones, empleando las condiciones y tipo de electrolito descritos en la cuantificación de nitrato y nitrito. El electrolito basado en sal de cromato de potasio es recomendado para la identificación de ión sulfato. Aunque de pruebas realizadas se encontró que también podrían ser identificados el tiosulfato, además del nitrato y nitrito con una resolución de los picos respectivos bien definida como se muestra en el electroferograma (Figura 3.7.4.). Esto condujo a evaluar el comportamiento de la respuesta y el grado de reproducibilidad del método cuando se tienen mezclados los cuatro iones. Para el nitrato y nitrito la respuesta obtenida ha sido mencionada en la sección 3.7.1.2.

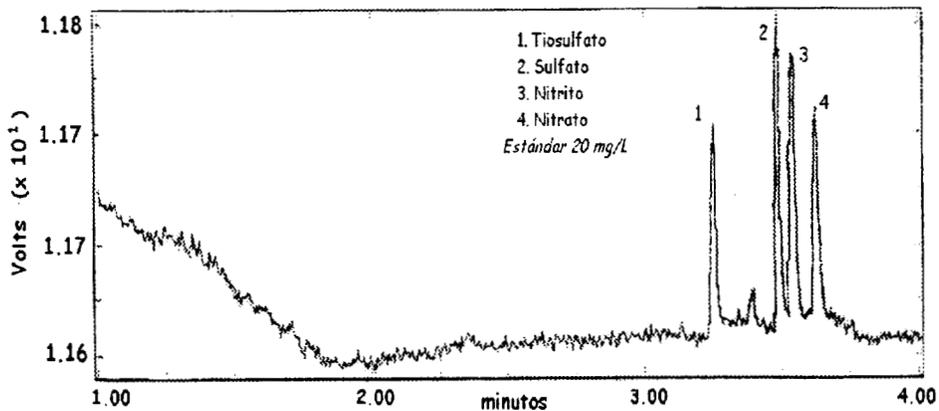


Figura 3.7.4. Electroferograma de la electroforesis capilar de una muestra con los estándares que se indican en mezcla.

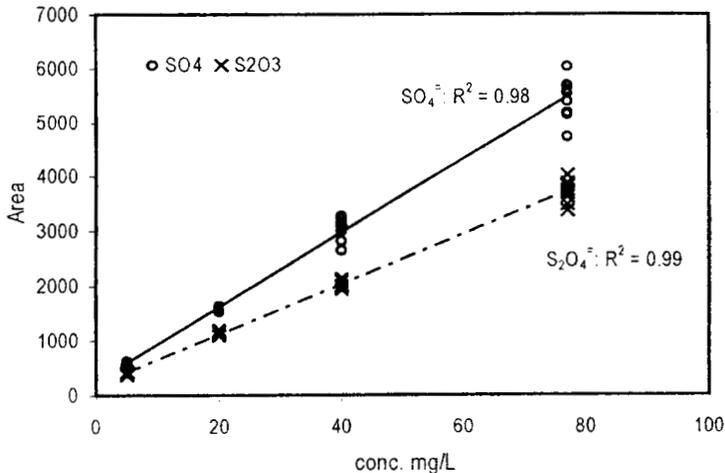


Figura 3.7.5. Respuesta (Area) para diversas concentraciones de sulfato y tiosulfato. (Método análisis capilar de iones. Electrolito base cromato)

Como se observa en la Figura 3.7.5, la respuesta del método fue lineal y el valor del área mantiene una relación directa con la concentración. Similar al análisis del NO₂ y

NO_3 , se tiene mayor dispersión de la respuesta a concentraciones por arriba de 60 mg/L, por lo que las muestras, deberán diluirse para acercar su valor dentro del intervalo de mayor confiabilidad. En general, el coeficiente de variación en el rango de concentración mencionado fue <6% que es considerado aceptable para un método de análisis.

Con soluciones patrón de 1000 mg/L de tiosulfato y sulfato se prepararon diferentes estándares en un intervalo de concentración de 5 a 80 mg/L de cada ion mezclado con estándares de nitrito y nitrato. Se empleó agua desionizada.

En la Figura 3.7.5 se tiene el valor del área bajo la curva reportada contra la concentración en mg/L de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y SO_4^{2-} , correspondiente y en la Tabla 3.7.4 se indican para el “área” los estimadores, media (X), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) en cada una de las concentraciones de prueba.

	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, mg/l				SO_4^{2-} , mg/l			
	5	20	40	77	5	20	40	77
<i>Area (media)</i>	389.6	1,132.5	2,041.5	3,720.0	393.4	1,572.3	3,048.8	5,458.6
<i>DS</i>	±21.9	±40.8	±73.4	±194.3	±34.2	±38.8	±189.9	±359.5
<i>CV,%</i>	5.6	3.6	3.6	5.2	5.7	2.47	6.2	6.6

Tabla 3.7.4. Estimadores del área para diferentes concentraciones de tiosulfato y sulfato.

Al inicio del trabajo el nitrito y nitrato debían ser analizados usando un electrolito a base de sulfato de sodio, con un detector UV a 214 nm. Actualmente con la puesta a punto del análisis de sulfato y tiosulfato usando como electrolito el cromato y detector UV a 254 nm es posible en una sola corrida la identificación de los cuatro iones de interés, con importante ahorro de tiempo.

3.7.3.2. Determinación de sulfuro.

Para el sulfuro se utilizó el método yodométrico, que se basa en la capacidad de oxidante débil del yodo frente a un reductor fuerte como es el ion sulfuro, en medio ácido (Day, y col.1989). La medición se hace en forma indirecta por una valoración en retroceso del yodo remanente empleando una solución estándar de tiosulfato de sodio.

El método llega a ser confiable para concentraciones por arriba de 1 mg/L cuando no existen interferencias y se evita la pérdida de H_2S . Las interferencias se deben comúnmente a la presencia de sustancias reductoras como el tiosulfato, sulfito y varios compuestos orgánicos. La presencia de ciertos metales, como Hg, Cd, Cu, Mo, Fe, pueden dar bajos valores de recuperación por la sal insoluble de sulfuro.

En el caso de formación alta de tiosulfato, la especie de azufre de este fue tomada en cuenta para corregir el valor de sulfuro. Para corroborar la reproducibilidad del método, se llevaron a cabo mediciones en muestras del efluente del reactor desnitrificante. A las muestras les fue adicionada una concentración equivalente a 10 mg S^{2-}/L . El valor de los estimadores de la respuesta en 7 determinaciones fue, como valor promedio, 11.4 mg S^{2-}/L , desviación estándar 1.11 y coeficiente de variación de 9.2%. Por el método del análisis capilar de iones, la cuantificación de sulfuro podría ser factible, sin embargo, en el electroferograma el tiempo de retención coincide con el del ion cloruro presente en el medio de cultivo y por lo tanto cubre el “pico” del sulfuro dificultando su identificación.

3.7.3.3. Cuantificación de azufre elemental.

En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona rápida y cuantitativamente con cianuro para dar el complejo tiocianato; el tiocianato puede ser determinado colorimétricamente por la adición de acetona con cloruro férrico (Bartlett, y Col.1954). La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Ultrospec II-4050 con fuente de luz de tungsteno a 465 nm. Es sensible para concentraciones de 2 ppm de

azufre elemental. El peróxido, sulfuro, bisulfuro y mercaptanos no interfieren cuando están presentes en bajas cantidades. El método alcanza una precisión del 98-99%.

Procedimiento. Se obtiene una alícuota de lodo del reactor y se lleva a sequedad a 100°C, por una hora. El sólido es pulverizado y se pesan aproximadamente 0.04 g que son mezclados en un matraz con 25 mL de éter de petróleo. La relación, peso: volumen, representa la concentración del total de sólidos (masa seca) en la alícuota. Se deja en reposo alrededor de 4 horas para permitir la disolución del azufre elemental en el éter. Según la concentración esperada, se toma una alícuota de 5 mL que se pone en solución con el solvente de acetona, para proceder a la reacción con cianuro de sodio formando cianato en presencia de azufre que se determina con cloruro férrico midiendo la absorbancia. La concentración es obtenida de una curva de calibración preparada con estándares de azufre elemental. Dicha concentración se relaciona con la concentración de sólidos totales para obtener la fracción peso equivalente. Por lo anterior para conocer la concentración total en el reactor debe conocerse la masa seca de sólidos, determinados como sólidos totales (ST), de acuerdo a método gravimétrico estándar (APHA, 1985).

3.7.4. Medición de biomasa (Sólidos suspendidos volátiles).

Se realizó por peso seco, de acuerdo al método recomendado por APHA (1985). Los crisoles se ponen a peso constante. Se colocan en una mufla 550°C por 1 hora, después se dejan 1 hora en estufa a 105°C, y luego se pasan a un desecador. Un volumen de 10 mL de muestra homogénea se deposita en el crisol y se deja evaporar en una parrilla a baja temperatura, antes de alcanzar la evaporación total y para evitar pérdidas, se transfiere a una estufa a 105°C, por 1 hora, y posteriormente, al desecador por 15 min. De aquí se obtiene el contenido de sólidos suspendidos totales. A continuación, la muestra se lleva a calcinación en la mufla a 550°C durante 30 – 45 min., y se obtienen los sólidos suspendidos fijos.

La concentración de sólidos suspendidos totales (g SST /L), se calculan de la forma siguiente.

$$\frac{g \text{ SST}}{L} = \frac{(B - A)}{V}$$

Donde A = peso de crisol (g); B = peso de crisol + residuo (g), 110°C.
V = volumen de muestra (L)

Los sólidos suspendidos fijos (SSF) se obtienen también en g/L, como;

$$\frac{g \text{ SSF}}{L} = \frac{(C - A)}{V}$$

Donde A = peso de crisol (g); C = peso de crisol + residuo (g), 550°C.
V = volumen de muestra (L)

Y por diferencia se tienen los sólidos suspendidos volátiles (SSV);

$$\frac{g \text{ SSV}}{L} = \text{SST} - \text{SSF}$$

3.7.5. Calculo de velocidad volumétrica de producción de gases.

Los valores de velocidad de producción de los diferentes gases están expresados en condiciones estándar, esto es, a: ATM, 273°K y 22.4 L/mol. El volumen estándar de gas se calculó con la siguiente relación, considerando que la presión en la Cd. de México es de 0.8 ATM.

$$\text{Vol}_2 = P_2 T_1 V_1 / P_1 T_2$$

Donde: V₂, Vol. Estándar; P₁, 1 ATM; T₁, 273°K; V₁, vol. Experimental; P₂, 0.8 ATM y T₂, 303°K (30°C, temperatura del experimento).

Obtenido el volumen estándar, se determinó el número de moles con el volumen molar estándar para los gases (22.4 L/mol), para finalmente obtener la concentración en g/L.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. Estabilización del proceso desnitrificante heterotrófico.

En la alimentación se suministró el carbono en forma de acetato y el nitrógeno como NO_3^- . En el gas producido se presentó como principal componente el nitrógeno molecular (N_2). Asimismo, en el efluente, la concentración residual de nitrato fue muy baja.

En la Figura 4.1.1, se presenta el comportamiento de compuestos nitrogenados en función de la velocidad de carga (Q) en mg/L.d. La velocidad de carga de N- NO_3^- fue de 203 mg/L.d y la carga residual en el efluente fue de 0.31 mg/L.d, por lo que se tiene una eficiencia de consumo (ECn) de N- NO_3^- de 99.8%.

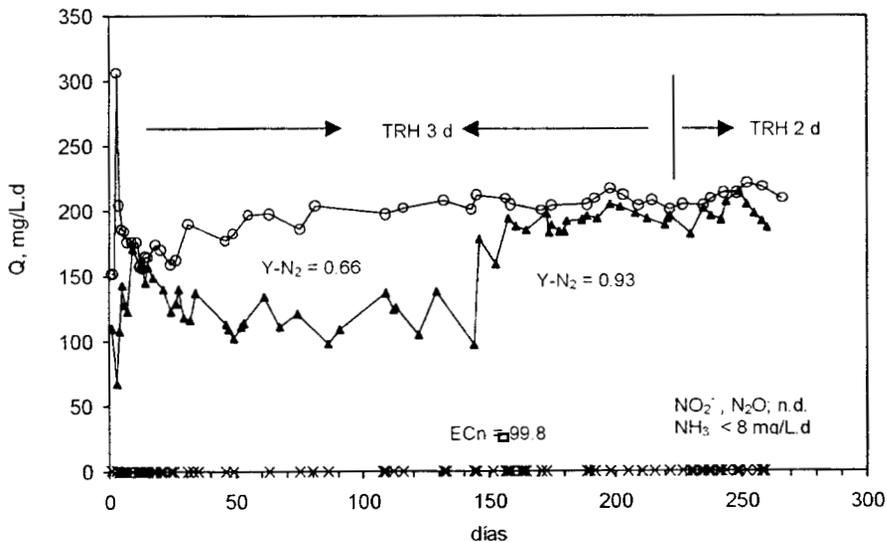


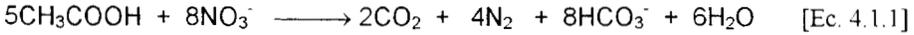
Figura 4.1.1. Perfil de compuestos nitrogenados en el reactor desnitrificante. (O) velocidad de carga de N- NO_3^- , (\blacktriangle) velocidad de producción de N_2 y (x) N- NO_3^- en el efluente.

El rendimiento desnitrificante ($Y-N_2$) es decir, la velocidad de nitrógeno molecular producido con respecto a la velocidad de nitrógeno consumido ($\text{mg N}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1} / \text{mg N-}$

NO_3^- L-d), se puede separar en dos partes. En un primer intervalo la velocidad de producción de nitrógeno fue de 132 ± 11 mg/L-d. que corresponde a un rendimiento de 0.66. Este rendimiento bajo fue consecuencia de la composición de nutrientes en el medio mineral, ya que una vez de hacer modificaciones, en la composición, el rendimiento desnitrificante aumentó hasta 0.93 con velocidad de producción de nitrógeno de 197.1 ± 15 mg/L-d. En ningún caso se detectó la acumulación de nitrito (NO_2^-) ni óxido nitroso (N_2O) y la velocidad de producción de N_2 sufrió cambios poco significativos (8%). Eventualmente se encontró NH_4^+ en concentraciones bajas (3% con respecto a la concentración de N-NO_3^- de la alimentación).

