



# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

DIVISIÓN DE INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”

## INMOVILIZACIÓN DE BIOMASA SULFATO-REDUCTORA EN ZEOLITA CLINOPTILOLITA EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LECHO FIJO

TESIS

Que para obtener el Título de:

**INGENIERO QUÍMICO**

Presenta:

**CITLALI DE JESUS GASTÉLUM ROSAS**

# Repositorio Institucional UNISON



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



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

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	x
RESUMEN .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo.....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
3.1. Contaminación del agua .....	5
3.1.1. Metales pesados en el medio ambiente .....	6
3.1.2. Compuestos azufrados en el ambiente .....	7
3.2. Tratamientos de aguas residuales .....	9
3.2.1. Tratamientos biológicos .....	9
3.2.2. Sulfato-reducción para el tratamiento de aguas residuales.....	10
3.3. Bioprecipitación de metales con sulfato-reducción .....	16
3.4. Bacterias Sulfato-Reductoras (BSR) .....	18
3.5. Inmovilización celular.....	21
3.6. Soportes bacterianos.....	26
3.6.1. Zeolitas naturales .....	26
3.7. Reactor de lecho fijo de flujo ascendente.....	27

4. MATERIALES Y METODOS .....	30
4.1. Estudios en continuo .....	30
4.2. Estudios en lote .....	32
4.3. Métodos analíticos .....	32
4.3.1. Alcalinidad .....	32
4.3.2. Demanda química de oxígeno (DQO).....	33
4.3.3. Sulfuros.....	33
4.3.4. Biomasa inmovilizada .....	34
4.3.5. Biogás.....	36
4.3.6. Medición pH.....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1. Estudios en continuo .....	38
5.2. Estudios en lote.....	46
6. CONCLUSIONES.....	49
ANEXO A .....	50
ANEXO B .....	51
ANEXO C .....	52
ANEXO D .....	53
7. REFERENCIAS.....	55



# LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 3.1.</b> Ciclo biogeoquímico del azufre (Madigan et al., 1998).....	11
<b>Figura 3.2.</b> Sulfato-Reducción en la degradación de la materia orgánica (Gibson, 1990). .....	15
<b>Figura 3.3.</b> Etapas de la formación de la biopelícula. ....	24
<b>Figura 4.1</b> Reactor de Lecho fijo.....	30
<b>Figura 4.2.</b> Medición por desplazamiento de biogás producido.....	36
<b>Figura 5.1.</b> Consumo de la materia orgánica del reactor Sulfato-reductor de lecho empacado.....	39
<b>Figura 5.2.</b> Eficiencia de remoción de la materia orgánica del reactor sulfato-reductor de lecho empacado. ....	40
<b>Figura 5.3.</b> Producción de sulfuros del reactor sulfato-reductor de lecho empacado.....	41
<b>Figura 5.4.</b> Inmovilización de biomasa sulfato-reductora sobre zeolita clinoptilolita. ....	42
<b>Figura 5.5.</b> Fotomicrografías de MEB A) Zeolita tomada con un detector de electrones secundarios; B) Biomasa inmovilizada en zeolita (día 15) tomada con un detector de electrones retrodispersos .....	43
<b>Figura 5.6.</b> Capacidad amortiguadora del reactor sulfato-reductor de lecho empacado.....	44
<b>Figura 5.7.</b> Remoción de la materia orgánica por la biomasa inmovilizada. ....	47
<b>Figura 5.8.</b> Producción de biogás por las bacterias sulfato-reductoras inmovilizadas.....	48
<b>Figura B.1.</b> Curva estándar de la demanda química de oxígeno.....	51

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.1.</b> Límites máximos permisibles de metales y metaloides en agua .....	7
<b>Tabla 3.2.</b> Aplicaciones biotecnológicas, utilizando BSR.....	13
<b>Tabla 3.3.</b> Usos de los distintos tipos de inmovilización de biomasa.....	22
<b>Tabla 4.1.</b> Medio mineral .....	31
<b>Tabla 5.1.</b> Capacidad del sulfuro para bioprecipitar metales. ....	41
<b>Tabla B.1.</b> Curva estándar de la demanda química de oxígeno (DQO).....	51



## RESUMEN

La sulfato-reducción llevada a cabo por microorganismos, es comúnmente utilizada para tratar efluentes provenientes de industrias mineras, tenerías, productoras de papel y de procesos fotográficos. Es de conocimiento que las bacterias sulfato-reductores alcanzan su máxima actividad metabólica cuando se encuentran en biopelículas por tal razón el objetivo general de este trabajo es evaluar la inmovilización de dicha biomasa utilizando como soporte zeolita clinoptilolita dentro de un reactor sulfato-reductor anaerobio de lecho fijo. Se llevaron a cabo estudios en continuo en un reactor sulfato-reductor, donde el desempeño del reactor se evaluó siguiendo la medición de pH y DQO en el influente y efluente, alcalinidad, tiempo de residencia hidráulica (TRH) y producción de sulfuros, además de seguir diariamente la inmovilización de las bacterias. Para estos estudios se obtuvo que la inmovilización alcanzó su máximo de 0.0353 gbiomasa/gzeolita en 15 días, logrando una producción promedio de 507 mg de sulfuros/L con una eficiencia de conversión de sulfato a sulfuro del 99% así como una remoción de la materia orgánica del 80%. Se realizaron estudios en lote para obtener la actividad sulfidogénica específica de 0.11 gS<sup>2-</sup>/gSSV-d con un 75% del sulfuro esperado. En base a estos resultados se concluye que la zeolita clinoptilolita resultó ser un buen soporte para la inmovilización de la biomasa sulfato-reductora ya que se adhirió en un corto periodo de tiempo, así mismo se logró una remoción simultánea de materia orgánica y sulfatos con el cual se puede bioprecipitar metales, ya que con la cantidad de sulfuro producido de 507 mg/L el sistema puede ser apto para el tratamiento de efluentes con concentraciones de metales pesados divalentes en el rango de 0.88 a 1.03 g de M<sup>2+</sup>/L.



# 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación es un cambio indeseable en las características físicas, químicas o biológicas del ambiente natural, producido sobre todo por la actividad humana. Es resultado de procesos ineficientes desarrollados por el hombre puesto que deshacerse de los desperdicios ha resultado menos costoso que mejorar la eficiencia de un sistema (Travis, 1993).

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

Existen diversos métodos para la remoción de metales pesados provenientes de efluentes industriales, los cuales, pueden ser físico-químicos tales como: la precipitación, oxidación, reducción química, intercambio iónico, osmosis inversa, separación por membranas, tratamiento electroquímico y evaporación. Estos métodos frecuentemente son inefectivos y costosos sobre todo cuando se aplican a efluentes diluidos.



Las legislaciones ambientales restrictivas, los problemas ecológicos y el alto costo de las tecnologías convencionales para el tratamiento de efluentes conteniendo metales pesados han resultado en la búsqueda de métodos alternativos para la remoción y recuperación de metales utilizando microorganismos como bacterias, hongos y algas, los cuales tienen la capacidad de atrapar y/o degradar estas sustancias algunas veces hasta su mineralización (Marques *et al.*, 2000; Tomko *et al.*, 2006; Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008). Entre las ventajas más importantes de las alternativas biológicas para la deposición de metales están: menores costos, mayores eficiencias en la remoción de metales en concentraciones por debajo de 1 mg/L, y selectividad en la remoción de los metales deseados (Alvarez *et al.*, 2007).

Dentro de los métodos biológicos se encuentran: la bioadsorción y bioacumulación, reducción, solubilización/oxidación, bioprecipitación y metilación (Alexander, 1999). Dependiendo de la fase en la que se encuentra el metal, de su estado de oxidación y de la especie que esté conformando, la acción de un microorganismo puede responder a una de las siguientes alternativas. La primera correspondería a la movilización del metal, denominada lixiviación, la que puede ser definida como un proceso de disolución de un compuesto contenido en una matriz sólida por acción de microorganismos. (Krebs *et al.*, 1997). La segunda alternativa aplicable al tratamiento de metales presentes principalmente en efluentes líquidos, corresponde a la inmovilización del metal, es decir, al pasaje de un estado soluble inicial, a uno insoluble final (Veglio y Beolchini, 1997). La inmovilización con bacterias es una alternativa a los métodos fisicoquímicos tradicionales (Moosa *et al.*, 2002).

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales. La habilidad de los microorganismos para sobrevivir a un ambiente con metales pesados implica mecanismos que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento de las contaminaciones con esos metales a través de procesos de inmovilización (Vullo, 2003). Probablemente los dos procesos biológicos más relevantes en la inmovilización de metales son la



biosorción y la bioprecipitación (Veglio y Beolchini, 1997). Para que estos procesos biológicos puedan ser utilizados a escala industrial, es conveniente que los microorganismos sean previamente inmovilizados sobre un soporte inerte de modo que no sean eliminados junto con los efluentes o con los precipitados (Nagpal *et al.*, 2000).

En la bioprecipitación se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con muchos de los metales pesados (Malik, 2004). Un grupo importante de estos microorganismos son las bacterias denominadas sulfato-reductoras (BSR) (White y Gadd, 1996; Moosa *et al.*, 2005; Jong, Parry, 2003). Estas son bacterias anaeróbicas (crecen en ambientes reductores y en ausencia de oxígeno) que son capaces de formar sulfuros a partir de la reducción de sulfatos. Los sulfuros pueden precipitar con metales presentes en el medio y, de ese modo, pueden ser separados del medio líquido.

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada (Karel *et al.*, 1985). La inmovilización se lleva a cabo de manera natural gracias a procesos de adherencia a superficies celulares o a sustancias que estos mismos segregan. Esta se da por atrapamiento en los espacios a poros de fibras y geles. (Couto *et al.*, 2004).

El utilizar células inmovilizadas presenta ventajas sobre las no inmovilizadas como: la operación de biorreactores a velocidades de flujo independientes de la velocidad de crecimiento de los microorganismos, la estabilidad catalítica puede ser mayor y mayor tolerancia a concentraciones altas de compuestos tóxicos.

Durante las últimas décadas se ha estudiado la inmovilización de microorganismos como una solución y mejoramiento en los sistemas de tratamiento de aguas, suelos y aires contaminados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo**

- Evaluar la inmovilización de biomasa sulfato-reductora en zeolita clinoptilolita dentro de un reactor sulfato-reductor de lecho fijo.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Instalar un reactor adaptado a condiciones sulfato-reductoras empacado con zeolita clinoptilolita.
- Determinar la actividad sulfidogénica en lote.
- Evaluar el desempeño del reactor con la biomasa inmovilizada en condiciones sulfato-reductoras.