El cambio en el medio mineral fue en la concentración de azufre, suministrado como $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, principalmente. Este se encontraba en exceso y favorecía junto con otras condiciones, el crecimiento celular. La concentración de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fue disminuida de 1.45 a 0.8 g/L.

Respecto a los compuestos carbonados, en la Figura 4.1.2 se presenta el perfil de su comportamiento. Se observan dos etapas delimitadas por cambios de la velocidad de carga en la alimentación. En la primera se tuvo una velocidad de carga de C-orgánico de 357.9 mg/L-d. teniendo en el efluente un residual de carbono equivalente al 15%. Esto se debió al exceso de carbono en la alimentación donde la relación C/N fue de 1.7. La $\text{C/N}_{\text{esteq.}}$ se sabe, es de 1.4. (Pérez T., 1998). Al ajustar la carga de carbono a 303 mg/L-d. disminuyó el carbono residual en el efluente alcanzando una eficiencia de consumo (ECa) de 94%. El cambio en la velocidad de carga del carbono no afectó a la velocidad de producción de N_2 . En los gases producidos no se detectó metano y se presentó una fracción muy baja de C- CO_2 , 3.3% con respecto al carbono orgánico consumido. El acetato fue oxidado hasta bióxido de carbono, pero la baja concentración encontrada en el gas se debe a que la mayor parte de CO_2 producido se disuelve en la fase acuosa dentro del reactor formando bicarbonato, principalmente, como se muestra en la ecuación estequiométrica [4.1.1] de la desnitrificación heterotrófica.



El cambio del tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 3 d a 2 d tampoco modificó el rendimiento desnitrificante, ni a la eficiencia de consumo de acetato. En estos términos, y dado que los cambios en la velocidad de producción de N_2 no fueron significativos, se concluyó que la desnitrificación alcanzó el estado estacionario junto con un alto rendimiento de N_2 y CO_2 , además de un consumo eficiente de los substratos nitrogenados y carbonados.

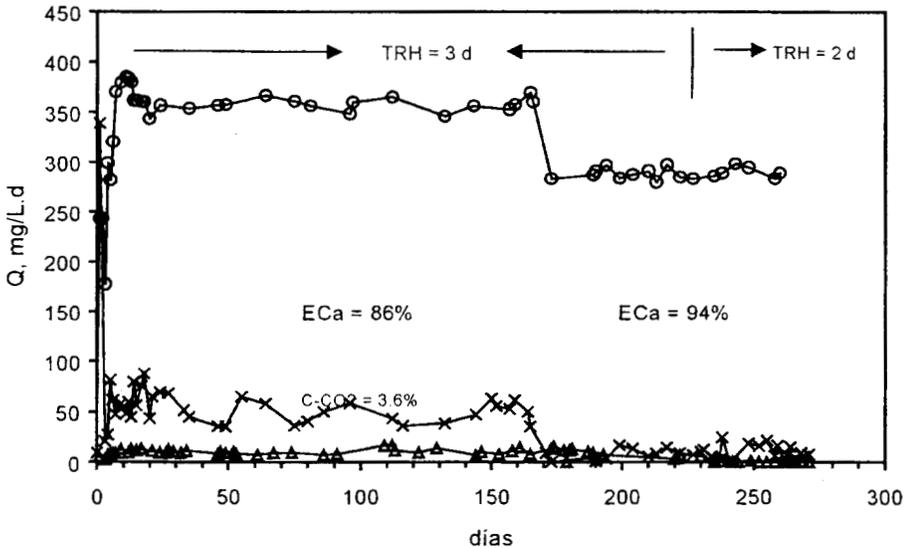


Figura 4.1.2. Perfil de compuestos carbonados en el reactor desnitrificante. (o) velocidad de carga de C- CH_3COO^- , (Δ) C- CO_2 en el gas producido y (x) C- CH_3COO^- efluente.

La concentración inicial de la biomasa (SSV) en el reactor fue de 1.7 g SSV/L y prácticamente después de 10 días alcanzó su máximo crecimiento el cuál en el estado estacionario mantuvo un valor casi constante de 2.4 g SSV/L. (Figura 4.1.3). En el efluente, la concentración de sólidos suspendidos volátiles también presentó en su valor variaciones mínimas. Esto, ayudó a conservar la concentración de SSV

dentro del reactor sin cambios importantes. El comportamiento de ambos parámetros permite suponer que la velocidad de crecimiento fue constante lo cuál normalmente ocurre, en un cultivo continuo, cuando se mantiene un ambiente sin modificaciones (Dawes y Sutherland, 1992). Conducir al reactor desnitrificante al estado estacionario fue establecido como requisito para llevar a cabo la evaluación del comportamiento en presencia de sulfuro.

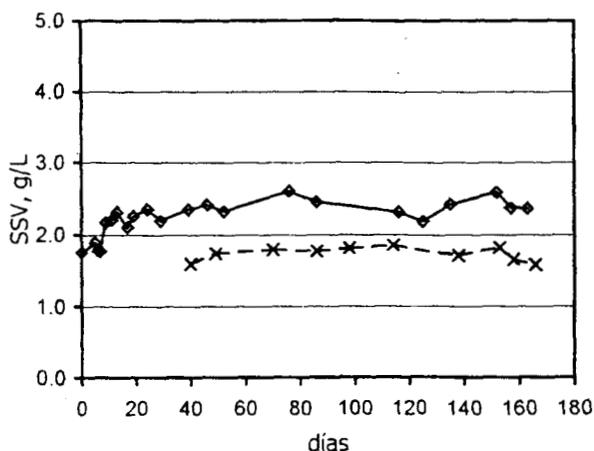


Figura. 4.1.3. Concentración de sólidos suspendidos volátiles dentro del reactor (◊) y en el efluente (x).

4.2. Comportamiento del proceso desnitrificante en presencia de sulfuro.

En el proceso desnitrificante heterotrófico en estado estacionario a una relación C/N de 1.4 la eliminación de carbono y nitrógeno en promedio fue de 93%. Manteniendo fijo el valor de la relación C/N en 1.4, fueron evaluadas cinco velocidades de carga diferentes de sulfuro (Tabla 4.2.1).

La velocidad de carga de sulfuro ($Q-S^2$) fue aumentando en forma gradual hasta alcanzar en la quinta velocidad de carga el 100% de la estequiometría, conforme a la Ecuación 4.2.1 para llevar la oxidación del sulfuro hasta sulfato en presencia de nitrato, con una relación S/N de 1.43.



En la Tabla 4.2.1 se tienen las características de la alimentación y efluente del reactor durante la alimentación de sulfuro. Puede observarse que en la tercera Q-S²⁻, el sulfuro en el efluente (EFL) presentó el valor más alto 67.1 mg/L-d. Sin embargo, para las dos últimas el valor disminuyó de forma importante hasta alcanzar una eliminación cercana al 100%. La formación de sulfato fue nula, no cumplió con la estequiometría prevista [Ecuación 4.2.1] debido a que la oxidación del sulfuro fue parcial, siendo el producto azufre elemental, de acuerdo a los resultados que se presentan más adelante.

Tabla 4.2.1. Respuesta a la variación de carga de sulfuro

Q-S ²⁻ , mg/L-d		Q,C-CH ₃ COO, mg/L-d	Q,N-NO ₃ , mg/L-d			
INF	EFL	EFL	EFL	Y-SO ₄ ²⁻	Y-N ₂	Y-N ₂ O
0	0	18.2 ±4	0	0	0.94	0.00
42	31.6 ±7	37.3 ±7	0	0	0.84	0.006
84	56.5 ±3	70.6 ±13	0	0	0.84	0.002
167	67.1 ±15	110.6 ±23	0	0	0.8	0.030
258	12.9 ±7	113.7 ±11	0	0	0.8	0.013
294	7.0 ±2	92.7 ±8	0	0	0.83	0.000

En la alimentación: C-CH₃COO: 303 mg/L-d, N-NO₃: 209.4 mg/L-d. C/N 1.4.

El C-orgánico residual en el efluente fue incrementando conforme aumentaba la velocidad de carga de sulfuro, pero a partir de la tercera Q-S²⁻, mantuvo un residual equivalente al 36% de carbono de la alimentación.

Respecto a compuestos nitrogenados no se detectó en el efluente NO₃⁻, sólo se presentó mínima formación de N₂O, el cual alcanzó un rendimiento (Y-N₂O) de hasta 0.03 con relación al N-NO₃⁻ consumido, en tanto que el nitrato restante en su mayoría fue reducido eficientemente hasta nitrógeno molecular, con un rendimiento (Y-N₂) equivalente a 0.84 ±0.05. Por lo tanto, como el rendimiento desnitrificante

tuvo variaciones poco significativas se concluyó que el reactor, bajo estos cambios en la alimentación, mantuvo el estado estacionario.

En la Figura 4.2.1, se puede observar que los cambios de velocidad de carga de sulfuro no modifican al proceso desnitrificante. Sin embargo, la eficiencia de consumo de C-CH₃COO, disminuyó de 94 a 64% y se mantuvo constante después del tercer aumento en la alimentación de sulfuro. Antes de éste, la disminución de la eficiencia de consumo del acetato fue concomitante con el aumento en la eficiencia de consumo de sulfuro, la cuál llegó a alcanzar casi el 100%.

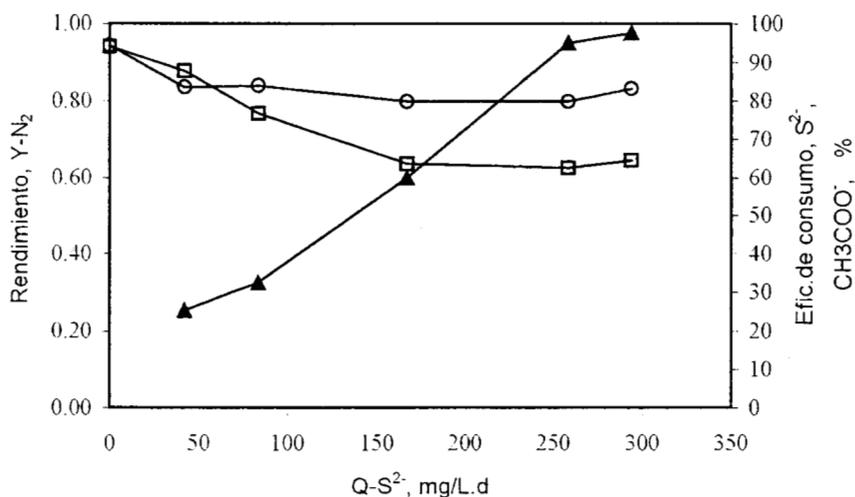


Figura 4.2.1. Rendimiento desnitrificante (○), eficiencias de consumo de sulfuro (▲) y de C-CH₃COO (□) a diferente velocidad de carga de sulfuro, C/N constante.

Puede señalarse que a velocidades de carga de sulfuro menores al 50% de la estequiométrica, lo cuál correspondería a 166 mg $S-S^2/L.d$, se observa en la gráfica un patrón competitivo entre las fuentes reductoras, pero a mayores velocidades de carga de sulfuro, el acetato no cambia y se torna independiente el consumo de sulfuro. Esto es, que podrían existir dos mecanismos distintos en el consumo de

sulfuro. Para entender esto con mayor detalle, sería necesario llevar a cabo trabajo experimental adicional.

Asimismo, para explicar el papel del acetato y sulfuro en la desnitrificación en continuo, con base a los resultados obtenidos, se efectuó un análisis del consumo de ambos reductores en el proceso respiratorio. A partir del acetato consumido en cada velocidad de carga de sulfuro, fue calculado el nitrato reducido hasta nitrógeno molecular (Tabla 4.2.2), de acuerdo a la siguiente ecuación:



La fracción restante del total de nitrato reducido, sería utilizada en la oxidación del sulfuro hasta azufre elemental [Ec.4.2.2].

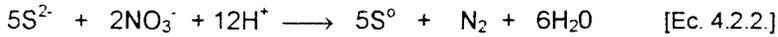
Tabla 4.2.2. Consumo de sulfuro y acetato en el proceso respiratorio de desnitrificación.

Sulfuro total ⁽¹⁾	sulfuro consumido, ⁽¹⁾	% N-NO ₃ reducido	C-CH ₃ COO consumido, ⁽¹⁾	% N-NO ₃ reducido	N-NO ₃ total consumido, ⁽¹⁾
0					
42	10.6	1.1	185.9	98.9	175.55
84	27.0	2.7	182.9	97.3	175.6
167	100.0	9.8	172.6	90.2	178.8
258	245.4	24.6	140.8	75.4	174.6
294	287.0	28.1	137.3	71.9	178.9

⁽¹⁾ En mg/L-d. En la alimentación: 209.4 N-NO₃ mg/L-d y 303.0 C-CH₃COO mg/L-d

A la derecha del sulfuro y acetato consumidos se muestra el porcentaje correspondiente de N-NO₃ reducido. En la máxima velocidad de carga de sulfuro, el C-CH₃COO consumido, 137.3 mg/L-d, fue suficiente para reducir al 72% de N-NO₃, el 28% restante (58 mg N-NO₃/L-d) fue utilizado para llevar a cabo la oxidación de 287 mg S²⁻/L-d hasta azufre elemental. Por lo tanto, el acetato continuó siendo la principal fuente reductora y es desplazado por el sulfuro gradualmente hasta un 33%. En estas condiciones el proceso podría encontrarse restringido de aceptor de

electrones (baja concentración de nitrato), por lo que el sulfuro sería sólo parcialmente oxidado hasta azufre elemental, como se describe en la siguiente reacción:



Una forma que podría explicar el mencionado desplazamiento es considerando la posibilidad de una mayor afinidad de la enzima nitrato-oxidoreductasa de la desnitrificación por el sulfuro que por acetato, lo cual justificaría el aumento de la velocidad residual de acetato en la salida.

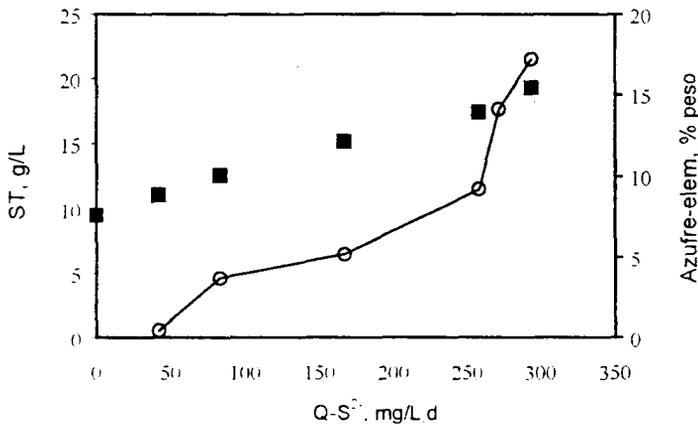


Figura 4.2.2. Acumulación de sólidos totales (■) y azufre elemental,(○) en el reactor contra el incremento gradual de la velocidad de carga de sulfuro (Q-S²⁻).

La producción nula de sulfato encontrada durante la evaluación del proceso en continuo condujo a llevar a cabo el análisis de azufre elemental (S⁰), encontrándose una acumulación importante dentro del reactor, como puede observarse en la Figura 4.2.2. Siendo el proceso en continuo, masa seca (g SST/L) y azufre elemental (g S⁰/L) fueron cuantificados al término de la evaluación de cada aumento de la velocidad de carga de sulfuro. En la grafica, azufre elemental se expresa en % en peso con respecto a la masa seca dentro del reactor. Se puede inferir que el aumento

en la concentración de la masa seca fue debido principalmente a la producción de azufre elemental. Como la oxidación de sulfuro es sólo parcial, formando azufre elemental, la desnitrificación resulta interesante como vía para la eliminación de sulfuro, ya que en forma de azufre insoluble se podría facilitar su separación del efluente.

Contrario a este proceso, que fue operado bajo condiciones limitadas del aceptor de electrones llevando la oxidación del sulfuro hasta azufre elemental, existen evidencias de la oxidación del sulfuro hasta sulfato en un reactor desnitrificante de lecho fluidificado operando en condiciones limitadas de donadores de electrones (acetato y sulfuro) y relaciones C/N de 0.35 y de S/N 0.46 (Gommers, y col., 1988a). La desnitrificación fue incompleta, con acumulación de nitrito y posiblemente óxido nitroso (N_2O), el cual puede formarse a relación C/N muy por debajo de la estequiométrica (Cervantes y col., 1999)

4.2.1. Consumo de azufre elemental.

Una vez concluida la evaluación de la última velocidad de carga de sulfuro propuesta, se procedió a restablecer las condiciones de partida del reactor, es decir en heterotrofia, lo cual implicaba cambiar condiciones para orientar el proceso, también en continuo, hacia el consumo del S^0 acumulado (3.3 g/L). Para acortar el tiempo requerido y también evitar riesgos de pérdida del reactor por el contenido alto de sólidos acumulados se retiró, mediante una purga, aproximadamente el 40% en volumen de ellos, quedando el contenido de azufre elemental en 1.98 g/L. Manteniendo la alimentación de acetato fija, y con el aumento en la velocidad de carga de nitrato de 209 a 274 mg $N-NO_3/L \cdot d$ se modificó la relación C/N de 1.42 a 1.08, lo cual implicó tener un exceso de nitrato que podría inducir por una parte la oxidación del acetato y con el nitrato remanente la oxidación del azufre elemental posiblemente hasta sulfato.

En la Tabla 4.2.3, el primer bloque incluye los datos de la acumulación de azufre elemental (S^0) obtenidos durante la adición de sulfuro al proceso a una relación C/N

fija de 1.42 en el influente. El segundo bloque muestra el consumo de azufre, durante el período que ahí se señala, con la relación C/N constante de 1.08. Puede observarse que el consumo de azufre (oxidación de S⁰ hasta posiblemente SO₄²⁻) demandó un periodo mayor, 40 días, en comparación con el tiempo requerido para producir 3.3 g/L de S⁰. En pocas ocasiones llegó a detectarse incremento en la concentración de SO₄²⁻ en el efluente del reactor, lo que hace suponer que la oxidación de S⁰ a SO₄²⁻ ocurriría lentamente, a un nivel que en el proceso en continuo no alcanzarían a distinguirse los cambios en la concentración de sulfato.

Tabla 4.2.3. Acumulación y consumo del azufre elemental en el reactor desnitrificante en continuo.

Acumulación S ⁰ (C/N 1.42)			Consumo del S ⁰ (C/N 1.08)		
Días	g S ⁰ /L	%peso	Días	g S ⁰ /L	%peso
0	0.046	0.42	0	1.98	17.2
4	0.46	3.7	8	1.24	9.3
7	1.1	5.2	30	0.18	1.2
12	1.5	9.2	32	0.19	1.2
14	2.4	14.1	40	0.15	0.8
19	3.3	17.2			

C-CH₃COO en la alimentación 303.0 mg/L-d.

%peso: Fracción peso de S⁰ con respecto a la masa seca (SST).

El aumento en la concentración de nitrato trajo una disminución del valor de la C/N, lo cual debió dirigir la oxidación del azufre a sulfato. De esta manera, a C/N de 1.4, solo se oxidó el S²⁻ a S⁰ y al bajar el valor de la C/N a 1.08 prosiguió la oxidación de S⁰ hasta SO₄²⁻. Estos cambios, no afectaron la eficiencia desnitrificante y el consumo de acetato recuperó su eficiencia alta e incluso mayor a la que se tenía antes de la adición de sulfuro. En un reactor desnitrificante de lecho fluidificado en continuo, trabajando con C/N por abajo de 0.1, se reportó la oxidación completa del sulfuro hasta sulfato, teniendo eventualmente como intermediario azufre elemental, pero la

desnitrificación resulto deficiente con acumulación de nitrato y nitrito en el efluente (Gommers y col. 1998a). Lo anterior pone en evidencia que la relación C/N, la cual depende de la concentración del aceptor de electrones, sería un factor importante que influye en el proceso para que el producto final de la oxidación de sulfuro sea azufre o sulfato. Asimismo, ambas oxidaciones llevadas a cabo, $S^{2-} \rightarrow S^0$ y $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$, exhiben la capacidad del consorcio microbiano para modificar su metabolismo ante el cambio de condiciones.

4.2.2. Balance de azufre.

Finalmente, fue cotejado el consumo de S^{2-} y formación de S^0 como producto final mediante el balance de masa (Tabla 4.2.4), estimado con base a los resultados obtenidos durante la adición de sulfuro al proceso. Para cada incremento de velocidad de carga de sulfuro fueron calculadas, la masa de azufre en el influente, dentro del reactor, así como en el efluente. La mayor formación de azufre elemental (97%, con respecto a la alimentación) fue posible en las dos últimas velocidades de carga de sulfuro, lo cual coincide con el mayor consumo de sulfuro registrado. En las tres primeras velocidades de carga de sulfuro la producción de azufre elemental fue entre 22 a 58%. En el balance no fue considerado el $S-S_2O_3^{2-}$, intermediario que llegó a formarse en concentraciones mínimas.

Tabla 4.2.4. Balance de masa de Azufre

Q-S ²⁻	Sulfuro (mg S ²⁻)			Producto (mg S ⁰)		
	Influente	Efluente	Consumo	En reactor	Efluente	Total
42	274.6	205.4	69.2	41.6	18.8	60.5
84	761.1	514.2	247.0	100.1	133.8	233.9
167	1085.9	436.2	649.7	626.6	0	626.6
258	1679.0	83.9	1595.1	1209	413.4	1622.4
294	2484.3	59.2	2425.2	1487.2	921.0	2408.2
Total:	6284.8	1298.7	4986.1	3464.5	1487.1	4951.6

Q-S²⁻ : Velocidad de carga de sulfuro (mg/L-d)

4.3. Pruebas en lote.

4.3.1. Influencia de las condiciones ambientales y del consorcio en la desnitrificación y sulfuro oxidación.

El cambio de energía libre (ΔG°) asociado a la desnitrificación fue calculado tomando en cuenta la energía de formación de reactantes y productos de las reacciones estequiométricas. Cuando se emplea al acetato el valor de ΔG° es de -996.3 kcal/mol y con sulfuro de -930 kcal/mol. La oxidación de ambos reductores es, por lo tanto, exergónica. La desnitrificación, en presencia de acetato o sulfuro, implica reacciones de oxido-reducción. Los aspectos termodinámicos, como el cambio de energía libre de la oxido-reducción, pueden afectar el desarrollo del proceso. El equilibrio químico (K_{eq}) se modifica cuando la concentración del sustrato cambia por efecto del consumo de ellos, sin embargo, éstos cambios de concentración, así como la actividad biológica pueden influir en la velocidad de la reacción. Fue por esta razón que se evaluó, en experimentos en lote, el grado de influencia de la acción química y biológica en la conversión de sustratos de la desnitrificación, en dos formas: a) con acetato y b) con sulfuro, cada uno con un control abiótico (libre de biomasa), respectivamente.

Al utilizar acetato (Tabla 4.2.5. A) en presencia de la biomasa desnitrificante se tiene que después de 18 horas de incubación el consumo de C-orgánico y nitrato fue prácticamente completo. En tanto que en el control (acetato-nitrato-sin biomasa) el consumo fue de sólo 4.5 y 15%, respectivamente.

Cuando se utilizó sulfuro (Tabla 4.2.5. B), para el mismo intervalo de tiempo, el consumo de sulfuro y nitrato también fue casi completo, en tanto que en el control (sulfuro-nitrato-sin biomasa) el consumo de sulfuro fue de 17% y todo el nitrato se redujo parcialmente a nitrito (NO_2^-) sin avanzar más, aún después de 60 horas. Esto indica que en el proceso desnitrificante, tanto en heterotrofia y autotrofia, la oxido-reducción fue esencialmente catalizada por la actividad biológica de la biomasa. En

tanto que en condiciones abióticas, es decir, por vía química el proceso ocurrió lentamente y de forma incompleta.

Tabla 4.2.5. Efecto de la presencia de biomasa y de actividad química, en la desnitrificación, en presencia de: (A) acetato – nitrato; C/N 1.4, (B) sulfuro – nitrato; S/N 1.43.

Tiempo, (h)	A		B	
	Con biomasa	Control abiótico	Con biomasa	Control abiótico
	C-orgánico, mg/L		S-S ²⁻ , mg/L	
0	102	102	104	104
18	0.7	97	0	86
66	--	--	0	86
	N-NO ₃ ⁻ , mg/L		N-NO ₃ ⁻ , mg/L	
0	73	73	73	73
18	0	62	6.8	0
66	--	--	0	0
	N-NO ₂ ⁻ , mg/L		N-NO ₂ ⁻ , mg/L	
0	0	0	0	0
18	0	5	26	70.2
66	--	--	6	71

La reducción del NO₃⁻ a NO₂⁻ en el control abiótico podría estar relacionada con la fracción oxidada (17%) del sulfuro, por acción química, en el mismo control en el intervalo de 18 horas.

4.3.2. Evaluación de la velocidad de consumo de sustratos y actividad desnitrificante.

El rendimiento y eficiencias de consumo del cultivo desnitrificante en continuo y en presencia de sulfuro es información útil que describe la magnitud de los cambios del proceso, el cuál se demostró depende esencialmente de la actividad biológica de los microorganismos. Por lo que se consideró conveniente estudiar la velocidad con que suceden dichos cambios, en presencia de una biomasa fisiológicamente estable en tres diferentes condiciones: en heterotrofia y en litoautotrofia, usando acetato y sulfuro, respectivamente, como donadores de electrones, y en presencia de ambos. En todos los casos el aceptor de electrones fue el nitrato. A continuación se describe el comportamiento registrado bajo las tres condiciones y los coeficientes de velocidad específica de consumo de sustrato.

En los experimentos cinéticos, realizados en lote, un indicio de la actividad desnitrificante de la biomasa fue la producción de biogas. Esto se consideró como referencia para detener o continuar la prueba, independientemente de la cuantificación de especies de nitrógeno, de carbono o de azufre según el caso.

Por otra parte, cambios hidráulicos en el reactor como respuesta al desempeño del mismo proceso, la abundancia de nitrógeno molecular (70%) en el aire, así como la acumulación de gas en los espacios libres del reactor, son factores que pueden influir en la estimación de la producción y análisis composicional del gas formado.

En la Figura 4.2.3, se presenta la respuesta en condiciones de heterotrofia. Se indica el comportamiento de las especies de nitrógeno (Fig. 4.2.3.a), y de acetato en términos de la concentración de C-orgánico (Fig. 4.2.3.b). El proceso global se llevó a cabo en un tiempo no mayor a 5 horas.

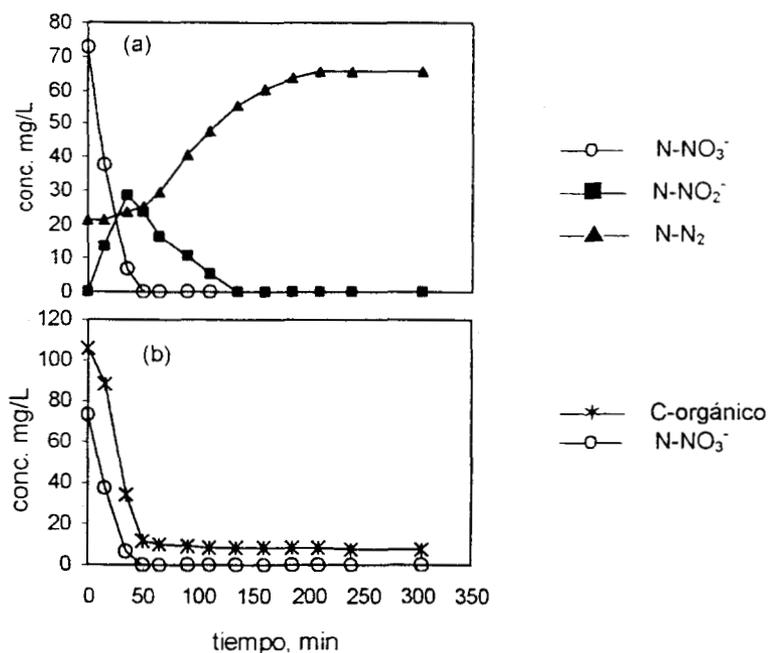


Figura 4.2.3. Desnitrificación heterotrófica en lote. Con acetato como donador de electrones a relación C/N 1.4. (a) Comportamiento de compuestos nitrogenados y (b) carbono orgánico.

Puede notarse que la reducción del nitrito acumulado (29 mg/L), y el aumento en la concentración de nitrógeno molecular suceden una vez que se han consumido la mayor parte de nitrato y acetato. En estas condiciones, la velocidad de reducción de nitrato fue de 2.7 g N-NO₃⁻/L·d. En el gas producido, el 98% vol. fue N₂ y el resto CO₂. La velocidad de reducción de nitrato, en este caso fue casi 4 veces más alta que el valor reportado en litoautotrofia (0.7 ± 0.1 g N-NO₃⁻/L·d), usando tiosulfato como donador de electrones (Trouve y col. 1998; Ikemoto-Yamamoto y col. 1999).