### **3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

#### **3.1. Contaminación del agua**

El consumismo ha provocado que las industrias aumenten con el propósito de cubrir la demanda actual, como consecuencia se originaron serios problemas ambientales como la contaminación, tanto de suelos, aire y agua, causada por los desechos generados por las fábricas y las actividades cotidianas, ya que, principalmente son vertidos directamente al medio ambiente sin un tratamiento propio y en algunas ocasiones nulo ya que es menos costoso deshacerse de los desperdicios a mejorar la eficacia de un sistema. Según datos de la ONU (2003), diariamente 2 millones de toneladas de desechos son eliminados a través de los cursos de agua y en los países en desarrollo el 70% de los desechos industriales son vertidos sin tratamiento provocando la contaminación de los recursos hídricos disponibles.

El agua es el recurso natural principal para la producción masiva, por lo tanto, es de los recursos más afectados por la industrialización, puesto que los efluentes generados si no son debidamente tratados, llegan a ríos, lagos, mares o mantos acuíferos subterráneos, y pueden llegar hasta la flora, fauna y seres humanos de la localidad; dentro de la materia orgánica que puede ser encontrada en estas aguas son: Carbono, Carbonatos, Amonio, Nitritos, Nitratos, Cloruros, compuestos azufrados, etc. siendo estos últimos de principal interés para el desarrollo de este trabajo. Los excesos de nutrientes en el agua representan un problema ya que ocasionan la eutrofización, que consiste en el crecimiento excesivo de plantas por los nutrientes presente lo que causa una disminución del oxígeno y por lo tanto la muerte de peces. Los nutrientes antes mencionados, no son los únicos presentes, también se encuentran metales pesados como el Cobre, Fierro, Zinc y Manganeseo.



### 3.1.1. Metales pesados en el medio ambiente

Los metales pesados son elementos que tienen pesos atómicos entre 63.546 y 299.590 con una gravedad específica mayor a 4.0, (Ramírez, 1999). Dichos metales son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes cultivos. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente (Angelova *et al.*, 2004)

Conjuntamente a la actividad humana, que es la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas de metales pesados en el ambiente, los vertidos industriales, procedentes principalmente el proceso de extracción y purificación; minería, fundición y refinación, de la aplicación de plaguicidas, o del tráfico rodado incrementan las cantidades de metales en el ambiente. Estas descargas propician la acumulación de este tipo de contaminantes a concentraciones perjudiciales para el correcto funcionamiento de los ecosistemas, lo que constituye un problema de importancia económica y salud pública (Cañizarez-Villanueva, 2000). Las concentraciones de los metales en el agua son reguladas por reglamentaciones gubernamentales, mismas que establecen los límites permisibles los cuales se muestran en la Tabla 1.1.

A diferencia de lo que puede ocurrir con compuestos orgánicos contaminantes, los metales pesados no pueden ser degradados. Las posibilidades para el tratamiento de contaminaciones producidas por ellos se reducen a inmovilizarlos (si se encuentran en una fase líquida o gaseosa) o movilizarlos (para extraerlos desde matrices sólidas) de forma tal de reducir su biodisponibilidad o su toxicidad (Ledin, 2000; Nagpal *et al.*, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2003; Viera y Donati, 2004).

**Tabla 1.1.** Límites máximos permisibles de metales y metaloides en agua

<b>PARÁMETROS</b>	<b>Límite máximo permisible (mg/L)</b>
Aluminio	0,20
Arsénico	0,01
Antimonio	0,02
Bario	0,70
Boro	0,50
Cadmio	0,003
<b>Cobre</b>	<b>2,00</b>
Cromo	0,05
<b>Hierro</b>	<b>0,30</b>
<b>Manganeso</b>	<b>0,15</b>
Mercurio	0,001
Molibdeno	0,07
Níquel	0,02
Plomo	0,01
Selenio	0,01

*Datos tomados del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-SSA1-250-2007, Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento.*

### **3.1.2. Compuestos azufrados en el ambiente**

Además de la materia orgánica en las aguas residuales, se encuentran los compuestos azufrados como el sulfato, éstas son generadas por muchos procesos industriales que usan ácido sulfúrico (industria alimenticia y de fermentación). También el uso de compuestos menos oxidados de azufre como



el sulfuro (tenerías, procesos Kraft), sulfito, ditionito (industria del papel) y tiosulfato (proceso fotográfico) generan aguas residuales ricas en compuestos azufrados. Las emisiones acuosas ricas en sulfato representan una amenaza indirecta al ambiente ya que el sulfato eventualmente se reduce a sulfuro en la naturaleza. Las restricciones legislativas actuales sobre la emisión de sulfato tienen que ver con reducir el contenido de sal en las aguas superficiales y minimizar la condensación ácida en las alcantarillas (Hao *et al.*, 1996; Smet *et al.*, 1998).

El sulfuro, los polisulfuros, el tiosulfato, los politionatos, el azufre elemental, el bisulfito y el sulfato son los compuestos inorgánicos más comunes que se encuentran en ambientes naturales. Pueden ser usados por muchos organismos con fines asimilativos o no asimilativos. El sulfato y el sulfuro son los productos finales de la mayoría de las rutas de oxidación o reducción de los compuestos azufrados, mientras que los compuestos de azufre con estados de oxidación intermedio pueden servir como aceptores o donadores de electrones (Celis-García, 2004).

La emisión de  $H_2S$  es un problema asociado con el tratamiento anaerobio de aguas residuales y con los procesos cuyas corrientes de desecho (líquidas o gaseosas) lo contienen. Debido a sus propiedades tóxicas y corrosivas se vuelve indispensable la eliminación o minimización de este compuesto a niveles aceptables, antes de descargar al ambiente dichas corrientes. El sulfuro de hidrógeno se emite al ambiente como sulfuro disuelto en las aguas residuales y como ácido sulfhídrico en gases de desecho (González-Blanco, 2007).



## **3.2. Tratamientos de aguas residuales**

El objetivo de los tratamientos de las aguas residuales es la eliminación de contaminantes como metales pesados y compuestos orgánicos presentes en el efluente generado para que no sea dañino para el medio ambiente.

Dependiendo de las características del efluente y las regulaciones medioambientales se pueden considerar tres fases de tratamiento de las aguas residuales. El tratamiento primario involucra la separación del material insoluble y los sólidos suspendidos, neutralización y estabilización de la temperatura a través de métodos físicos o químicos o una combinación de ambos. La segunda fase, o el tratamiento secundario, involucran los métodos más complejos y normalmente requiere de tratamiento biológico para la remoción de la materia orgánica. El tratamiento terciario remueve compuestos selectivamente para obtener un efluente relativamente limpio (River *et al.*, 1998).

Gracias al tratamiento primario, llevado a cabo por medios físicos, se eliminan de un 40 a un 60% de los sólidos suspendidos y se reduce de un 20 a un 40% la demanda biológica de oxígeno (DBO). El tratamiento secundario tiene como objetivo estabilizar la materia orgánica presente en el agua residual. El tratamiento secundario conjetura, emplear y acelerar los procesos naturales de eliminación de los residuos.

### **3.2.1. Tratamientos biológicos**

Los tratamientos biológicos constituyen una serie de procesos importantes de tratamiento que tienen en común la utilización de microorganismos (entre las que destacan las bacterias) para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes. La aplicación tradicional consiste en la eliminación de materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, así como la eliminación de compuestos que contienen elementos nutrientes (nitrógeno,



fósforo). En la mayor parte de los casos, la materia orgánica constituye la fuente de energía y de carbono que necesitan los microorganismos para su crecimiento (Andalib *et al.*, 2011).

Algunas de las ventajas que presentan las tecnologías biológicas respecto a los tratamientos físico-químicos son: que frecuentemente son más económicas, menos contaminantes, y de mayor eficacia para volúmenes grandes y para concentraciones pequeñas.

### **3.2.2. Sulfato-reducción para el tratamiento de aguas residuales**

El azufre es un componente esencial de la biosfera; constituye alrededor del 1% de la masa seca de los organismos vivos (Hao *et al.*, 1996). Está presente en todos los organismos (1%) y forma parte de muchos compuestos orgánicos como aminoácidos, (poli) péptidos, cofactores enzimáticos, antibióticos, lípidos y carbohidratos. En estos compuestos el azufre puede tener funciones catalíticas, estructurales o reguladoras. En contraste, el papel biológico de los compuestos inorgánicos está más bien restringido: ya sea que sirven como fuente de asimilación e incorporación del azufre a los compuestos orgánicos, o se emplean como donadores o aceptores de electrones en el transporte no asimilativo de los mismos (Steudel, 1998).

En las rutas no asimilativas, el tiempo de retorno de los compuestos azufrados es alto y el producto final es liberado al ambiente. Sin embargo, las rutas se pueden trancar en algún punto dando como resultado la formación y secreción de compuestos de azufre de estados de oxidación intermedios (Celis-García, 2004).

Las oxidaciones y reducciones bioquímicas de los compuestos de azufre constituyen el ciclo biológico del azufre que se representa esquemáticamente en la Figura 3.1. Como se observa, el ciclo consiste de una etapa oxidativa y otra reductora, en donde el azufre completa ciclos reduciéndose del estado de



oxidación +6 para el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) al -2 para el sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) y este a su vez es oxidado de nuevo a  $\text{SO}_4^{2-}$  (Célis-García, 2004).