En litoautotrofia, empleando sulfuro como donador de electrones fue necesario más de 80 horas para llevar a cabo el proceso global, en este caso la desnitrificación y oxidación de sulfuro hasta sulfato (Figura 4.2.4).

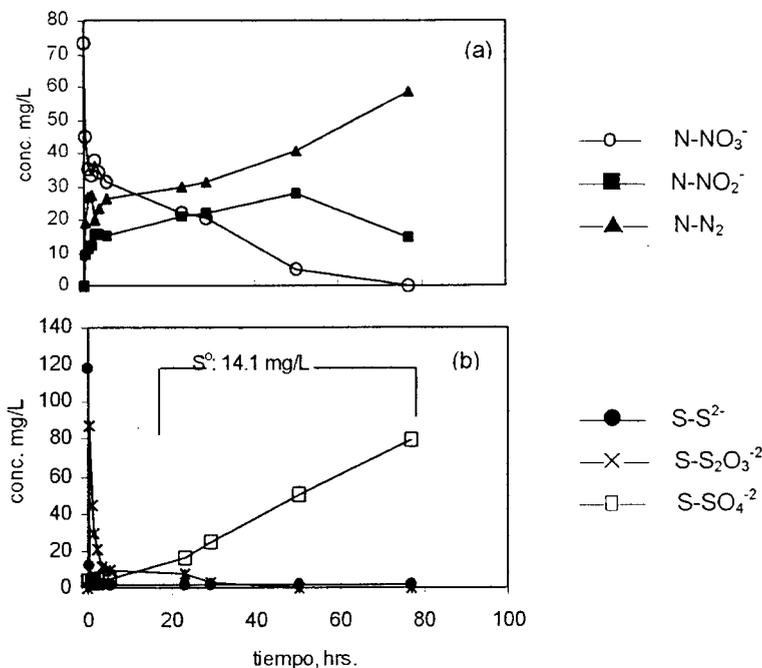


Figura 4.2.4. Desnitrificación litoautotrófica en lote. Sulfuro como donador de electrones a relación S/N 1.43. (a) Compuestos nitrogenados, (b) Compuestos de azufre.

La reducción de nitrato, se llevó a cabo en dos etapas con diferentes velocidades (Figura 4.2.4,a), la primera transcurrió más rápida (0.26 g N-NO₃⁻/L·d) que la segunda (0.011 g N-NO₃⁻/L·d). Pero ambos valores, están por abajo del valor antes señalado de 0.7 g N-NO₃⁻/L·d. Al igual que en la prueba en heterotrofia, se presentó acumulación de nitrito (22 mg N-NO₂⁻/L) pero en este caso por un período más largo. Después, la concentración de nitrito mostró tendencia también a disminuir cuando la concentración de nitrato fue menor que 5 mg N-NO₃⁻/L. La velocidad de producción de gas fue irregular e inclusive llegó a ser no detectable. En los casos

donde fue posible el análisis del gas el principal componente fue N_2 (99%) y una mínima fracción de N_2O y CO_2 .

El sulfuro, puede observarse (Figura 4.2.4,b) que es consumido de inmediato para formar tiosulfato. Ambas especies fueron consumidas en un periodo de entre 1 y 5 h. Posteriormente, en un lapso de más de 7-8 h aproximadamente, no se observaron cambios de las especies monitoreadas, solo después de este periodo empezó la formación de sulfato, a una velocidad de 0.03 g/L·d. El lapso sin cambios, se podría explicar con la posible presencia de azufre elemental u otros intermediarios. Dentro del ciclo biológico del azufre, debido a las transformaciones que ocurren se puede encontrar este elemento en diferentes estados de oxidación. En anaerobiosis o aerobiosis, el sulfuro puede ser oxidado a azufre y posteriormente a sulfato. Se sabe que ciertas especies de *Thiobacillus* pueden oxidar el sulfuro a sulfato, sin embargo, en condiciones limitadas de oxígeno como aceptor de electrones la oxidación completa no ocurre y se forman compuestos menos oxidados como tiosulfato y azufre elemental. S^0 (Van den Ende y Van Gernerden, 1993). Esta forma de azufre es posiblemente excretado como politionatos, polisulfuros o polisulfanos especies de cadenas largas que se ha visto están en equilibrio químico con el S^0 (Steudel y col. 1987, Steudel 1989, Van den Ende y col.1997). En la desnitrificación, juega un papel importante el donador de electrones. La disponibilidad de éste controla la actividad desnitrificante, por lo que al existir cambios en el donador también se modificaría el proceso resultando una velocidad desnitrificante baja (Halling-Sørensen y Jörgensen, 1993). Al final del experimento en lote, la concentración de azufre elemental fue de 14.1 mg S^0 /L.

Lo anterior, indicaría que durante la oxidación del sulfuro, la etapa más lenta es la oxidación de intermediarios como el azufre a sulfato. Este comportamiento también se observó en el reactor en continuo, durante el experimento para oxidar el azufre elemental acumulado (Sección 4.2.1).

La acumulación de nitrito, que se presentó en condiciones litoautótrofas podría estar relacionada con los cambios que sufre la fuente de energía

En la mezcla (acetato-sulfuro-nitrato), el periodo de la prueba fue conducido hasta 30 h, pero el mayor consumo de acetato y nitrato ocurrió en las primeras 5 h (Figura 4.2.5.a). El acetato consumido en este periodo, representa el 68% del inicial. Posteriormente, el consumo fue más lento ya que para un 22% de acetato fue necesario un tiempo de 25 horas. La reducción de nitrato se llevó a cabo en una sola etapa (Figura 4.2.5.b), con acumulación de nitrito por un periodo corto, similar a lo que ocurrió en la desnitrificación heterotrófica. En cuanto al sulfuro, su oxidación total se alcanzó en un tiempo de 2 horas formando tiosulfato (Figura 4.2.5.c), el cuál no fue consumido totalmente, como en el caso de litoautotrofia. La mayor parte (65%) permaneció como tiosulfato y sólo una fracción mínima (11%) alcanzaría la oxidación completa hasta sulfato, pero a una velocidad baja, 4×10^{-3} g S-SO₄/L-d, en comparación a la obtenida en litoautotrofia. Un 30% formaría intermediarios como azufre elemental, sulfito, tetrionato, politionato. De estos últimos se ha reportado su formación como resultado de la oxidación que experimenta el tiosulfato con otros compuestos para formar moléculas denominadas politionatos 'O₃S-S_n-SO₃' (Studel, 1996), cuya estrecha relación con el azufre elemental fue antes mencionada. La concentración registrada de azufre elemental al final del experimento fue de 15.6 mg S⁰/L.

Se conoce más acerca de la formación de azufre vía biológica en condiciones óxicas que anóxicas. Trabajos realizados, con cultivos puros, han reportado que ciertas especies del genero *Tiobacillus*, muestran más tendencia que otras para formar azufre, estableciendo que tanto el oxígeno (aceptor de electrones), como la concentración de sulfuro jugarían un papel importante para determinar si es azufre o sulfato el producto final y, se sabe, que en condiciones limitadas de acepto de electrones y altas cargas de sulfuro se favorecería la producción de azufre (Steffes y Kuenen, 1988).

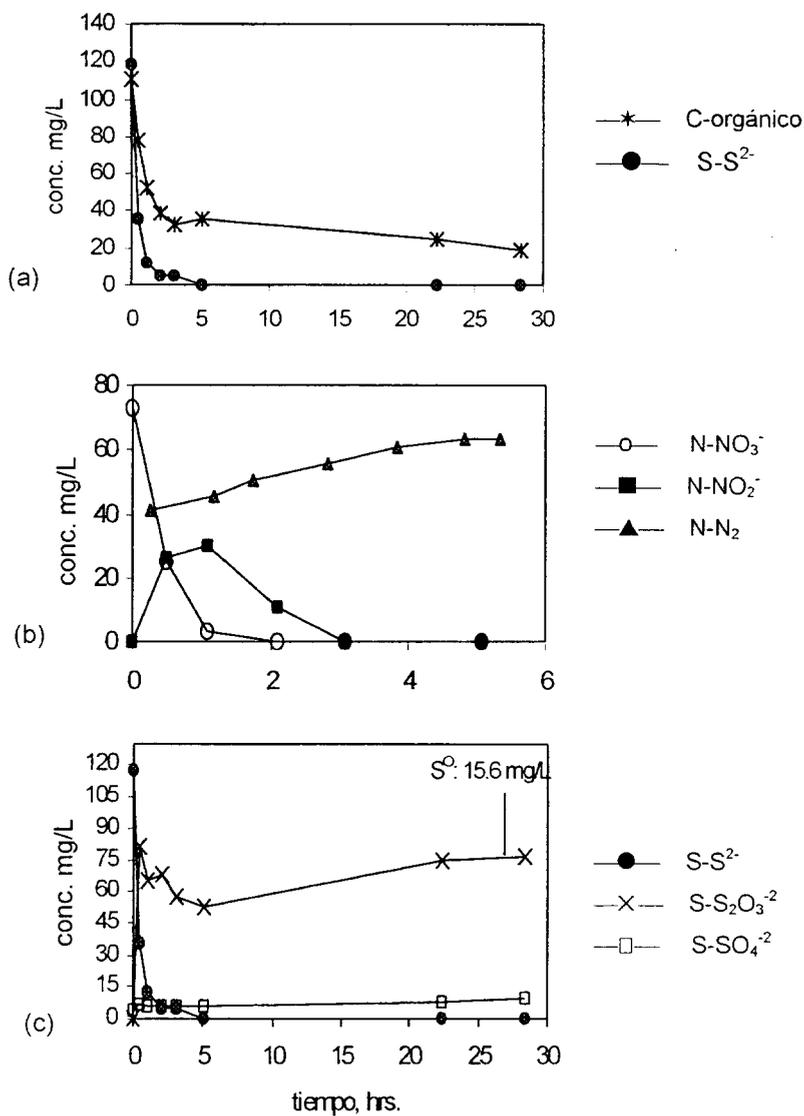


Figura 4.2.5. Desnitrificación en lote en presencia de ambos donadores de electrones, acetato y sulfuro. (a) Consumo de carbono orgánico y sulfuro, (b) Comportamiento de especies nitrogenadas y (c) Comportamiento de especies de azufre.

En el experimento, con acetato, sulfuro y nitrato en lote, el nitrato fue el sustrato limitante en presencia de un poder reductor alto dado por el acetato y sulfuro. La desnitrificación se llevó a cabo siguiendo un patrón similar como en heterotrofia, utilizando acetato (68%) y sulfuro (35%), como fuente de energía. Aunque la oxidación del sulfuro fue parcial, teniendo como producto final tiosulfato, azufre o intermediarios, principalmente. Bajo estas condiciones, la velocidad de reducción de nitrato fue de 1.6 g N-NO₃⁻/L·d. En el gas producido se encontró, N₂, N₂O, y CO₂ siendo la composición de 95, 4.3 y 0.7 %vol., respectivamente. La velocidad de reducción de nitrato, mostró un aumento importante con respecto al experimento en litoautotrofia, y el consumo de nitrato sucedió en una sola etapa. La presencia de N₂O se ha atribuido a la inhibición o represión de la enzima N₂O- reductasa, la investigación sobre los factores que promueven la formación de intermediarios de la desnitrificación, se ha realizado a diferentes niveles y con una amplia gama de condiciones, de modo que la interpretación de resultados resulta un poco difícil, pues incluso se presentan evidencias que se contraponen. Muchas de la evidencias aportadas sugieren que el oxígeno, la presencia de un poder reductor alto, el pH y el tipo de la fuente de electrones, son quienes tienen un mayor efecto sobre la acumulación de intermediarios (Bernet y col. 1995; Witch, 1996). Incluso, se ha relacionado una inhibición fuerte de la reducción de N₂O en presencia de sulfuro en concentración de 0.32 mg S-H₂S /L (Schönharting y col. 1998), lo cual difiere de los valores registrados en este estudio, donde la concentración de sulfuro inicial fue de 118 mg S-S²⁻/L, y la formación de N-N₂O fue de sólo 5%, con respecto al nitrato inicial, el resto (95%) fue reducido hasta N₂. En todo caso, la inhibición fue baja. Sin embargo, debido a los problemas ambientales asociados al N₂O, deben evitarse las emisiones de este compuesto sobre todo de las plantas de tratamiento biológico de aguas residuales.

En los tres experimentos anteriores, se observó acumulación de nitrito (NO_2^-). En todos los casos la reducción de NO_2^- acumulado se llevó a cabo, solo cuando la mayor parte del nitrato (NO_3^-) fue consumido. Por otro lado, en el proceso en continuo donde la disponibilidad de sustrato (en este caso NO_3^-) fue un factor limitante y bajo los cambios que sufrió la alimentación, no se observó en ningún momento acumulación de nitrito. La concentración de NO_3^- en el reactor agitado en continuo fue baja (0 - 2mg N- NO_3^- /L). A diferencia del proceso en lote donde se tuvieron cambios de concentración de NO_3^- importantes, siendo el valor inicial de 73 N- NO_3^- /L mg/L. Al parecer, las condiciones del medio de cultivo (continuo o lote) influirían en la reducción de NO_2^- , inhibiendo la actividad de la enzima nitrito-reductasa, y en consecuencia se detiene la vía hacia la formación de N_2 . La inhibición podría estar asociada a la presencia de NO_3^- en las pruebas en lote. Como se sabe, la desnitrificación es una reducción secuencial vía NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O hasta N_2 , en donde intervienen cuatro enzimas acopladas con la oxidación de sustrato y debido a las condiciones ambientales o a la presencia de inhibidores en el medio, como lo puede ser el mismo nitrato, la velocidad de reducción de las etapas subsecuentes es baja en comparación a la etapa precedente, favoreciendo la acumulación de intermediarios (Witch y Beier, 1995; Schönharting y col. 1998). Este mismo efecto inhibitor del nitrato podría relacionarse en el comportamiento observado en un reactor desnitrificante en continuo, con alimentación de acetato, sulfuro y nitrato, bajo condiciones de aceptor de electrones en exceso que reportó presencia de nitrato y nitrito en el efluente (Gommers y col. 1988a).

En heterotrofia (acetato-nitrato), la reducción del nitrito acumulado se llevó a cabo a una velocidad de 0.41 g N- NO_2^- /L.d y en la mezcla (acetato-nitrato-sulfuro) donde aparentemente se tuvo un mayor poder reductor, la velocidad de reducción del nitrito prácticamente no fue alterada. En cambio, cuando se tuvo únicamente al sulfuro como donador de electrones (sulfuro-nitrato) la acumulación de nitrito permaneció por un período largo y la velocidad de reducción disminuyó a 0.02 g N- NO_2^- /L.d. Por lo anterior, es posible considerar la presencia de nitrato como un factor

que influye en la acumulación de nitrito, pero también se pone en evidencia que mediante factores como el tipo de cultivo, la fuente donadora de electrones y la presencia de una fuente alterna de energía, sería posible alcanzar condiciones para controlar e incluso evitar la formación de NO₂.

En el proceso litoautotrófico, no se descarta el efecto de los cambios del donador de electrones (Halling-Sørensen y Jørgensen, 1993). El sulfuro se oxida, primero a tiosulfato, azufre elemental y posteriormente alcanza la forma más oxidada que es el sulfato. La molécula de tiosulfato, se sabe que puede oxidarse formando politionatos (Alcántara, 2000), pero también se ha documentado que el tiosulfato está formado por dos átomos de azufre no equivalentes y cada uno puede seguir vías diferentes (Figura 4.2.6): uno de ellos formaría sulfato como producto final, teniendo como probables intermediarios azufre elemental y sulfito (Trouve y col. 1998; Cypionca y col. 1998). El otro átomo formaría únicamente azufre elemental.

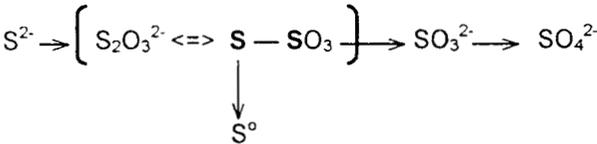


Figura 4.2.6. Ruta de oxidación biológica de tiosulfato.

En este sentido, los cambios que sufre la fuente de energía influirán en la acumulación prolongada de nitrito observada en condiciones de litoautotrofia, así mismo la presencia de tiosulfato y azufre elemental, permite suponer que este último se formaría siguiendo la vía de oxidación de tiosulfato mencionada. De acuerdo a los resultados obtenidos en el proceso en continuo, con acetato presente, y a las máximas velocidades de carga de sulfuro, fue más favorable al parecer la vía que conduce la oxidación hasta S⁰, sin presentarse acumulación de tiosulfato y tampoco nitrito. La oxidación de sulfuro a azufre elemental fue de 97% (Tabla 4.2.4). Sin embargo, mediante la hipótesis de la oxidación de tiosulfato, no queda claro el mecanismo que indujo a la formación de azufre elemental sin presentarse

concentraciones importantes de tiosulfato. Una posibilidad sería que la diferencia en condiciones definidas por el tipo de cultivo en continuo, con respecto a cultivo en lote, influye en la oxidación directa de sulfuro a azufre. Bajo las mismas condiciones, en cultivo en lote, se formó tiosulfato pero, de acuerdo al esquema, las vías para su oxidación resultarían fuertemente inhibidas.

Por otra parte, la oxidación de sulfuro a azufre en el reactor en continuo, se llevó a cabo sin detectarse presencia de nitrito. Por lo que, en este caso, se descarta la hipótesis de la influencia del nitrito en la formación de azufre elemental (Gommers, y col. 1988a).

4.3.3. Constantes de velocidad específica de consumo de sustrato y actividad desnitrificante.

A partir de los experimentos cinéticos llevados a cabo fueron estimadas las constantes de velocidad específica de consumo de sustrato y velocidad específica de formación de producto, esta última en términos del nitrógeno molecular producido y la biomasa presente, la cual expresa la actividad específica desnitrificante. En la Tabla 4.3.1 se incluyen los valores de velocidad específica de consumo de carbono orgánico ($Q_{C/X}$), de sulfuro ($Q_{S/X}$) y nitrato ($Q_{N-NO_3/X}$), así como la actividad específica desnitrificante ($Q_{N-N_2/X}$).

En presencia de acetato (Tab. 4.3.1. A), el consumo de C-orgánico se presentó a la misma velocidad con la cual se redujo el nitrato ($Q_{N-NO_3/X} = 1.9$ g/g BM.d). En presencia de sulfuro (Tab. 4.3.1.B), el valor para $Q_{S/X}$ de 5.3 g S/g BM.d podría suponer una mayor velocidad del proceso global, sin embargo la reducción de nitrato se llevó a cabo a una velocidad menor, 0.38 g N-NO₃/g BM.d, que con el acetato, por lo tanto, la actividad desnitrificante bajo condiciones de litoautotrofia se vio también disminuida.

Tabla 4.3.1. Velocidades específicas de consumo de sustrato en la desnitrificación, usando diferente donador de electrones; A) con CH_3COO^- , B) con S^{2-} y c) en presencia de ambos. En todos los casos el aceptor de electrones fue el NO_3^- .

	A	B	C
$q_{C/X}$, (g C·g ⁻¹ BM·d ⁻¹)	1.9	-	0.58
$q_{S/X}$ (g S·g ⁻¹ BM·d ⁻¹)	-	5.3	8.16
$q_{N-\text{NO}_3/X}$, (g N·g ⁻¹ BM·d ⁻¹)	1.9	0.38	1.06
$q_{N-\text{N}_2/X}$, (g N·g ⁻¹ BM·d ⁻¹)	0.3	0.0069	0.084

$q_{C/X}$, $q_{S/X}$ y $q_{N-\text{NO}_3/X}$, velocidades específicas de consumo de C- CH_3COO^- , S- S^{2-} y N- NO_3^- .
 $q_{N-\text{N}_2/X}$, velocidad específica de producción de N_2 .

Ikemoto-Yamamoto y col. (1999) encontraron un valor similar de velocidad específica de consumo de nitrato para un cultivo desnitrificante litoautótrofo, pero usando tiosulfato como fuente de energía. La biomasa utilizada provino de un reactor donde también la fuente de energía fue tiosulfato. En este trabajo, la biomasa fue estabilizada con un influente heterotrófico, lo cuál haría suponer que la velocidad específica de consumo de nitrato podría ser siempre mayor en heterotrofia, independientemente de las condiciones en que se lleve a cabo el crecimiento de la biomasa.

En presencia de ambos reductores (Tabla 4.3.1,C) los valores de las constantes específicas de consumo de nitrato ($q_{N-\text{NO}_3/X}$) y la actividad desnitrificante ($q_{N-\text{N}_2/X}$), se observa que mejoraron notablemente. En estos términos, los valores bajos de $q_{N-\text{NO}_3/X}$ y de $q_{N-\text{N}_2/X}$ en litoautotrofia, estarían relacionados con los cambios antes mencionados que sufre el donador de electrones (S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^0), pero el efecto adverso de estos cambios, podría minimizarse si se encuentra presente una fuente de energía adicional. Este mecanismo es una forma de cometabolismo, en la que se favorecería la actividad desnitrificante utilizando una fuente de energía alterna

como, por ejemplo, acetato o amonio (NH_4^+). Este último, para un proceso litoautótrofo no modificaría el carácter del medio de cultivo. Sin embargo sería conveniente evaluar entre usar una fuente de origen orgánico o inorgánico.

Al respecto, fue estudiado el efecto de una fuente reductora alterna, en forma de NH_4^+ , en un reactor desnitrificante UASB en condiciones de heterotrofia, encontrando que la velocidad de producción de nitrógeno aumentó de 84% a inclusive mayor a 100% (Cervantes, y col. 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mostrar que el consorcio microbiano presentó gran versatilidad, ya que en función de las condiciones ambientales, fue capaz de orientar su metabolismo a la oxidación de compuestos de azufre y al mismo tiempo para consumir compuestos nitrogenados, tanto en condiciones heterotróficas como litoautotróficas, lo cual refuerza la aportación de este trabajo en el sentido de que la desnitrificación representa una alternativa biológica para eliminar en forma simultánea materia orgánica, azufre y nitrógeno. Existe escasa información documentada de lo que sucede en la oxidación de compuestos de azufre, sus intermediarios y la influencia de la relación carbono/nitrógeno, en condiciones anóxicas. En este sentido, sería necesario avanzar también en el estudio de los mecanismos de oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre y su interacción con la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones de desnitrificación.

225551

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

En este trabajo, usando un consorcio microbiano, se puso en operación un reactor desnitrificante anaerobio heterotrófico de cultivo continuo. Una vez que alcanzó el régimen estacionario y manteniendo en la alimentación una relación C/N constante de 1.4, se evaluó el comportamiento del proceso, en presencia de sulfuro.

Las principales conclusiones son:

En condiciones de heterotrofia, a velocidad de carga de N-NO₃ de 203 mg/L-d, C/N 1.4, los cambios en la velocidad de producción de N₂ no fueron significativos 197.1 ± 5 mg/L-d, por lo que se concluye que la desnitrificación alcanzó el estado estacionario.

En régimen estacionario el consumo de los sustratos nitrogenados y carbonados alcanzaron eficiencias de 99% y 94%, respectivamente.

Los cambios de velocidad de carga de sulfuro no modificaron al proceso desnitrificante cuyo rendimiento (Y_{N_2}) fue de 0.84 ± 0.05 . Como el cálculo de Y_{N_2} es en términos de las velocidades volumétricas de producción de N₂ con respecto al N-NO₃ consumido, y las variaciones fueron poco significativas, entonces el reactor desnitrificante mantuvo el estado estacionario y el consumo eficiente de N-NO₃⁻. Sin embargo, la eficiencia de consumo de sustrato carbonado disminuyó de 94 a 64%.

La eficiencia de consumo de sulfuro, en función del aumento de su velocidad, aumentó gradualmente hasta casi 100%. A velocidades de carga de sulfuro menores a la mitad de la S/N_{estecq} (1.43), la eficiencia de eliminación de sulfuro llegó a 60%. Al aumentar el valor de la S/N hasta el valor estequiométrico, aumentó la eficiencia a 98%.

El sulfuro fue parcialmente oxidado, teniendo como producto final azufre elemental. La formación de azufre fue directamente proporcional al consumo de sulfuro.

El acetato fue la principal fuente de energía (y de carbono) y fue desplazado gradualmente por el sulfuro hasta un 33%. En consecuencia, la velocidad de acetato en el efluente aumentó de 18 a 93 mg/L-d.

A C/N de 1.08, sin afectarse el proceso desnitrificante, el consorcio microbiano fue capaz de oxidar el azufre acumulado hasta sulfato, con una recuperación del 97% en la eficiencia de consumo de acetato, lo que evidencia la capacidad de la biomasa para modificar su metabolismo ante cambios de condiciones ambientales.

El consorcio desnitrificante del reactor en continuo en régimen estacionario, fue utilizado para evaluar en lote la velocidad de consumo de sustratos y actividad desnitrificante. Se concluye:

Que la velocidad de reacción en el proceso desnitrificante, tanto con acetato, como con sulfuro, depende de la actividad enzimática de la biomasa presente. Por vía química el proceso ocurrió, en ambos casos, lentamente e incompleta.

En heterotrofia, empleando acetato como fuente de energía la velocidad específica de consumo de nitrato ($q_{N-NO_3 X}$) fue de 1.9 g N-NO₃ / g BM-d; en litoautotrofia, con sulfuro la $q_{N-NO_3 X}$ fue de 0.38 y; en presencia de ambas fuentes de energía el valor fue de 1.06 g N-NO₃ / g BM.d. La actividad específica desnitrificante ($q_{N-N_2 X}$) siguió la misma tendencia que las velocidades específicas, aunque con valores menores; 0.3, 0.0069 y 0.084 g N-N₂ / g BM-d, respectivamente. Como estos parámetros cinéticos afectan el proceso global, se concluye que el proceso más lento ocurre en condiciones litoautotróficas.

En litoautotrofia, se presentó una acumulación no significativa de intermediarios nitrogenados y el producto final principal de la oxidación de sulfuro fue sulfato.

COROLARIO

En presencia de sulfuro y acetato y en cultivo en lote, la oxidación de sulfuro fue incompleta debido a la concentración inicial alta de nitrato. En cultivo en continuo,

bajo ninguna de las velocidades de carga de sulfuro, en presencia de acetato y nitrato limitado, hubo acumulación de intermediarios y el producto final, a C/N de 1.4 fue N₂ y azufre elemental. Por lo tanto, el proceso desnitrificante en continuo es más eficiente para la eliminación simultánea de nitrato, acetato y sulfuro, que el sistema en lote.

Lo anterior aporta evidencias de que el proceso de desnitrificación puede ser una alternativa tecnológica para llevar a cabo la eliminación simultánea de sulfuro, materia orgánica y nitrato. Como la oxidación de sulfuro es sólo parcial hasta azufre elemental, la desnitrificación resulta atractiva como vía para la eliminación de sulfuro en forma de azufre insoluble, ya que en este modo se podría facilitar su separación del efluente.

RECOMENDACIONES.

En este trabajo, para no contar con un sistema heterogéneo (concentración y pH, principalmente), se utilizó un reactor mezclado. No obstante, a mayor escala, suelen emplearse bioreactores de biopelículas, de lecho fluidificado, o los de lechos de flujo ascendente (UASB), por lo que podría ser necesario abundar en el estudio del comportamiento en estos sistemas aplicando la información antes reseñada, considerando también la posibilidad de separar el azufre formado.

El azufre elemental, asociado a procesos biológicos, puede encontrarse en formas diferentes. Las bacterias lo pueden excretar y conservar en forma coloidal, pero también puede precipitarse. Algunos microorganismos lo acumulan en el interior de la célula, o bien lo pueden utilizar como núcleo de adhesión (medio de soporte), por lo que, para considerar la posibilidad de separar el azufre, se debe primero conocer las características del azufre producido y la forma en que se encuentra.

El acetato como se observó constituye un modelo adecuado de la materia orgánica en el estudio del proceso desnitrificante, sin embargo es conveniente evaluar otros compuestos orgánicos, como los del tipo fenólico, comúnmente presente en efluentes de proceso de refinación del petróleo. Asimismo, evaluar el comportamiento del proceso desnitrificante en presencia de azufre y de fuentes reductoras de los efluentes petroleros.