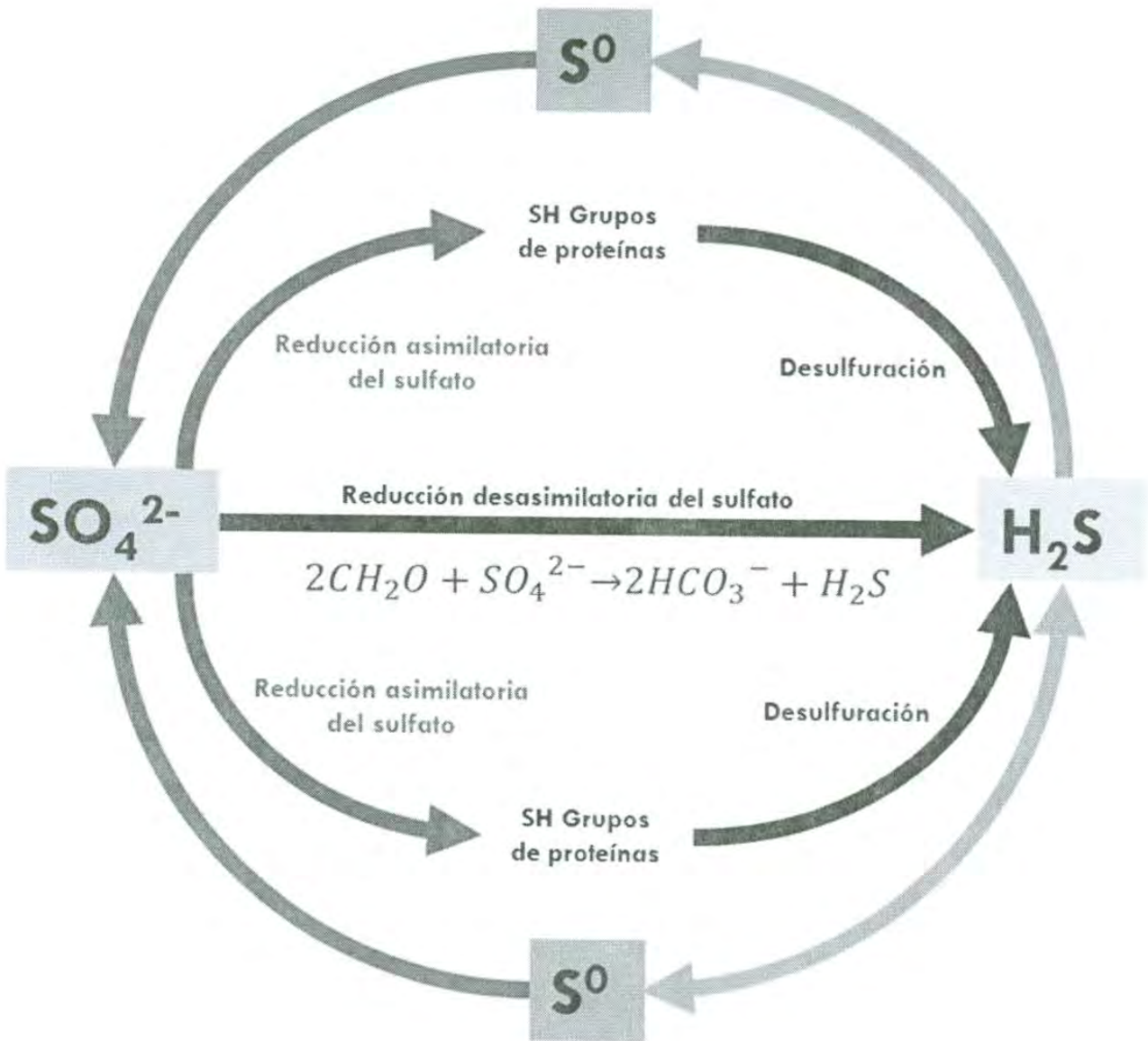


Figura 3.1. Ciclo biogeoquímico del azufre (Madigan *et al.*, 1998)

Mientras que la reducción asimilativa de sulfato es muy común en procariotes, plantas y hongos, las rutas no asimilativas están restringidas a eubacterias y archeobacterias. En los ambientes naturales las rutas del ciclo están interconectadas y los ecosistemas en los que las transformaciones de azufre (reducción de sulfato y oxidación de sulfuro) se llevan a cabo de forma cíclica se llaman *Sulfuretum*. En la naturaleza los *Sulfureta* se encuentran en diferentes ambientes, como en las fuentes hidrotermales, sedimentos marinos y mantos microbianos (Van den Ende *et al.*, 1997). Estos ecosistemas son importantes desde los puntos de vista científico y ambiental, por la presencia de microorganismos muy especiales y por el ciclaje del azufre elemental (Celis-García, 2004)

El sulfuro se forma como el principal producto de la respiración de sulfato por bacterias que dominan bajo condiciones anaerobias cuando la materia orgánica y el sulfato no son limitantes. El tiosulfato y azufre elemental también pueden servir como aceptores finales de electrones y producir sulfuro; este último también se libera al ambiente por la desulfuración de compuestos orgánicos que contienen azufre reducido como las proteínas (Suzuki, 1999).

A partir del ciclo del azufre se han desarrollado biotecnologías para eliminar los compuestos azufrados de todo tipo de efluentes. Aprovechando la capacidad de las bacterias para llevar a cabo en procesos de oxidación y reducción de bacterias en los distintos intermediarios del ciclo del azufre (Celis-García, 2004). Algunas de las aplicaciones de estas bacterias se encuentran en la Tabla 3.2.

Los procesos tecnológicos ambientales basados en el ciclo del azufre se fundamentan en la formación de intermediarios insolubles que pueden ser físicamente separados de la fase líquida. Los intermediarios sólidos que se acumulan en la naturaleza ( $\text{CaSO}_4$ , sulfuros metálicos y azufre elemental) son usados en las tecnologías ambientales. La conversión a productos finales gaseosos ( $\text{H}_2\text{S}$  y mercaptanos) no puede usarse como un método de eliminación de sulfato puesto que son tóxicos, corrosivos y de olor ofensivo (Lens y Kuenen, 2001). El sulfuro es tóxico para los humanos, a altas



concentraciones (500-1000 ppm) es venenoso y puede provocar paro respiratorio y muerte. A bajas concentraciones (50-500 ppm) el H<sub>2</sub>S actúa como irritante de las vías respiratorias (Buisman *et al.*, 1991).

**Tabla 3.2.** Aplicaciones biotecnológicas, utilizando BSR

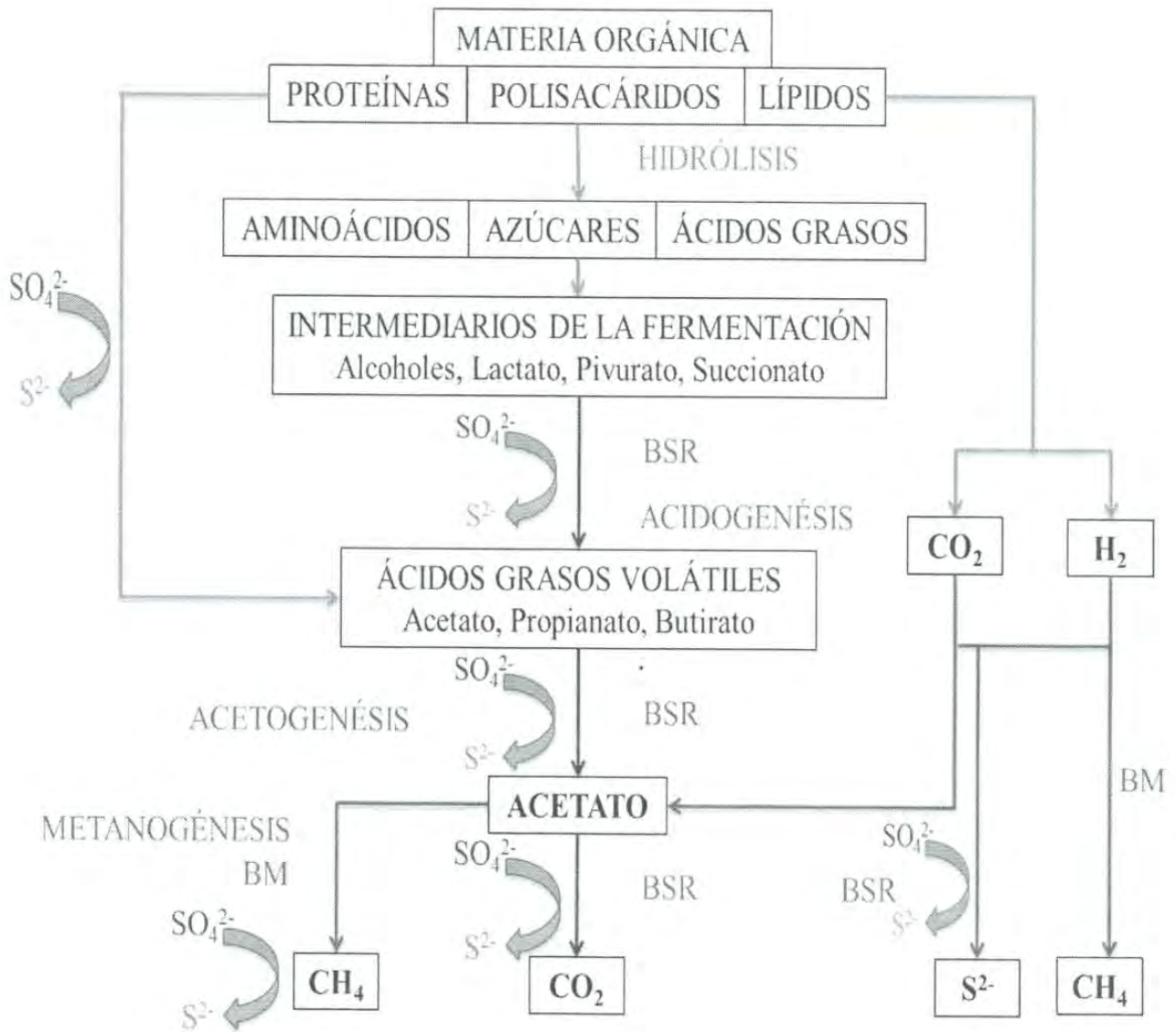
<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>
<i>Remoción biológica del sulfato</i>	
Aguas residuales industriales	Särner (1990)
Drenaje ácido de minas (DAM)	Maree <i>et al.</i> (1991)
Ácido sulfúrico agotado	Stucki <i>et al.</i> (1993)
Aguas de lavados de gases ricas en SO <sub>4</sub>	Kaufman <i>et al.</i> (1996)
<i>Remoción de metales pesados</i>	
Tratamiento extensivo (humedales)	Hao <i>et al.</i> (1996)
Reactores de alta tasa	Tichy <i>et al.</i> (1998)
Agua de proceso	
DAM	Barnes <i>et al.</i> (1991)
Agua subterránea	Scheeren <i>et al.</i> (1991)
<i>Tratamiento micro-aérobio</i>	
<i>Tratamiento de aguas residuales domesticas</i>	Takahashi y kyosai (1991)
Reducción de la producción de lodos residuales	Lens <i>et al.</i> (1995b)
Tratamiento de residuos sólidos	
Procesos de yeso	Deswaef <i>et al.</i> (1996)

*Fuente: Fernández-Polanco y García Encina (2006)*

El proceso de sulfato-reducción es una valiosa herramienta biotecnológica para la remoción de metales en lixiviados de minas y efluentes industriales. Es considerado potencialmente superior a otros procesos biológicos debido a su capacidad para producir alcalinidad y neutralizar el pH de aguas ácidas; y su facultad para la remoción simultánea de materia orgánica, sulfatos y metales pesados (Tuppurainen *et al.*, 2002; Kaksonen *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2007; Kaksonen y Puhakka, 2007).

Durante el tratamiento de aguas con altos niveles de sulfato, las bacterias sulfato-reductoras compiten con las bacterias fermentativas o acidogénicas por los productos de la hidrólisis, con las bacterias acetogénicas por sustratos intermediarios como los ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes, y con las bacterias metanogénicas por los sustratos menos complejos como hidrógeno y acetato, como se muestra esquemáticamente en la Figura 3.2. El resultado de esta competencia es importante porque determina el rendimiento de los productos finales de la mineralización (sulfuro y metano) (Lens *et al.*, 2000). La actividad de las sulfato-reductores depende principalmente de la disponibilidad de sulfato (Espinosa-Chávez, 2007).





**Figura 3.2.** Sulfato-Reducción en la degradación de la materia orgánica (Gibson, 1990).

En general, durante la degradación anaerobia de la materia orgánica, la sulfato-reducción puede interferir con la metanogénesis como se observa en la Figura 3.2, generando problemas como (Elferink *et al.*, 1994):

1. Competencia entre las BSR y las BM, por sustratos comunes y la consecuente disminución en la producción de metano;
2. Inhibición de varios grupos bacterianos por la presencia de H<sub>2</sub>S;
3. Toxicidad generada por el H<sub>2</sub>S, malos olores y corrosión.

### 3.3. Bioprecipitación de metales con sulfato-reducción

La bioprecipitación se basa en biotecnologías ambientales que dependen de la actividad de bacterias sulfato-reductoras (BSR) que ofrecen interesantes potenciales para la eliminación y recuperación de metales (Alvarez *et al.*, 2007) como Zn, Pb, Ni, Cr, Cd, Cu, Fe, Hg, entre otros (Alexander, 1999). La bioprecipitación de metales pesados con sulfuros biogénicos ha atraído interés dado a que los métodos biológicos para recuperación de metales son técnicas consideradas baratas y eficaces a comparación de otros métodos de tratamiento (Bolton y Gorby, 1995).

El proceso de la bioprecipitación se realiza bajo condiciones anaerobias, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) reducen el sulfato a sulfuro, el cual reacciona con los metales presentes formando precipitados de sulfuro metálico; caracterizados universalmente por su baja solubilidad en corrientes acuosas. Lo que implica que las aguas residuales que contienen metales pueden ser tratadas efectivamente por éste proceso biológico (Bhagat *et al.*, 2004). La principal ventaja de éste sobre otros procesos biológicos es su capacidad de remoción simultánea de la acidez (debido a la alcalinidad producida en la oxidación microbiana de la fuente de carbono (Christensen *et al.*, 1996)), la materia orgánica, el sulfato y los metales pesados (Kaksonen *et al.*, 2006). Sin embargo, destaca la posibilidad de recuperación selectiva de metales económicamente importantes (Sampaio *et al.*, 2009). Además, el proceso es ahora aplicado exitosamente para remoción de metales y sulfatos en drenajes ácidos de mina (DAM) y puede ser aplicado para el tratamiento de metales remanentes en aguas residuales industriales (Bhagat *et al.*, 2004).



El proceso puede representarse con las siguientes ecuaciones (Kaksonen y Puhakka, 2007):

- Producción de sulfuro y alcalinidad "Ec. 3.1" en donde el metanaldehído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) representa la fuente de carbono:



- El sulfuro biogénico producido precipita los metales disueltos como sulfuros de baja solubilidad "Ec. 3.2". Donde  $\text{M}^{2+}$  representa metales como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ :



- La reacción de precipitación del metal libera protones "Ec. 3.2", los cuales se suman a la acidez del agua. La alcalinidad de bicarbonato producida en la oxidación sulfidogénica de la materia orgánica "Ec. 3.1" neutraliza la acidez producida en la reacción de precipitación del metal "Ec. 3.3".



### 3.4. Bacterias Sulfato-Reductoras (BSR)

En las corrientes que contienen sulfato y en el drenaje ácido de las minas pueden encontrarse diferentes tipos de bacterias sulfato-reductoras que utilizan el sulfato como aceptor final de electrones y una fuente orgánica como donador de electrones (Moosa *et al.*, 2000). Algunos géneros comunes de bacterias sulfato reductoras con *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas*, *Desulfonema*, *Desulfobacterium*, *Desulfovibrio*, *Desulfosarcina*, *Desulfoorculus*, *Desulfomonile*, *Desulfobacula*, *Thermodesulforhabdus* y *Desulfacinum*.

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



Las BSR son muy diversas en la fuente de carbono a utilizar y en las actividades metabólicas (Lens *et al.*, 1998). El Carbón y la fuente de energía proveen la energía para el crecimiento y manutención de las bacterias. Las BSR llevan a cabo la sulfato-reducción en base a la ecuación 3.4 (Herlihy *et al.*, 1987).



En base a la reacción 3.4, los electrones necesarios para para la reducción el sulfato, son donados por la fuente de Carbón y de energía (oxidación). Las bacterias reductoras de sulfato pueden ser utilizadas para convertir el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) o sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ). Las bacterias utilizan sustratos dadores de electrones presentes en aguas residuales (contaminación orgánica) o agregando sustratos para la reducción de sulfato (Vikrama, 2005)

Estas bacterias llevan a cabo el proceso de reducción desasimilatoria de sulfato (es decir, cuando el sulfuro producido en la reducción del sulfato no es incorporado a la biomasa); este ion es utilizado como un oxidante para la degradación de la fuente orgánica de carbono (Postgate, 1954).

Las bacterias sulfato-reductoras son estrictamente anaerobias y por lo general, son muy sensibles a los medios óxicos, muriendo de forma más o menos rápida cuando son expuestas a ese tipo de medios (Barton y Tomei, 1995), se pueden encontrar en numerosos ambientes terrestres y acuáticos en los que se ha agotado el oxígeno debido a la descomposición aeróbica de la materia orgánica. Han sido descubiertas en suelos, lodos de estuarios, en aguas dulces, de alcantarillado, marinas, salobres, termales y áreas geotermales, depósitos de sulfuro, en pozos petroleros y de gas, y en el intestino de mamíferos e insectos (Postgate, 1984).



Pueden crecer en presencia o ausencia de sulfatos, utilizando vías metabólicas diferentes; una fermentativa y la otra oxidativa. La reducción del sulfato es un proceso energético relativamente pobre usado por muchas bacterias Gram negativas (Proteobacterias gamma) y por organismos Gram positivos relacionados con *Desulfotomaculum* o con la archaea *Archaeoglobus*. Como producto final metabólico se obtiene sulfuro del hidrogeno ( $H_2S$ ) (Lens *et al.*, 2000)

La producción biológica de sulfuro de hidrógeno en ambientes acuáticos se conoce desde el siglo pasado. Las bacterias sulfato reductoras (BSR) forman un grupo especializado de procariotes que tienen la capacidad de usar sulfato como aceptor final de electrones en la respiración (Mudryk *et al.*, 2000).

Las características morfológicas de estas células varían considerablemente. Se han descrito distintos tipos celulares, entre los que se encuentran: bacilos, vibrios, cocos, espirilos, etc. (Widdel y Bak, 1992). Las capacidades oxidativas y metabólicas de las BSR varían de acuerdo al género. Entre los compuestos orgánicos más utilizados se encuentran: lactato, acetato, piruvato, etanol, propanol y glucosa (Gibson, 1990).

Las BSR crecen mejor bajo condiciones levemente alcalinas, en un rango relativamente estrecho de pH (entre 7,0 y 7,8). Sin embargo, se han encontrado BSR con capacidad de tolerar ambientes ácidos, como las bacterias del género *Desulfotomaculum* reportadas por Johnson *et al.* (1993) que crecieron en un pH de 2.9. Así mismo presentan capacidad de desarrollarse en ambientes alcalinos (pH 9,5) (Barton y Tomei, 1995). Postgate (1984) señala que un consorcio de BSR son más tolerantes a condiciones extremas que los cultivos puros.

Un factor muy importante en la actividad de las bacterias sulfato reductoras es la temperatura del sistema. La mayoría de las BSR son mesófilas, es decir, con un crecimiento óptimo en el rango de temperatura de 25 a 40°C (Okabe y Characklis, 1992).



Se ha comprobado que la actividad metabólica de las BSR es máxima cuando se encuentran formando biopelículas (biofilms) (Beyenal y Lewandowski, 2004).

### **3.5. Inmovilización celular**

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada (Karel *et al.*, 1985).

Existen dos tipos de inmovilización, la activa que consiste en el atrapamiento o en la unión de las células por fuerzas físicas o químicas; y la pasiva radica en la formación natural de aglomerados o en la unión a superficies de los microorganismos y crecer en ellas, siendo esta última la llevada a cabo en este trabajo. Para realizar la inmovilización activa existen diferentes métodos, los cuales siguen un procedimiento general que consiste en suspender el microorganismo a inmovilizar en una solución líquida que contiene los monómeros de la macromolécula, algunos de ellos son: la gelificación, precipitación de polímeros, intercambio de gelificación iónica, policondensación, polimerización, encapsulación, algunos de los compuestos utilizados como macromoléculas pueden ser: agar, alginato, k-carragenina, quitosano, colágeno, poliuretano, sílica gel, poliestireno, triacetato de celulosa, etc.

La inmovilización pasiva, es un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares o a sustancias que estos mismos segregan. De forma artificial o inducida, puede darse por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles, entre muchos (Couto *et al.*, 2006). En la Tabla 3.2 se muestra las distintas aplicaciones de biomasa inmovilizada sobre diversos soportes, tanto activa como pasiva.

Durante este proceso de la inmovilización puede ocurrir la formación de biofilms, del cual solo de un 15 a 25% son células vivas, el resto está

Tabla 3.3. Usos de los distintos tipos de inmovilización de biomasa.