En el presente estudio se evaluó el efecto del sulfuro inorgánico en la forma de las especies disociadas HS^- y S^{2-} . Comúnmente la caracterización del sulfuro en los efluentes industriales es en términos de sulfuro total y se desconoce la fracción de sulfuro inorgánico y del orgánico. De igual forma no existe información documentada suficiente en cuanto al uso de este tipo de sulfuro como fuente de energía en el proceso desnitrificante. Este aspecto sugiere una perspectiva de estudio, ya que es posible que el tipo de compuesto asociado a la molécula del sulfuro pueda afectar su papel como fuente de energía, aunque también la parte orgánica podría ser, al mismo tiempo, fuente de carbono.

Las formas de sulfuro disociado en fase acuosa dependen del pH, por lo cuál la evaluación del proceso a diferentes valores de pH puede aportar información relevante del comportamiento de las especies azufradas, como donadores de electrones, en relación con el desempeño del lodo desnitrificante.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- Achtnich, C., Bak, F., Conrad, R. (1995). Competition for electron donor among nitrate reducers, ferric iron reducer, sulfate reducer and methanogens in anoxic paddy. *Biol. Fertil. Soils*. **19**: 65-72.
- Alcántara, S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfooxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- American Society for Testing and Materials (1992). ASTM-D 1426 – 89. Standard Methods for Ammonia Nitrogen in Water. Test Method B: Selective Ion Electrode. Annual Book of ASTM Standards. **11.01**: 331 - 333
- Anthonisen A. R., Loerh, R.C. Prakasam, T.B. Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *JWPCF*. **48**: 835-852.
- APHA (1985). Standard methods for examination of water and wastewater, 16th de. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Baker, L.A. (1998). Design considerations and application for wetland treatment of high-nitrate waters. *Wat. Sci. Tech.* **38**(1): 389 – 395.
- Barrenstein, A., Kramer, U., Obermann, P. (1986). Underground treatment of nitrate rich groundwater by infiltration with treated wastewater or methane rich natural gas. *DVGW-Schriftreihe, Wasser*. Frankfurt, Germany. **116**: 99-116.
- Bartlett, J.K., Skoog, D.A. (1954) Colorimetric determination of elemental sulphur in hydrocarbons, *Analytical Chemistry* **26**:(6). 1008-1011.
- Bell, L.C., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. (1990). Periplasmic and membrane-bound nitrate reductase in *Thiosphaera pantotropha*. *FEBS Lett.* **265**: 85-87.

- Bernet, N., Bizeau, C., Moletta, R., Cornier, J.C., Deguin, A. (1995). Study of physicochemical factors controlling nitrite build-up during heterotrophic denitrification. *Environ. Tech.* **16**: 165-172.
- Bock, E., Koops, H.P., Harms, H., Ahlers, B. (1991). The biochemistry of nitrifying organisms. In: Variation in autotrophic life, Shively, J.H. and Borton, L.L. eds. Academic Press, London. pp. 171-200.
- Cadena, F., and R. W. Peters. (1988). Evaluation of chemical oxidizer for hydrogen sulfide control. *JWPCF.* **60**: 1259-63.
- Cervantes F., Monroy O., Gómez J. (1999). Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentration (aceptado para publicación en *Biotechnology Letters*).
- Cervantes, F., Monroy, O., Gómez, J. (1999). Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Applied Biochem. and Biotech.* **81**: 13-22.
- Cuervo-Lopez F., Martínez, F., Gutierrez-Rojas, M., Noyola R.A., Gómez, J. (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* **40**:(8). 123-130.
- Cypionka, H., Smock, M.A., Böttcher M.E. (1998). A combined pathway of sulfur compound disproportionation in *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEMS Microbiology Letters.* **166**:(2). 181-186.
- Chang R. (1998). Acidos y bases. En: Química.. 6ª. Ed. McGraw Hill. Cap. 15. pp. 616-624.
- Dawes, W.I. and Sutherland, W.I. (1992). Population growth and death. In: Microbial physiology. 2nd. Ed. Blackwell Scientific Publ. pp. 49-56.
- Day, R.A., Underwood, A.L. (1989). Aplicaciones de las titulaciones de oxidación-reducción. En: Química Analítica Cuantitativa. 11a. Ed. Prentice Hall Hispanoamerica, S.A. pp. 359-365.

- Driscoll, C.T., and Bisogni J.J. (1978). The use of sulfur and sulfide in packed-bed reactors for autotrophic denitrification. *JWPCF*. **50**:(3). 569-577.
- Eirlensen, A. M., Henze, M., Kloft, L. (1994). Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Wat. Res.* **28**: 1329-1336.
- Fass, S., Ganaye, V., Urbain, V., Manem, J., Block, J.C. (1994) Volatile fatty acids as organic carbon sources in denitrification. *Environ. Tech.* **15**: 459-467.
- Flere, M.J., Zhang, T.C. (1998). Sulfur-based autotrophic denitrification pond systems for *in-situ* remediation of nitrate-contaminated surface water. *Wat. Sci. Tech.* **38**: (1). 15-22.
- Foroulis, Z.A. (1993). Role of solution pH on wet H₂S cracking in hydrocarbon production. *Corrosion, Prevent. & Control*. August.
- Friedrich, C. G., and Mitrenga, G. (1981). Oxidation of thiosulphate by *Paraccocus denitrificans* and other hydrogen bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **10**: 209-212.
- Garuti, G., Dohanyos, M. Tilche, A. (1992). Anaerobic-aerobic wastewater treatment system suitable for variable populations in coastal areas: The ANANOX process. Wastewater management in coastal areas. In: Proc. Of March 31st-April 2nd 1992. pp. 229-239.
- Glockner, A.B., Jungst, A. Zumft, W.G. (1993). Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureaofaciens* is functional in a mutually cytochrome cd₁-free background (Nirs) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* **160**: 18-26.
- Gómez, H.G.J. (1994). Obtención de microfloras nitrificantes. Nitrificación en diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Gómez, J., Méndez, R., Lema, J. (1996). The effect of antibiotics on nitrification process: Batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**: 869-876.

- Gommers, P. J., Buleveld, W., Zuiderwijk, F.J., Kuenen, J. Gijs. (1988a) Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Wat. Res.* **22**:(9). 1075-1083.
- Gommers, P. J., Buleveld, W., Zuiderwijk, F.J., Kuenen, J. Gijs. (1988b) Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Wat. Res.* **22**:(9). 1085-1092.
- Halling-Sørensen B. and Jörgensen, S. (1993). Process chemistry and biochemistry of denitrification. In: The removal of nitrogen compounds form wastewater. Eds. Elsevier, Netherlands. pp. 119-152.
- Hammond, C.A. (1986). The Dow Stretford Chemical Recovery Process. *Environ. Progr.* **5**. 1-4.
- Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**: 297-302.
- Haverhoek, S., Koning, J., van Staveren, N.A., de Ruyter, M.A. (1997). Advanced treatment of effluents from an agrochemical formulation plant. *Wat. Sci. Tech.* **35**:(10). 155-163.
- Heisel, M.P., Marold, F. J. (1987). New gas scrubber removes H₂S. *Hydrocarbon Process.* April. 35-37.
- Hendriksen, H.V. and Ahring, B.K. (1996). Integrated removal of nitrate and carbon in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor: Operating performance. *Wat. Res.* **30**:(6). 1451-1458.
- Huxtable, J. Ryan. (1986). The reduction of sulfate and the oxidation of sulfide. In: Biochemistry of sulfur. Ed. Plenum, New York. pp. 11-26
- Ikemoto-Yamamoto, R., Komori, T., Nomura, M., Ide, Y., Matzukami, T. (1999). Nitrogen removal of hydroponic culture wastewater by sulfur denitrification. (Abstract). *Kankyo Gijutsu.* **28**:(6). 419-426.
- Jensen A.B., Webb C. (1995). Treatment of H₂S-containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 2-10.

- Jetten, M.S.M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L.A., de Vries, S., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.C. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *A. Van Leeuwenhoek* **71**: 75-93.
- Kelly, D.P. (1988). Physiology and biochemistry of unicellular sulfur bacteria. *In*: Autotrophic bacteria. Schlegel, H.G. Bowien, B. Science Tech. Publishers, Madison. WI. pp. 193-218 .
- Koenig, A., Liu, H.L. (1996). Autotrophic denitrification of landfill leachate using elemental sulphur. *Wat. Sci. Tech.* **34**: (5-6), 469-476.
- Kroneck, P.M., Beuerle, J., Schumacher, R.W. (1992). Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds. *In*: Metal ions in biological systems. Siegel, H. And Siegel, A. Eds. Marcel Dekker Inc., USA. 28. pp. 455-505.
- Lesley, A., Robertson L.A., Kuenen J. G. (1992). The colourless sulfur bacteria. *In*: The Prokaryotes. 2nd Ed. Springer-Verlag. I:16. pp. 385-412.
- Li, S.F.Y. (1993). Capillary electrophoresis – principle, practice and applications. Elsevier, Netherlands. pp. 797.
- Madigan M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (1998). Ecología Microbiana. Ciclos biogeoquímicos: Nitrógeno y azufre. *En*: Brok, Biología de los microorganismos. Ed. Prentice Hall, Inc. Cap. 14: pp. 571-574.
- Matejů, V., Cizinská, S., Krejčci, J., Janoch, T. (1992) Biological water denitrification – a review . *Enzyme Microb. Tech.* **14**. 170-183.
- Merck and Co. Inc. (1996). 8830, Sodium sulfide. *In*: The Merck Index.12th. Ed. pp. 1483.
- Mulder, A. (1982). Process for the purification of waste water and/or waste water sludge. European Patent Appl. EP. 00518888A1. <http://ep.espacenet.com>.
- Nelson, D.C., Castenholz, R. W. (1981). Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa sp.* *Journal of Bacteriology* **147**: 140-154.

- Oenema, O., Roest. C.W.J. (1998). Nitrogen and phosphorus losses from agriculture into surface waters; The effects of policies and measures in The Netherlands. *Wat. Sci. Tech.* **37**:(2). 19-30.
- Otten, S., Grobden, N.G., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G. (1996). Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:(7). 2421-2426.
- Percheron, G., Michaud, S., Bernet, N., Moletta R. (1998). Nitrate and nitrite reduction of a sulphide-rich environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **72**: 213-220.
- Pérez T.J. (1998). Estudio y Evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Ramalho, R.S. (1989). Tertiary treatment of wastewaters. Nutrient Removal. In: Introduction to wastewater treatment process. Academiv Press, Inc. pp. 391-397.
- Robertson, L.A., and Kuenen, J.C. (1983). *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *Journal of General Microbiology* **129**: 2847 - 2855.
- Rushbrook, E. Jr. And Urban A.R. (1998). A look at lagoons. New Ammonia limits. *Water Env. & Tech.* **10**:(1). 34-38.
- Schomburg, G. (1990). gas chromatography – a practical course. VCH, Federal Republic of Germany. pp 320.
- Schönharting, B., Rehner, R., Merzger, J.W., Krauth, Kh., Rizzi M. (1998). Release of nitrous oxide (N₂O) from denitrifying activated sludge caused by H₂S-containing wastewater: Quantification and application of a mew mathematical model. *Wat. Sci. Tech.* **38**:(1). 237-246.

- SEMARNAP (1997). Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. *Diario Oficial de la Federación*. Enero, 1997.
- Shigeru, O., Tadashi, O., Susumu, T. (1992). Biochemical aspects of microbial oxidation on inorganic sulfur compound. *In* Sulfur Chemistry: Biochemical Aspects. CRC. Press. pp. 6-12.
- Shimadzu Co. Instruction manual. Total Organic Carbon Analyzer, Model TOC-5000A.
- Stefess, G.C., Kuenen, J.C. (1989). Factors influencing elemental sulfur production from sulfide or thiosulphate by autotrophic thiobacilli. *Forum Mikrobiologie* 12:(92).
- Stuedel, R. (1989). On the nature of the “elemental sulfur” produced by sulfur-oxidizing bacteria – a model for S⁰ globules -. *In*: Biology of autotrophic bacteria. Schlegel, H.G., Bowien, B., Eds. Science Tech. Publ., Madison and Springer Verlag. pp. 289-303.
- Stuedel, R. (1996). Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 35: 1417-23.
- Stuedel, R., Holdt, G., Göbel, T., Hazeu, W. (1987). Chromatographic separation of higher polythionates S_nO₆²⁻ (n=3...22) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*; Molecular composition of bacterial sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26: 151-153.
- Stouthamer, A.H. (1988). Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds. *In*: Biology of anaerobic microorganisms. Zehnder, A.J.B. ed. Wiley-Liss, USA. pp. 245-303.
- Sublette, K.L. and Sylvester, N.S. (1987). Oxidation of hydrogen sulphide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfuration of natural gas. *Biotech. Bioeng.* 29. 249 – 257.

- Suzuki, Y., Dulart, V., Kwok, S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cell and extracts. *J. Bacteriol.* **120**: 556-568.
- The Stretford Process: A clean bill of health. *Sulphur* (1994). **233**. 47-52.
- Thomsen, J.K., Geest, T., Cox, R.P. (1994). Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:(2). 536-541.
- Trouve C., Chazal P.M., Gueroux B., Sauvaitre N. (1998). Denitrification by new strains of *Thiobacillus denitrificans* under non-standard physicochemical conditions. Effect of temperature, pH, and sulphur source. *Environ. Tech.* **19**: 601-610.
- US – Peroxide (2000). Sulfide oxidation using hydrogen peroxide
<http://www.h2o2.com/applications/industrialwastewater/sulfideoxidation.html>. Actualización. 5/01/00.
- Van de Graaf, A., Mulder, A., Robertson, L., Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**: 177-184.
- Van den Ende, F., Meier, J., Van Gemerden, H. (1997). Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 65-80.
- Van den Ende, F.P. and Van Gemerden, H. (1993). Sulfide oxidation under oxygen limitation by *Thiobacillus thioparus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 69-78.
- Varian Associates, Inc. (1996). User's Guide. Varian Gas Chromatographs.
- Wang, J.H., Baltzis, B.C., Lewandoski, G.A. (1995). Reduction of nitrate and nitrite in a cyclically operated continuous biological reactor. *Biotech. Bioeng.* **46**:(2). 159-171.
- Watson, S.W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.p., Hooper, A.B. (1989). Nitrifying bacteria. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. William and Wolkins. Baltimore. USA. **3**. pp. 1807-1834.