Soporte	Células inmovilizadas	Uso de la biomasa	Fuente
Agar	<i>Bacillus sp</i>	Degradación de Nitrilos	Kabaivanova et al. (2008)
Alignato de Calcio	<i>Pseudomonas putidas</i> MTCC1144	Degradación de fenol	Bandhopadhyay et al. (1999)
Carbón activado	<i>Trametes versicolor</i>	Decoloración colorantes sintéticos	Domínguez et al. (2005)
Estropajo*	<i>Klebsiella oxytoca</i> 8391	Biodegradación del 1,2-dicloroetano	Mileva et al. (2008)
Gel de k-carragenano	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Remoción del Niquel (II)	Akhtar et al. (2004)
Madera*	Microorganismos aerobios y anaerobios	Degradación de 2,4,6-triclorofenol	Gardin et al. (2001)
Pertas alignato	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de 4-Cloro-Fenol	Jin et al. (1998)
Poliacrilamida, Alignato+agar	<i>Pseudomonas spp</i>	Degradación de <i>p</i> -Cresol	O'Relly et al. (1989)
Polímero sintético, polisulfano y resina epóxica	<i>Pseudomonas sp</i>	Degradación naftaleno	Karegoudar et al. (1998)
Polipropileno*	<i>Phormidium laminosum</i>	Absorción de metales pesados	Blanco et al. (1999)
Poliuretano*	Bacterias halotolerantes	Degradación de petróleo	Diaz et al. (2002)
Polivinil*	<i>Pseudomonas spp</i>	Degradación de fenol	Chitiva et al. (2003)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Remoción de metales en agua	Urrutia et al. (1995)
	<i>Prototheca zopfii</i>	Degradación de hidrocarburos	Yamaguchi et al. (1999)
	<i>Pseudomonas esterophilis</i>	Biodegradación de etilacetato y metilacetato	Doronina et al. (2006)
Polivinil + alignato	<i>Fusarium sp.</i>	Degradación de pireno y fenantreno	Li et al. (2005)

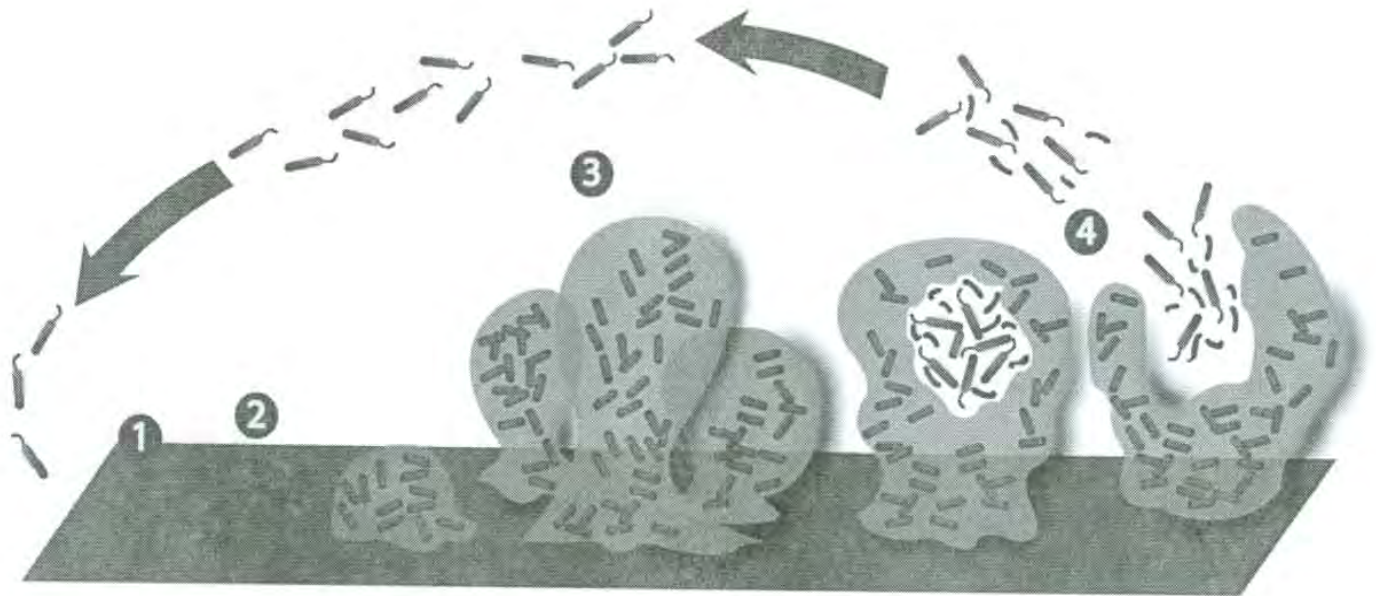
\* Inmovilización pasiva



compuesto por agua en su mayoría, exopolisacáridos (EPS), proteínas y ácidos nucleicos, también conocidos como sustancias poliméricas extracelulares. Son complejas estructuras, con sistemas de canales de agua y aireación, los cuales permiten el transporte de nutrientes, desechos, oxígeno, y agua, entre otros. Gracias a estos canales se generan diferentes gradientes de tensión de pH y oxígeno, lo cual permite que se desarrollen micronichos y diversos grupos bacterianos (Korkoutas *et al.*, 2004)

La formación de la biopelícula se da en 4 pasos principalmente, como se muestra en la Figura 3.3. Durante el primer paso, las células perciben una superficie de adherencia (soporte) y forman una unión activa reversible por medio de fimbrias, apéndices, pilis, o proteínas de superficie. En la segunda fase se producen microcolonias alrededor del área de adherencia (incremento de la biomasa celular), así mismo hay formación de EPS permitiendo que sea una unión irreversible. La composición del exopolisacárido puede variar según el tipo de microorganismo o las condiciones ambientales, los principales componentes son alginato, N-acetil-glucosamina, glucosa, y galactosa. Durante el tercer paso, la biopelícula crece y madura, permitiendo la adhesión de nuevas colonias bacterianas. Posterior a la maduración, se da el cuarto y último paso, en el cual células individuales o conglomerados se desprenden de la biopelícula por erosión, abrasión o separación para formar nuevos conglomerados (Nazar, 2007).





**Figura 3.3.** Etapas de la formación de la biopelícula.

- 1) Adherencia, 2) Formación de microcolonias, 3) Secreción de exopolisacáridos y 4) Desprendimiento.

Referencia: <http://prometheus.matse.illinois.edu/glossary/biofilms/> en: Garzón-Jimenez y Barragán-Huerta (2008).

García y colaboradores (1997) afirmaron que la colonización del soporte se da desde lo más interno como grietas y poros, hacia la superficie; esto se debe gracias a que las irregularidades de la superficie aportan protección a los microorganismos facilitando la adhesión de estos al soporte.

El término biopelícula (*biofilm*) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados generalmente dentro de una estructura de exopolímeros y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas. Los exopolímeros, que son producidos por los mismos microorganismos, forman una matriz adherente en donde éstos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos. Estas conformaciones microbianas presentan características como: adherencia, heterogeneidad, diversidad de microambientes (pH, presión parcial de O<sub>2</sub>, concentración de iones y de otros sustratos), resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular (Betancourt *et al.*, 2004). La matriz de exopolisacáridos formada por



los mismos microorganismos, reduce la difusión de las sustancias tóxicas hacia el interior de la biopelícula, gracias a la carga neutra o polianiónica que puede tener el tipo de exopolisacárido que sea, protegiendo así a los microorganismos que la componen. (Lazarova y Manem, 1995; Naza, 2007).

Los cultivos de células inmovilizadas tienen las siguientes ventajas de potencial sobre los cultivos en suspensión (Monge-Amaya *et al.*, 2013):

- \* Altas concentraciones de células.
- \* Proporciona reutilización celular y elimina los costosos procesos de recuperación de las células y de reciclaje celular.
- \* Elimina los problemas de lavado de células a altas tasas de dilución
- \* La combinación de altas concentraciones de células y altas velocidades de flujo permite alta productividad volumétrica.
- \* Provee condiciones microambientales favorables (contacto celular, gradientes nutriente-producto, gradientes de pH) para células,
- \* En algunos casos provee estabilidad genética.
- \* Para algunas células, es importante la protección contra el daño de corte.
- \* Alta resistencia a sustancias tóxicas presentes en el medio (Cohen, 2001)

Varios estudios han demostrado que el metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por células libres (Polprasert *et al.*, 1989) (Angelova *et al.*, 2000) (Navarro y Durand, 1977). De igual forma debido a que tanto el soporte como la misma biopelícula que algunos de estos microorganismos forman, atrapan gran parte de los nutrientes y sustancias presentes en el medio, estos estarán más disponibles para las células inmovilizadas, que si estuvieran libres (Cohen, 2001). La inmovilización de células en este tipo de matrices ha sido ampliamente aplicada en biorremediación (Garzón-Jimenez y Barragán-Huerta, 2008).

### **3.6. Soportes bacterianos**

Para que la inmovilización de la biomasa se pueda dar, primero debe de formar una biopelícula sobre un material inerte (Certucha-Barragán *et al.*, 2010). Algunos de los materiales que son usados como soportes son el carbón activado, sílice, gel poliacrilamida y poliuretano incluido agar, celulosa, alginatos, poliacrilamidas, sílice gel, fibras textiles, alginato de calcio, polisulfona, glutaraldehído y otros compuestos orgánicos, que también han sido utilizados para la remoción de metales pesados (Reyes *et al.*, 2006; Cañizares-Villanueva, 2000)

Existen otros materiales que pueden ser usados como soportes de biomasa; tales como las zeolitas naturales que han sido conocidas por la importancia en las aplicaciones industriales debido a su alta afinidad por el agua y a que sus cavidades sólo permiten el paso de moléculas de un cierto tamaño. Han sido utilizadas como aditivo en alimentos para animales, como abonos del suelo en agricultura debido a la alta retención del nitrógeno y la humedad del suelo, y como catalizador en procesos industriales de refinación, petroquímicos y química fina (Gupta *et al.*, 2000).

#### **3.6.1. Zeolitas naturales**

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos, en tres dimensiones, microporosa, teniendo como base una estructura cuadrada con un anión rígido, con canales y cavidades bien definidos. Estas cavidades contienen cationes metálicos intercambiables ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , etc) y también puede retener moléculas huésped removibles y reemplazables (agua en zeolitas naturales). Hasta la fecha cerca de 40 zeolitas se han caracterizado las estructuras y se han desarrollado más de 130 estructuras sintéticas. Las más importantes son las zeolitas naturales: analcime, chabazita, clinoptilolita, erionita, ferrierita, heulandita, laumontita y



mordonita phillipsite (Leyva-Ramos *et al.*, 2005). Siendo la Clinoptilolita la utilizada como soporte en el experimento que se presenta en esta tesis.

Las zeolitas están compuestas de aluminio, silicio, sodio, hidrógeno y oxígeno. La estructura cristalina se basa en las tres direcciones dimensionales con forma tetraédrica  $\text{SiO}_4$  con cuatro oxígenos compartidos con los tetraedros adyacentes. Las propiedades físicas aspectos únicos proporcionan para una amplia variedad de aplicaciones prácticas (Servin R. L., 2006).

Las propiedades físicas de la zeolita son que posee brillo, dureza y resistencia al desgaste. Las aplicaciones de zeolitas naturales hacen uso de uno o más de sus propiedades químicas, incluyendo generalmente la adsorción, intercambio iónico y la catálisis. Estas propiedades son una función de la estructura cristalina de cada especie, estructura catiónica y la composición (Servin R. L., 2006).

La Clinoptilolita se trata de una zeolita natural formada a partir de cenizas volcánicas en lagos y aguas marinas hace millones de años. Se ha utilizado como adsorbente de ciertos gases tóxicos tales como sulfuro de hidrógeno y dióxido de azufre (Monge-Amaya *et al.*, 2010).

### **3.7. Reactor de lecho fijo de flujo ascendente.**

Existen diferentes tipos de reactores, los cuales generalmente se clasifican en reactores tipo batch, semi-continuos y continuos. Los reactores batch son simples de operar e industrialmente son usados para cargas pequeñas. Los reactores continuos son ideales para ser tratados con fines industriales para grandes cantidades de substancia y pueden lograr un buen control de la calidad del producto. Los reactores semicontinuos son sistemas más flexibles, pero más difíciles de analizar y operar, en ellos la velocidad de reacción puede ser controlada con una buena estrategia en la dosificación de los reactantes. (Mongue-Amaya *et al.*, 2013).



El factor clave de un biorreactor es mantener a los microorganismos en la etapa de crecimiento el mayor tiempo posible. Esto se logra controlando las condiciones ambientales (temperatura, pH, aeración y disponibilidad de nutrientes) y los flujos de entrada y salida por lo que nunca falta alimento y no llegan a la fase de muerte o endógena.

Numerosos diseños de reactores sulfato-reductores han sido reportados en la literatura para el tratamiento de DAM y otros efluentes industriales sintéticos y reales (Kaksonen y Puhakka, 2007). Sin embargo, una de los principales limitantes de estos reactores es el pobre contacto del agua residual con la biomasa, por la presencia de zonas muertas con mezclado deficiente (Almendáriz-Tapia, 2005).

Generalmente, las reglas de diseño de los reactores biológicos son basadas en la alta eficiencia de remoción de materia orgánica degradable. En principio el diseño de reactores para el tratamiento anaerobio de aguas residuales puede aplicarse en el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato, en donde la materia orgánica se remueve por reducción de sulfato y metanogénesis (Lens *et al.*, 1998).

El sistema de biorreactores anaerobios es ampliamente utilizado para el tratamiento de aguas residuales, sin embargo también es posible adaptar este sistema para el tratamiento de drenaje ácido de minas (DAM) con la presencia de bacterias sulfato reductoras que pueden reducir la DQO, con lo cual no se produce metano pero si  $H_2S$  (Nina, 2008).

Los reactores anaerobios de lecho empacado han sido usados para el tratamiento de aguas residuales de alta carga. En estos, grandes cargas de biomasa permanece en el soporte asegurando la retención del sólido a pesar de tiempos de residencia hidráulica cortos. Estos reactores presentan muchas ventajas en comparación con los reactores aerobios y anaerobios tales como: cargas orgánicas más altas, menores tiempos de retención hidráulica y volumen pequeño del reactor (Kocadagistan *et al.*, 2005). Además, la alta tasa de recirculación favorece la dilución de las concentraciones de los influentes, siendo esto propicio para el tratamiento de compuestos tóxicos (Almendáriz-Tapia, 2005).



Los compuestos orgánicos solubles en el agua residual del influente pasan en estrecha proximidad a la biomasa y se difunden en la superficie de los sólidos unidos o granulados. Estos son convertidos en productos intermedios o finales, específicamente metano y dióxido de carbono (Gourari *et al.*, 1997).

La biomasa es agrupada en tres partes: biopelícula en el fondo, la cual es la carga más grande; biopelícula en la parte superior, que tiene la actividad metanogénica específica más alta; y la biomasa no inmovilizada (Hanaki *et al.*, 1994).

A pesar de los problemas que ocasiona la sulfato-reducción al interior de los reactores anaerobios, este proceso puede presentar algunas ventajas (Elferink, 1994):

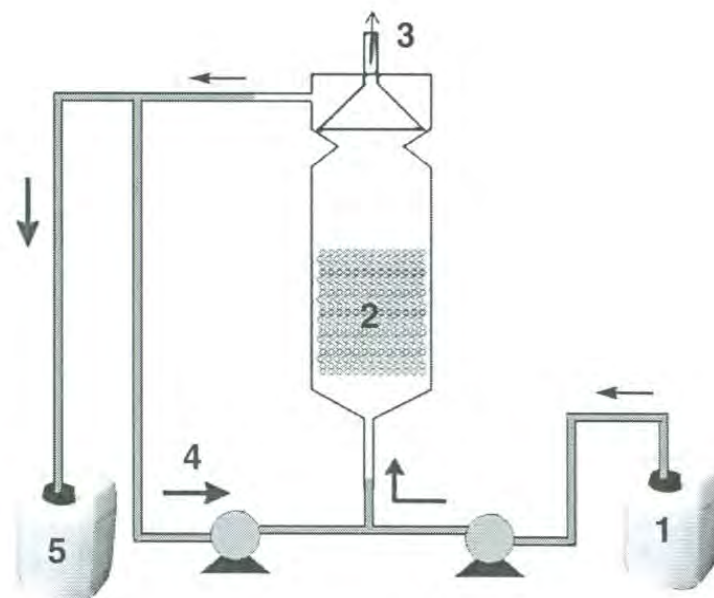
1. Contribuye a mantener un bajo potencial de óxido-reducción en el sistema;
2. Constituye un método biotecnológico para la remoción de sulfato;
3. Los complejos Metal-S<sub>2</sub> tienen baja solubilidad, propiedad que puede ser utilizada para la precipitación de metales pesados.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Estudios en continuo

Los estudios en continuo se llevaron a cabo en un reactor de lecho empacado de lecho fijo. El reactor fue una columna de vidrio con un volumen de 1.2 L, una altura de 24 cm y un diámetro interno de 7.3 cm (Figura 4.1) empacada con 300 g de zeolita clinoptilolita de 0.5 mm como tamaño de partícula e inoculada con 300 mL de lodo anaerobio proveniente de la industria cervecera. Las condiciones de operación fueron: un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de un día, un flujo de alimentación (F) de 1.2 L/d, una velocidad ascensional ( $V_{as}$ ) de 0.1314 m/h. La temperatura se mantuvo a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2$  y un pH de 7.

El reactor fue alimentado con un medio mineral con una relación DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.67, dicha relación en base a su estequiometría es suficiente para que la degradación de la materia orgánica se realice únicamente por sulfato-reducción. El medio mineral usado se describe en la Tabla 4.1.



**Figura 4.1** Reactor de Lecho fijo

Influente; 2) Empaque; 3) Biogás; 4) Recirculación; 5) Efluente



**Tabla 4.1. Medio mineral**

		Elementos traza	
Compuesto	mg/L	Compuesto	mg/L
NH <sub>4</sub> Cl	1045	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2000
KCl	270	MnCl <sub>2</sub>	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	EDTA	500
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	3851	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	100
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	50	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
NaHCO <sub>3</sub>	125	ZnCl <sub>2</sub>	50
Extracto de levadura	20	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
Dextrosa	938	AlCl <sub>3</sub>	50
Elementos traza	1 mL	NiCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50
		CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		HCl concentrado	1mL/L
		EDTA=Ácido etilenodiaminotetracético	

## 4.2. Estudios en lote

Los ensayos en lote se realizaron una vez que la biomasa se encontró inmovilizada (día 55), con el objetivo de estudiar la cinética de las bacterias sulfato-reductoras y encontrar la actividad sulfidogénica, estos estudios se llevaron a cabo por duplicado en botellas serológicas de 120 mL. Las cuales se prepararon con el medio mineral indicado en la Tabla 4.1, y con una concentración de biomasa de 2 g/L de sólidos suspendidos volátiles y una relación F/M de 1. Las botellas se taparon con tapones de caucho y arillos de aluminio y la temperatura de incubación fue de 30 °C, durante un periodo de 36 horas. El arreglo experimental para el monitoreo de producción de biogás fue por desplazamiento de una solución salina saturada mismo que se describe en la sección 4.3.5. Se monitoreó la producción de biogás, sulfuros y la DQO cada 6 horas.

## 4.3. Métodos analíticos

### 4.3.1. Alcalinidad

La relación de alcalinidad ( $\alpha$ ) es un método que estima la capacidad de amortiguación del pH del sistema a través de la medida indirecta de ácidos grasos volátiles y bicarbonato. La relación debe mantenerse entre 0.6 y 0.9 indicando una alcalinización eficiente (Jenkins *et al.*, 1983).

Para esta técnica se utilizó la de Standard Methods, 1999, la cual consiste en:

Tomar 25 mL de muestra fresca del efluente del reactor y colocarla en un vaso de 100 mL. Posteriormente ponerlo en agitación constante sobre una placa magnética e inmediatamente medir el pH inicial. Enseguida titular con una solución 0.02N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El ácido se adiciona lentamente hasta llegar a un pH



de 5.75 (promedio al que se titulan el 80% de los carbonatos). Se continua agregando el ácido hasta llevar a un pH de 4.30 (promedio al que se titulan los AGV). Al finalizar se registran los volúmenes del ácido gastado y se calculaba la relación de alcalinidad en base a la “Ec. (4.1)”.

$$\alpha = \frac{\text{mL pH } 5.75}{\text{mL pH } 4.30} \quad \text{Ec. (4.1)}$$

#### **4.3.2. Demanda química de oxígeno (DQO)**

Se determinó mediante la técnica de digestión en reflujo cerrado (Standard Methods, 1999). El método consiste en la digestión de la muestra tanto del influente como del efluente con una mezcla crómica seguido de calentamiento a 150°C durante 2 horas. Cuando la muestra es digerida, el ión dicromato oxida la materia orgánica presente, lo cual resulta en el cambio de estado del cromo de  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$ . El ión crómico formado absorbe fuertemente a una longitud de onda de 620 nm, el cual es leído con la ayuda de un colorímetro Hach DR/890. La curva estándar que se utilizó se encuentra en el anexo B.