- Witch, H. (1996). A model for predicting nitrous oxide production during denitrification in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* **34**: (5-6). 99-106.
- Witch, H. and Beier, M. (1995). N₂O-Emissionen aus nitrifizierenden und denitrifizierenden Kläranlagen. *Korr. Abw.* **3**:(42). 404-413.
- Xiushan, Y., Garuti, G., Tilche, A. (1993). Denitrification with *Thibacillus denitrificans* in the ANANOX process. *Biotech. Letters.* **15**:(5). 531-536.

ANEXO

ANEXO.

“SIMULTANEOUS BIOLOGICAL REMOVAL OF NITROGEN, CARBON
AND SULFUR BY DENITRIFICATION”.

Trabajo presentado en el Congreso:

SEVENTH ANNUAL INTERNATIONAL PETROLEUM. Environmental Conference.

Albuquerque, New Mexico. USA. November 7-10, 2000.

SIMULTANEOUS BIOLOGICAL REMOVAL OF NITROGEN, CARBON AND SULFUR BY DENITRIFICATION

Jesús Reyes-Avila⁽¹⁾, Elías Razo-Flores⁽¹⁾ and Jorge Gómez H.⁽²⁾

⁽¹⁾Instituto Mexicano del Petróleo, Programa de Biotecnología del Petróleo
Eje Central Lázaro Cárdenas 152, C. P. 07730, México D.F.

⁽²⁾Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, División CBS
Av. Michoacán y Purísima s/n, C.P. 09340, México D.F.

E-mail: jravila@imp.mx

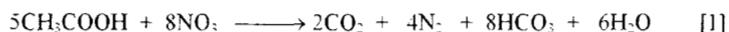
ABSTRACT

Refinery wastewaters represent a complex problem due to the presence of aromatic compounds, generally of low solubility and recalcitrant. Additionally, these streams contain high concentrations of sulfide and ammonium. Consequently, the effluents have to be treated to eliminate carbon, nitrogen and sulfur (NCS). In this work, biological denitrification was used to eliminate NCS in an anaerobic continuous stirred tank reactor of 1.3L under steady state. Nitrate (NO_3^-) and acetate (CH_3COO^-) were used as carbon and nitrogen source and fed at loading rates of $0.29 \text{ Kg C/m}^3\text{-d}$ and $0.2 \text{ Kg N/m}^3\text{-d}$, respectively, giving a C/N ratio of 1.4. The hydraulic retention time was 2 d. During the steady state denitrification the carbon and nitrogen removal efficiency was higher than 90%. Under these conditions, sulfide (S^{2-}) was feed to the reactor at several sulfide loading rates (0.044 to $0.295 \text{ Kg S/m}^3\text{-d}$). The denitrification process held its high nitrates removal efficiency, whereas carbon removal decreased to 65%. On the contrary, sulfide removal increases up to reach almost 100% via partial oxidation to elemental sulfur (S^0). These results indicate that denitrification is a feasible process for simultaneous removal of NCS.

INTRODUCTION

Refinery waste streams represent a complex environmental problem due to the presence of high concentrations of both organic compounds such as phenolics, and inorganic compounds like sulfide and ammonium. The simultaneous biological removal of these compounds is a necessary process. Sulfide in wastewater must be treated because it is toxic at low concentrations (Maximum acceptable concentration 10 mg/m^3), is corrosive, has a high oxygen demand and a very unpleasant odour (threshold value $0.005\text{-}0.20 \text{ mg/m}^3$). It can be removed by chemical methods, but these are expensive and may generate other wastes. Buisman *et al.* (5) described a biotechnological process in order to convert sulfide almost stoichiometrically to elemental sulfur.

In order to remove nitrogen compounds from wastewater, biological nitrification and denitrification are frequently used (14, 16). Complete denitrification involves the reduction of nitrate (NO_3^-) via NO_2^- , NO , N_2O to elemental nitrogen (N_2) and requires an electron donor. Under heterotrophic conditions, organic compounds such as methanol, glucose, lactose and acetate are used both as carbon source and electron donors (1). The stoichiometric reaction of acetate under denitrifying conditions is as follows:



It is known that denitrification can proceed under lithotrophic conditions with microorganisms that are able to grow using reduced sulfur compounds as energy source. There are evidences indicating the treatment of wastewater bearing nitrate with *Tiobacillus denitrificans* using elemental sulfur as electron donor (9, 15). Hence, nitrate was reduced to molecular nitrogen (N_2) at a very low C/N ratio, indicating the lack of organic material, meaning that the process was conducted under autotrophic conditions. Similar studies have been conducted with sulfide (8, 13). The following stoichiometric reaction defines the complete biological oxidation of sulfide to sulfate in presence of nitrate (13):



Based on this reaction, it is evident that the process is lithotrophic and autotrophic as the carbon source is CO_2 . However, it is not clear if this reaction could proceed in presence of organic material (e.g. in the case of refinery effluents).

The denitrifying mechanism under heterotrophic conditions has been reported (4, 7). However, there is scarce information about the effect of both organic material and sulfide on the denitrification process in steady state and heterotrophic conditions. Gommers *et al.* (11) used a fluidized bed reactor to study the effect of sulfide and acetate on the denitrification, under limited conditions of both substrates. The authors observed that nitrate removal was partial as nitrite accumulated in the system. On the contrary, acetate was consumed at high efficiencies whereas sulfide was completely oxidized to sulfate.

As denitrification is a Redox process, the thermodynamics of the reactions involved (using acetate and sulfide), should influence the overall efficiency of the

process. In the same way, the biological activity of the biomass will determine the rate of the biological reaction.

This paper describes the biological removal of nitrogen (nitrate), carbon (acetate) and sulfur (sulfide) under denitrifying conditions in steady state conditions. First, a continuous stirred tank reactor for denitrifying under heterotrophic conditions, at a C/N ratio of 1.4, was operated under heterotrophic conditions at a C/N ratio of 1.4. After the reactor reached steady state, sulfide was fed to the reactor at several sulfide loading rates tanking the efficiencies and yields. Batch experiments were conducted measuring the biological specific removal rates and the influence of the abiotic reactions.

MATERIALS AND METHODS

Analytical methods

Nitrate, nitrite, thiosulfate and sulfate were measured using a capillary electrophoresis ion analyzer (WatersMillipore 4000). An ammonia-specific electrode (Phoenix) measured ammonium concentration. N_2 , N_2O , CO_2 and CH_4 were analyzed by gas chromatography (Varian Star3400) thermal conductivity detector under the following conditions: column, detector and injector temperatures were 35, 110 and 100°C, respectively, and sample volume was 50 μ L mL. To determine organic carbon, samples were centrifuged at 12000 rpm for 10 min and were quantified by a total organic carbon analyzer (Shimadzu TOC analyzer TOC-5000). Elemental sulfur was extracted in acetone and analyzed by cyanolysis (3). Total sulfide was quantified iodometrically having in account the possible thiosulfate interference (2). Biomass was analyzed using APHA standard methods (2).

Experimental denitrifying reactor

An anaerobic continuous stirred tank reactor (Aplikon) was used with a working volume of 1.3 L (Figure 1). The reactor was instrumented to control influent and effluent, temperature (30°C), stirring (250 rpm) and pH (8.3 \pm 0.2). Gas production rate was measured in a calibrated column by liquid displacement. The reactor was inoculated with 0.13 L of methanogenic sludge giving a biomass concentration inside the reactor of 1.75 g/L of volatile suspended solids (VSS).

Nitrate and acetate were the nitrogen and carbon source and were added to the reactor in separated way together with the elements of the medium as follows: contained (g/L): *Medium 1*) CH_3COONa ($3H_2O$), 12.5; $CaCl_2$ ($2H_2O$), 1.0; Na_2MoO_4 ($2H_2O$), 0.05; $CuSO_4$ ($5H_2O$), 0.015. *Medium 2*) $NaNO_3$, 7.6; KH_2PO_4 , 1.5; $MgSO_4$ ($7H_2O$), 1.45; $FeCl_3$ ($6H_2O$), 0.01; $CuSO_4$ ($5H_2O$), 0.015. The influent flow was 0.22 L/d (2 x 0.22 L/d) and the effluent flow was 0.44L/d. The hydraulic retention time was (HRT) 2 d and the pH value was kept at 7.1. The reactor was operated for 90 days.

Denitrifying reactor fed with sulfide

Sodium sulfide ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) was dissolved in Medium 1 and used as the sulfide source. It was fed to the reactor at a fix C/N ratio of 1.4. Carbon and nitrogen loading rates were 303 mg C- $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{L}\cdot\text{d}$ and 209.4 mg N- $\text{NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{d}$, respectively. The pH was adjusted and controlled at 8.5. This pH value was selected to avoid H_2S stripping. At this pH, the HS^- and S^{2-} the non-volatile species predominate in solution (10). Due to the reaction of sulfide with certain metals and the possible production of sulfate, adjustments were made to the medium. Sulfate ($\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$) concentration was reduced from 0.8 g/L to 0.5 g/L and 0.48 g/L of $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were also added. The metals were added in Medium 2 to avoid precipitation. Five sulfide loading rates were applied to the reactor based on the stoichiometry of reaction [2]: 42.2, 83.6, 167.1, 258.3 and 294 mg $\text{S}^{2-}/\text{L}\cdot\text{d}$. The last value is equivalent to the S/N stoichiometric ratio of 1.43. The HRT applied during the reactor operation with sulfide was 2 d.

Batch experiments

Two kinds of batch experiments were conducted in order to determine the effect of the biotic and abiotic transformations, and the biological specific consumption rates. The transformation measurements were conducted in 120 mL vials sealed with butyl rubber stoppers. 100 mL of mineral medium were used with the following basal chemical composition (g/L): $\text{CaCl}_2\cdot(2\text{H}_2\text{O})$, 0.09; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot(2\text{H}_2\text{O})$, 0.005; $\text{MgCl}_2\cdot(6\text{H}_2\text{O})$, 0.044; $\text{CuSO}_4\cdot(5\text{H}_2\text{O})$, 0.002; KH_2PO_4 , 0.12; $\text{MgSO}_4\cdot(7\text{H}_2\text{O})$, 0.02; $\text{FeCl}_3\cdot(6\text{H}_2\text{O})$, 0.0008; $\text{CuSO}_4\cdot(5\text{H}_2\text{O})$, 0.002. 12 mL of inoculum from the continuous denitrifying reactor was added to each vial, giving a final concentration of 1.45 g SSV/L. Shaking of 95 rpm, pH of 8.5 and 30°C were established. The assays were conducted in presence and absence of sulfide. Sodium sulfide ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), nitrate (NaNO_3) and carbonate (NaHCO_3) concentrations of 104 mg S^{2-}/L , 73 mg N- NO_3^-/L and 0.065 g/L, respectively, were employed. Without sulfide, acetate ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) and nitrate (NaNO_3) concentrations of 102 mg C- $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{L}$ and 73 mg N- NO_3^-/L , respectively, were added. The influence of the biotic transformations was evaluated measuring the changes in the substrate concentration. Blanks without biomass were assessed to measure the abiotic transformation.

After the continuous experiments, specific biological consumption rates were assessed in the 1.3 L reactor in batch mode using similar conditions as previously described above. The denitrification process was evaluated under the following conditions: a) under heterotrophic conditions with acetate and nitrate at 102 mg C- $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{L}$ and 73 mg N- NO_3^-/L , respectively; b) under autotrophic conditions with sulfide at 104 mg S- S^{2-}/L and nitrate at the same concentration used in (a); c) with acetate, sulfide and nitrate at the same concentrations of (a) and (b).

RESULTS AND DISCUSSION

Denitrifying reactor operation under steady state

The reactor was initially operated under denitrifying conditions with acetate as a carbon source and electron donor. After 20 days the system reached a very low residual concentrations of nitrate and acetate in the reactor effluent, and the N_2 was the main product. In Table 1 are presented the operating conditions and results obtained. In this period, $N-NO_3^-$ reduction rate reached almost 90% whereas denitrifying yield ($g N_2/g N-NO_3^-$) was 0.93 with a N_2 production rate of 132 mg/L-d with a 7% variation. Therefore, as the variations in rate were low the denitrifying was in steady state conditions. During this period the accumulation of intermediates such as nitrite (NO_2^-) and nitrous oxide (N_2O) was not detected. NH_4^+ was eventually detected at very low concentrations (equivalent to 3% of the $N-NO_3^-$ load). Regarding the carbon source, a carbon load of 303 mg $C-CH_3COO/L-d$ was applied to the system obtaining a carbon consumption rate as high as 94%. The fraction of carbon ($C-CO_2$) in the gas produced was very low (3.3%) of the carbon consumed due to its solubilization in the liquid phase. The initial concentration of the biomass in the reactor was 1.7 g/L increasing to an average of 2.4 g/L under steady state conditions.

Evaluation of the denitrifying process in presence of sulfide

After the reactor was operated for 90 days in steady state sulfide was added to the reactor at different loading rates. The results are shown in Table 2. At the run 1, 2 and 3 (42.2, 83.6 and 167.1 mg $S^{2-}/L-d$) produced very low sulfide oxidation efficiencies. However, as the S/N ratio was increased till the stoichiometric (1.43, according to reaction 2), the sulfide oxidation efficiency reached almost 100%. Surprisingly, in all the cases sulfide oxidation was incomplete as elemental sulfur was produced instead sulfate. Elemental sulfur produced was accumulating in the reactor. Although high sulfide loading rates were applied, the denitrification efficiency remained as high as 97%, since the $N-NO_3^-$ in the influent was reduced to N_2 . A low fraction of gas nitrous oxide (N_2O) was detected accounting for 3% of the influent nitrogen. As the denitrifying rate remained with low variation the reactor operated under steady state conditions. Moreover, the denitrifying yield ($g N_2/g N-NO_3^-$) was held practically.

As observed in Figure 2, the sulfide loading rates applied did not modified the denitrification yield. However, carbon consumption efficiency did. Based on this fact, it was presumed that sulfide substituted acetate as electron donor. To support this hypothesis, the amount of nitrate reduced by acetate (heterotrophic conditions) and sulfide (lithotrophic conditions) was calculated from the experimental data and the corresponding stoichiometric reactions. Results indicated that acetate is the main electron donor as reduced 72% of $N-NO_3^-$ at a rate of 137.3 mg $C-CH_3COO/L-d$ under the highest sulfide loading (feed 5). The 28% left of nitrate (58 mg $N-NO_3^-/L-d$) was used to oxidize 287 mg $S^{2-}/L-d$, producing elemental sulfur (S^0) that was accumulated inside the reactor as shown in Figure 3.