#### **4.3.3. Sulfuros**

El ión sulfuro se determinó por el método yodométrico (Métodos Estándar para el análisis de aguas residuales, 1995), que se basa en la capacidad oxidante débil del yodo frente a un reductor fuerte como es el ion sulfuro, en medio ácido, que consiste en una titulación inversa del yodo que se lleva a cabo de la siguiente manera:

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL se colocan 10 mL de agua destilada, 10 mL de la solución de yodo 0.025N, 1 mL de HCl 3N, 5 mL de la muestra y 5 gotas de almidón como indicador, inmediatamente con ayuda de una bureta se

procede a la titulación con la solución de tiosulfato de sodio 0.025N. Se lee los mililitros gastados y se realiza el cálculo de los sulfuros con la siguiente ecuación:

$$S^{2-} \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(A \cdot B) - (C \cdot D)}{V} \times meqS^{2-} \quad \text{Ec. (4.2)}$$

Dónde:

A= mL solución de yodo

B= Normalidad solución de yodo

C= mL solución de tiosulfato

D= Normalidad de la solución de tiosulfato

V= Volumen de la muestra (mL)

$meqS^{2-} = 16000 \text{ mgS}^{2-}$

Cabe mencionar que la muestra fue tomada directamente del interior del reactor, y la titulación se realizó en el periodo de los siguientes 30 segundos, ya que el ion sulfuro es un gas volátil.

#### **4.3.4. Biomasa inmovilizada**

El método consiste en tomar directamente del reactor una muestra de zeolita con biomasa y lavarla con agua destilada para remover la biomasa que no se encuentra adherida en el soporte, posteriormente se determinan los sólidos de acuerdo al procedimiento gravimétrico estándar para sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos fijos



en el lodo (SSF) descrito en los métodos estandarizados para el análisis de agua y agua residual (APHA, 1995).

Los sólidos suspendidos totales se determinaron a partir de los lodos (lavados previamente) del reactor durante 30 días, dando inicio el día del montaje del reactor (día 0) y muestreando constantemente durante el periodo experimental. El procedimiento consistió en lavar los crisoles y calentarlos en la mufla a 550 °C durante una hora; a continuación se dejaron enfriar en el desecador antes de pesarlos. Una vez obtenido este peso, se registró como "peso del crisol". Posteriormente se pesó la muestra del lodo por triplicado y se anotó como "peso muestra". Después se colocaron en una estufa a 100 °C hasta eliminar el agua remanente, y se pasaron al desecador, se pesaron y se registró como "Peso seco a 100 °C". Los residuos se calcinaron en la mufla a 550°C durante 30 minutos y se pasaron al desecador, tomándose como "Peso ceniza a 550 °C". Una vez obtenidos los cuatro pesos, se procedió a determinar los sólidos suspendidos totales (SST), fijos (SSF) y volátiles (SSV) con las siguientes ecuaciones.

$$SST \left( \frac{gSST}{g \text{ lodo}} \right) = \frac{\text{Peso seco a } 100 \text{ } ^\circ\text{C} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso muestra}} \quad \text{Ec. (4.3)}$$

$$SSF \left( \frac{gSSF}{g \text{ lodo}} \right) = \frac{\text{Peso seco a } 550 \text{ } ^\circ\text{C} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso muestra}} \quad \text{Ec. (4.4)}$$

$$SSV \left( \frac{gSSV}{g \text{ lodo}} \right) = SST - SSF \quad \text{Ec. (4.5)}$$

### 4.3.5. Biogás

Para medir la cantidad de biogás producido durante la reacción, se utilizan botellas serológicas de 190 mL llenas con una solución salina saturada, se colocan con la boca abajo en un soporte especial de madera, se le inserta una aguja y una manguera, y del otro extremo de la manguera se conecta a la botella de la muestra a la cual se le desea medir el biogás, éste escapa por la manguera y entra a la botella que comienza a desplazar la solución salina al exterior por medio de la aguja, la solución es colectada y medida como se muestra en la Figura 4.2.



**Figura 4.2.** Medición por desplazamiento de biogás producido.

- 1) Botella serológica muestra, 2) Botella serológica con solución salina saturada, 3) Probeta para medir el líquido desplazado.



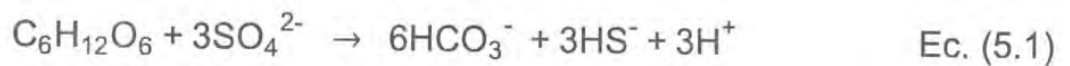
#### **4.3.6. Medición pH**

El pH se midió diariamente a la entrada y salida del reactor (influyente y efluente), utilizando un potenciómetro Orion 4 STAR pH ISE Benchtop (Termo Electron Corporation) con un electrodo Cole Parmer. Para la calibración del equipo se utilizarán soluciones reguladoras de pH.

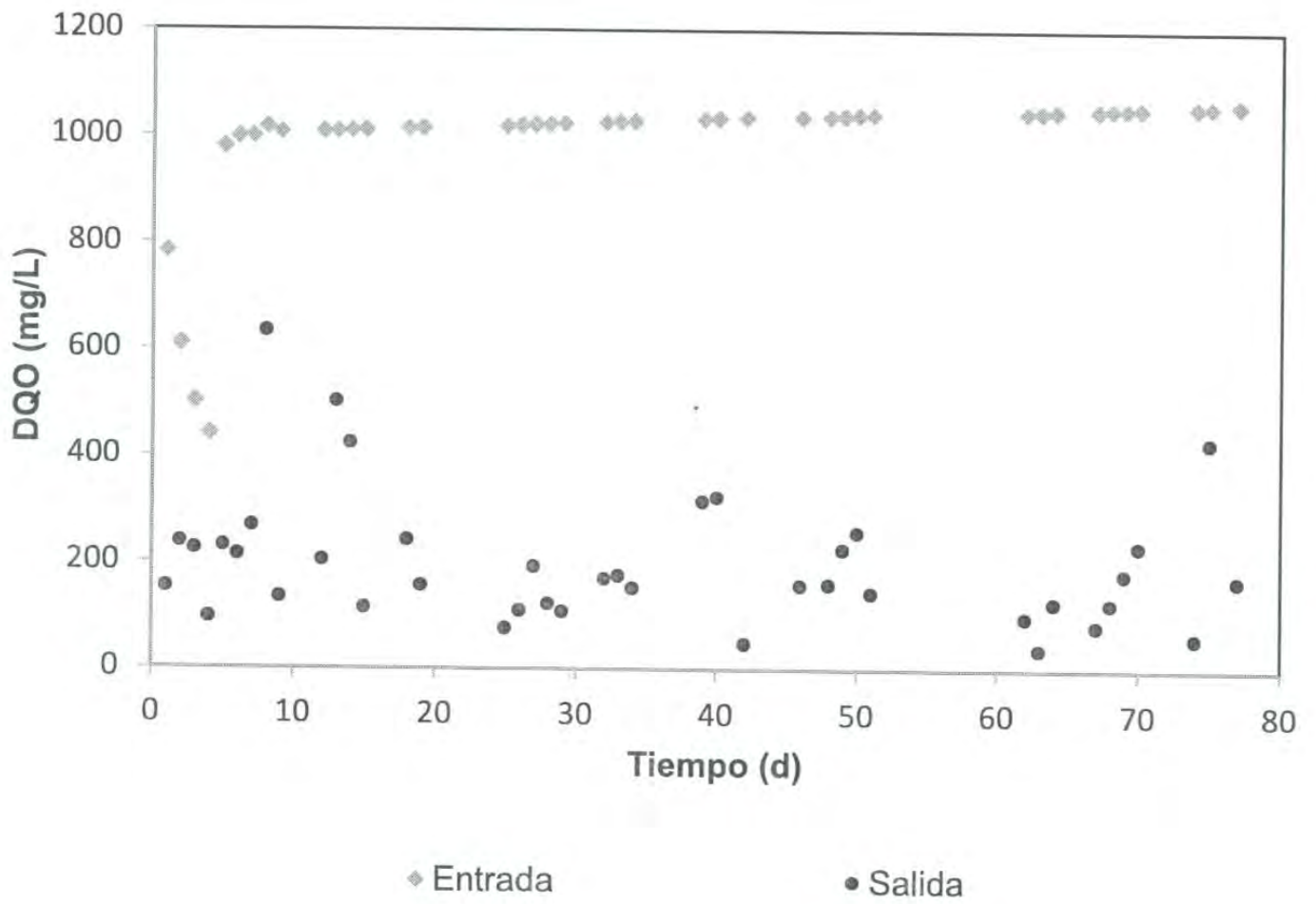
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Estudios en continuo