Batch experiments under biotic and abiotic conditions

The Gibbs free energy ($\Delta G'$) associated to the oxidation of acetate (-996.34 kcal/mol) or sulfide (-930 kcal/mol) in presence of nitrate are exergonic. In this way, it is clear that thermodynamics of the reaction mainly influencing to the equilibrium constant. However, another factor is the intrinsic biological activity of the denitrifying biomass does also influence the rate of the reaction. In this way, is important to evaluate the specific biological transformation rate of the substrates (nitrate, acetate and sulfide) as well as the degree of relevance of the chemical reactions.

Batch assays under heterotrophic conditions with acetate as electron donor indicated that the denitrifying biomass consumed completely both nitrate and acetate in a period of 18 h, whereas the depletion of both compounds in the abiotic controls were 4.5 and 15%, respectively, in the same period of time (Table 3). In a similar experiment under lithotrophic conditions with sulfide and nitrate as substrates, biological removal of both compounds was almost complete in 18 h. On the other hand, 17% sulfide transformation and 100% partial reduction of NO_3^- to NO_2^- was obtained by abiotic conditions, indicating that chemical reactions proceeded at very low rate and were incomplete. Thus denitrification process was driven by biomass activity, as the biological conversions were higher than the abiotic conversions.

Specific consumption rates of acetate (q_{C-N}), sulfide (q_{S-N}), nitrate (q_{N-NO_3-N}), as well as the denitrifying activity (q_{N-N_2-N}) in terms of molecular nitrogen produced, were also measured and results are shown in Table 4. Three series of experiments were conducted: with acetate (heterotrophic conditions), with sulfide (lithotrophic conditions) and with both compounds as electron donors. In all the cases nitrate was the electron acceptor. In the first case, the specific rates determined were equal for nitrate and acetate ($q_{C-N} = 1.9 \text{ Kg C/Kg BM-d}$). In the second case (sulfide-nitrate), q_{S-N} is almost three times higher ($5.3 \text{ Kg S}^0/\text{Kg BM-d}$) than in the previous case indicating a presumable faster global process. However, as the specific nitrate consumption rate (q_{N-NO_3-N}) was lower respect to the first case, in consequence, the specific denitrifying rate (q_{N-N_2-N}) was also reduced. Sulfide and nitrate were established in order to completely oxidize sulfide to sulfate. In previous batch experiments under lithotrophic conditions using sulfide as electron donor (results not shown), it was observed that sulfide oxidation proceeded in two steps: sulfide was oxidized first to elemental sulfur (S^0) producing thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) as intermediate. This reaction was faster than the second one where elemental sulfur was completely oxidized to sulfate. These results are similar to the reported by Gommers et al. (12), indicating that the low specific nitrate consumption rate (q_{N-NO_3-N}) obtained could be associated to an energy availability deficiency due to the second sulfide oxidation step ($\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4$).

In the third case using acetate and sulfide as electron donors, the specific consumption rates of sulfide (q_{S-N}), nitrate (q_{N-NO_3-N}), as well as the denitrifying activity (q_{N-N_2-N}) increased slightly, indicating that the presence of an alternative electron donor like acetate could enhance the efficiency of the autotrophic denitrification under specific conditions.

CONCLUSIONS

The results of this work demonstrated that the denitrification process is a feasible way for the simultaneous removal of sulfide, organic material and nitrate. Sulfide was eliminated via partial oxidation to elemental sulfur that accumulated inside the reactor without any interference on the process. It was demonstrated that the rate of the denitrifying process, either with acetate or sulfate depends upon the enzymatic activity of the biomass. Chemically the transformation reactions proceed uncomplete and at low rate. Acetate is a good model of organic material to study the process of denitrification in presence of sulfide. However, it is convenient to study the process using an organic compound, e.g. aromatic compounds commonly present in effluents of the petrochemical industry. Additionally, the study of both the potential redox of the system and the specific biological transformation rates should improve the efficiency of the process under defined conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the IMP-FIES project 98-90-IV.

REFERENCES

1. Akunna, J.C., Bizeau, C., Moletta. "Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: ammonification, denitrification and methanogenic activities". *Environ. Tech.* **15**: 41-49. (1994).
2. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th edition. American Public Health Association, New York, USA. (1989).
3. Bartlett, J.K., Skoog, D.A. "Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons". *Analytical Chemistry*, **26**: 6, 1008-11. (1954).
4. Betlach, M.R., Tiedje, J.M. "Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification". *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 1074-84. (1981).
5. Buisman, C.J., Ijspeert, P., Geraatss, S., Lettinga, G. Biotechnological process for sulphide removal with sulfur reclamation. *Acta Biotechnol.* **9**: 271-283. (1989)
6. Cadena, F., Peters, R. W. "Evaluation of chemical oxidizer for hydrogen sulfide control". *J. Water Pollut. Control Fed.* **60**: 1259-63. (1988).
7. Cervantes, F., Monroy, O., Gómez, J. "Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions". *Appl. Biochem. Biotechnol.* **81**: 13-21. (1999).
8. Driscoll, C.T., Bisogni J.J. "The use of sulfur and sulfide in packed-bed reactors for autotrophic denitrification". *J. Water Pollut. Control Fed.* **50**, 3, 569-577. (1978)
9. Flere, M.J., Zhang, T.C. "Sulfur-based autotrophic denitrification pond systems for *in-situ* remediation of nitrate-contaminated surface water". *Wat. Sci. Technol.* **38**: (1), 15-22. (1998)
10. Foroulis, Z.A. "Role of solution pH on wet H₂S cracking in hydrocarbon production". *Corrosion. Prevent. & Control.* August. (1993).

11. Gommers, P. J., Buleveld, W., Zuidervijk, F.J., Kuenen, J. Gijss. (1988a) Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Wat. Res.* **22**, 9, 1075-83.
12. Gommers, P. J., Buleveld, W., Zuidervijk, F.J., Kuenen, J. Gijss. (1988b) Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Wat. Res.* **22**, 9, 1085-92.
13. Halling-Sørensen B, Jörgensen, S. "Process chemistry and biochemistry of denitrification". In: The removal of nitrogen compounds from wastewater. Eds. Elsevier, Netherlands, 119-152. (1993).
14. Hanaki, K., Polprasert, C. "Contribution of methanogenesis to denitrification with an upflow filter". *J. Water Pollut. Control Fed.* **61**, 9, 1604-11. (1989).
15. Koening, A., Liu, H.L. "Autotrophic denitrification of landfill leachate using elemental sulphur". *Wat. Sci. Tech.* **34**: (5-6), 469-76. (1996).
16. Matejů, V., Cizinská, S., Krejčí, J., Janoch, T. "Biological water denitrification – a review". *Enzyme Microb. Tech.* **14**, 170-83. (1992)
17. Mulder, A. "Process for the purification of waste water and/or waste water sludge". European Patent Appl. EP - 00518888A1. (1982). <http://ep.espacenet.com>.
18. Studel, R. "Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes". *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**, 1417-23. (1996).

Table 1. Characteristics of the denitrifying reactor operating under steady state.

Parameter	Loading rates	
	Input	Output
NO ₃ -N, mg/L-d	209.3	0.3
CH ₃ COO-C, mg/L-d	303.2	12.2
NO ₂ -N, mg/L-d	0	0
NH ₃ -N, mg/L-d	0	<5
N ₂ O -N, mg/L-d	--	0
N ₂ , mg/L-d	--	197.1
NO ₃ -N Reduction efficiency. (%): 99.8 ±0.07		
CH ₃ COO-C Consumption efficiency. (%): 94 ±5.5		
Denitrifying yield (Y _{N₂/NO₃}): 0.93 ±0.05		
Biomass, VSS g/l: 2.7		

Table 2. Sulfide, nitrate and acetate transformations under different sulfide loading rates applied to the reactor.

# Feed	Q- S ²⁻ , mg/L-d		Y-SO ₄ ⁻	Y-N ₂	Y-N ₂ O	Q-C.organic, mg/L-d	
	Input	Output				Output	C.E. %
	0	0	0	0.94	0.00	12.2 ±4.1	94.0
1	42.2	31.6 ±6.7	0	0.83	0.006	37.3 ±7.5	87.7
2	83.6	56.5 ±2.6	0	0.84	0.002	70.6 ±12.9	76.7
3	167.1	67.1 ±15.3	0	0.8	0.03	110.6 ±22.6	63.5
4	258.3	12.9 ±7.0	0	0.8	0.013	113.7 ±11.4	62.5
5	294	7.0 ±2.3	0	0.83	0.0001	92.7 ±8.2	64.4

NO₃-N: 209.4 mg/L-d
 CH₃COO-C: 303 mg/L-d

Y-: Yield (Product/Sustr. consumed)
 C.E.: Consumption Efficiency

Table 3. Effect of the biomass and chemical activity in the denitrification using: (A) Acetate-nitrate: ratio C/N 1.4, (B) Sulfide-nitrate: ratio S/N 1.43. in batch experiments.

Time, hrs	Concentration changes of C-org., S ²⁻ and NO ₃ ⁻ .			
	A		B	
	With biomass	Abiotic control	With biomass	Abiotic control
	C-organic, mg/L		S ²⁻ , mg/L	
0	102	102	104	104
18	0.7	97	0	86
66	--	--	0	86
	NO ₃ -N, mg/L		NO ₃ -N, mg/L	
0	73	73	73	73
18	0	62	6.8	0
66	--	--	0	0
	NO ₂ -N, mg/L		NO ₂ -N, mg/L	
0	0	0	0	0
18	0	5	26	70.2
66	--	--	6	71

Table 4. Specific substrate conversion rate in the denitrification, using different electron donor: A) Acetate. B) Sulfide and C) Acetate and sulfide. In all the cases the electron acceptor was nitrate.

	A	B	C
$q_{C-org.}$ (C Kg /BM Kg.d)	1.9	-	0.58
$q_{S^{2-}}$ (S Kg /BM Kg.d)	-	5.3	8.16
q_{N-NO_3-N} (N Kg /BM Kg.d)	1.9	0.38	1.06
q_{N-NO_2-N} (N Kg /BM Kg.d)	0.3	0.0069	0.084

$q_{C-org.}$, $q_{S^{2-}}$ y q_{N-NO_3-N} : Specific conversion rate of C-org., S-S²⁻ y N-NO₃⁻
 q_{N-NO_2-N} : Specific production rate of N₂ (Denitrifying activity).

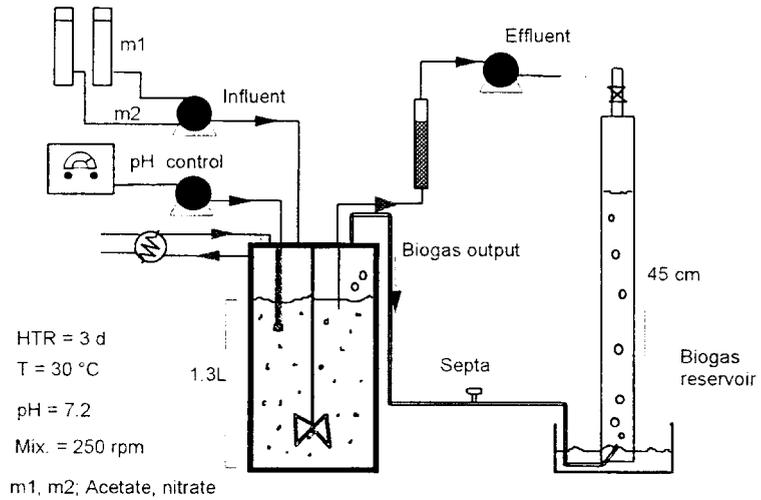


Figure 1. Scheme of the denitrifying continuous stirred reactor used in the experiments.

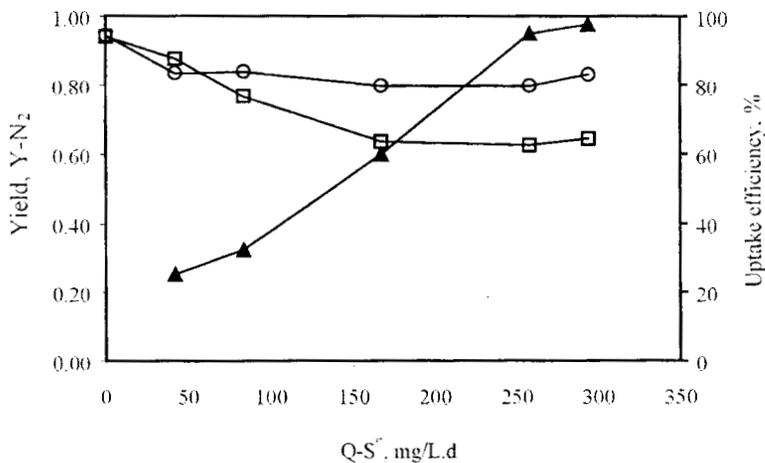


Figure 2. Denitrifying yield (—○—), and consumption efficiencies of sulfide (—▲—) and acetate (—□—) at different sulfide loading rates ($Q-S^m$) and constant ratio C/N.

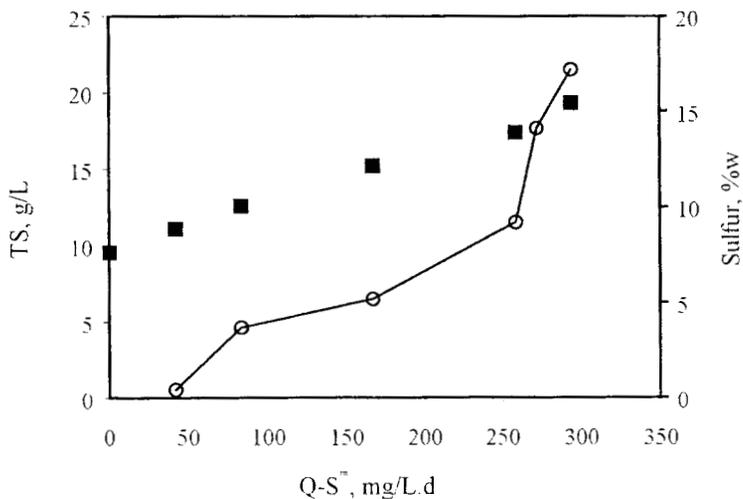


Figure 3. Total solids (■) and sulfur (—○—) accumulated in the reactor under the gradual increase of the sulfide loading rates ($Q-S^m$) applied to the denitrifying reactor. Elemental sulfur is expressed as % weight related to the total solids inside the reactor.