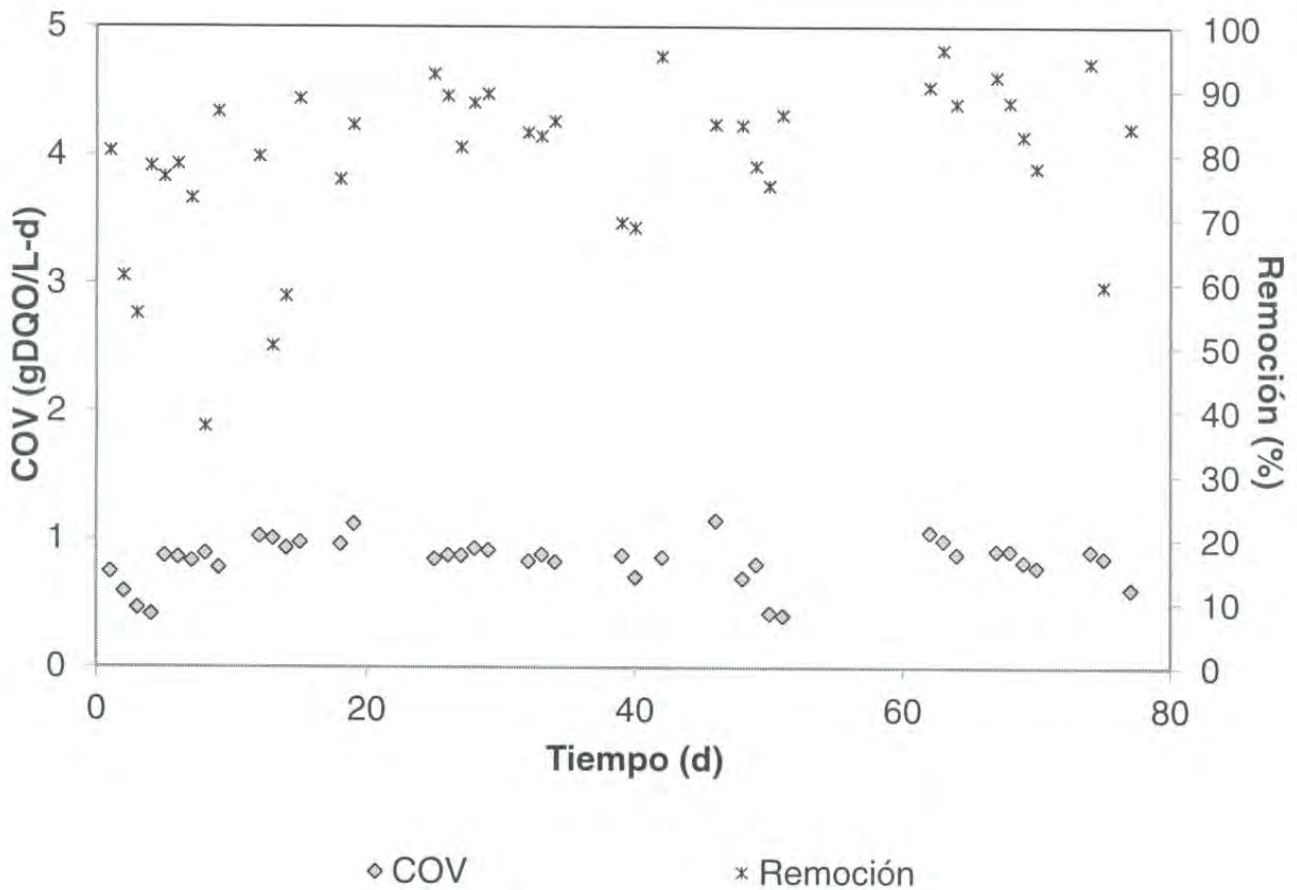
Se realizó una mezcla con 300 g de zeolita y 300 mL de lodo anaerobio metanogénico (10 gSSV) con la cual se inoculó el reactor. Desde el primer día el reactor fue alimentado bajo condiciones sulfato-reductoras con la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> estequiométrica de 0.67 de acuerdo a la ecuación 5.1 (Warounsak y Ajit, 2007). Durante los primeros cuatro días se alimentó a una carga orgánica baja (0.46-0.75 gDQO/L-d) con la finalidad de adaptar el reactor a las condiciones sulfato-reductoras logrando remover el 78% de la materia orgánica. Posteriormente del día 5 al día 77 se aumentó la concentración a 1000 mgDQO/L y la carga orgánica varió de 0.87 a 1.15 gDQO/L-d ya que esta dependía del tiempo de residencia hidráulica (TRH). Durante este tiempo la eficiencia de remoción permaneció en un promedio del 80%. (Figuras 5.1 y 5.2)







**Figura 5.1.** Consumo de la materia orgánica del reactor Sulfato-reductor de lecho empacado.



**Figura 5.2.** Eficiencia de remoción de la materia orgánica del reactor sulfato-reductor de lecho empacado.

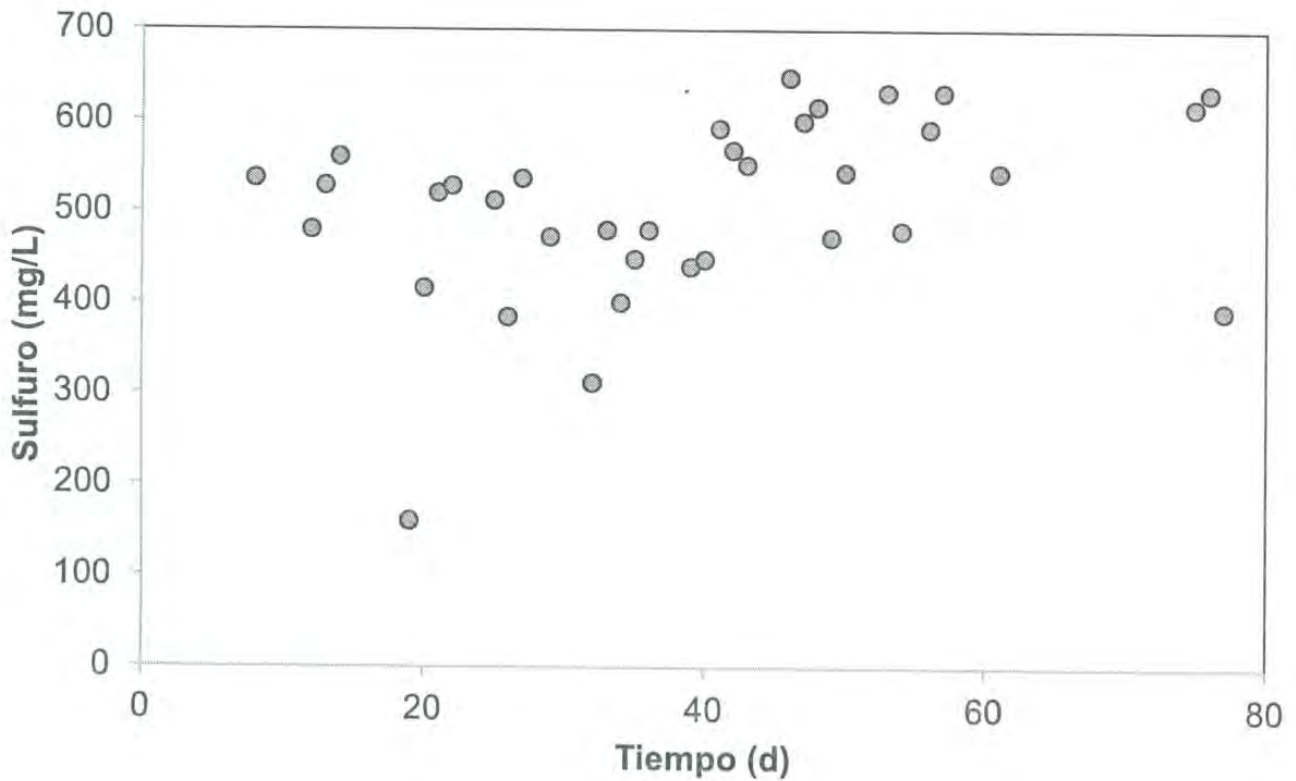
Se obtuvo una producción promedio de  $507 \text{ mgS}^2/\text{L}$  (Figura 5.3) durante los 77 días del experimento en continuo, con una eficiencia de conversión de sulfato a sulfuro del 99% de acuerdo a la ecuación 5.1.

De acuerdo a la cantidad que se produjo de sulfuro y en base a las ecuaciones 5.2 – 5.5 se puede lograr la bioprecipitación de 0.88 g Fe, 1 g Cu, 0.86 g Mn, y 1.03 g Zn (Tabla 5.1).



**Tabla 5.1.** Capacidad del sulfuro para bioprecipitar metales.

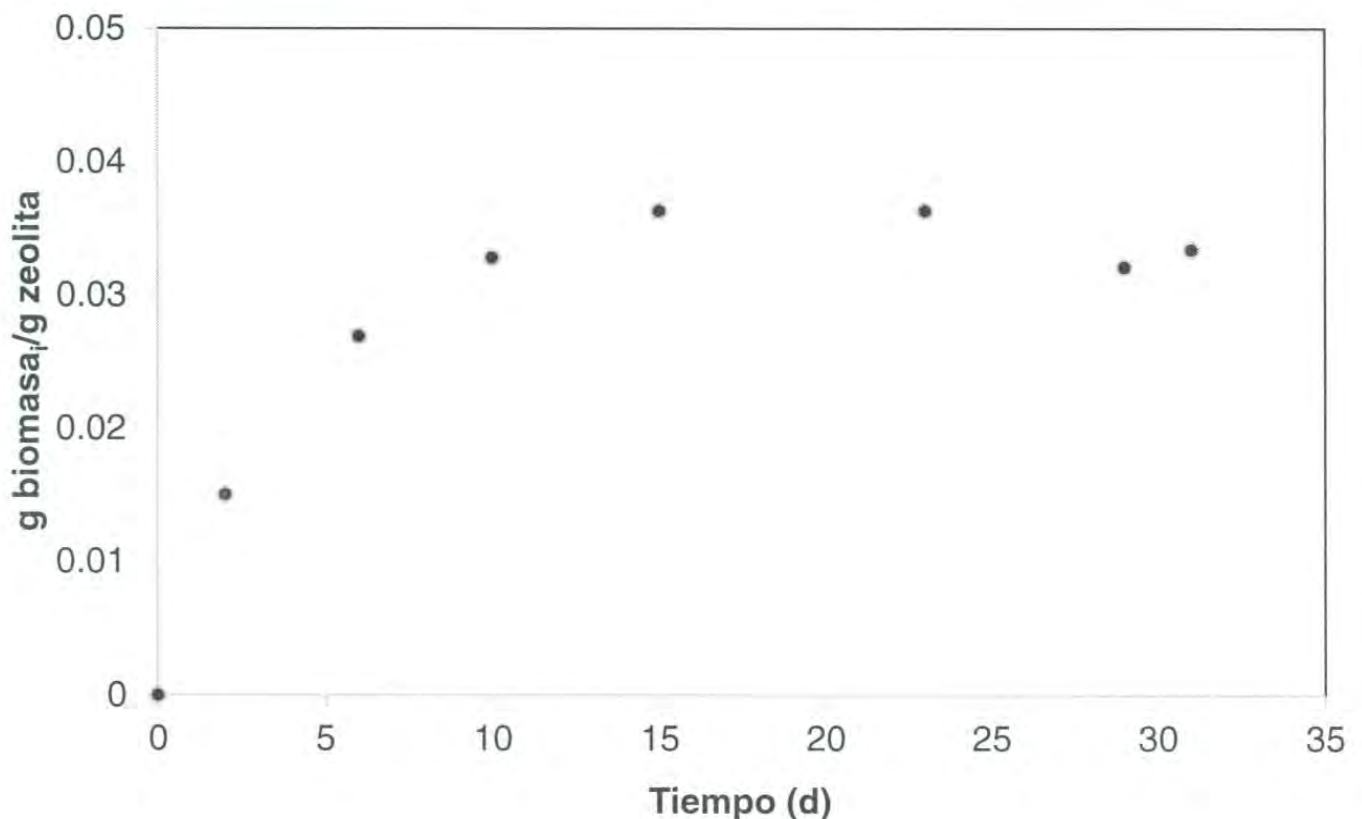
Ecuaciones de balance		Metal bioprecipitado
$Fe^{2+} + S^{2-} \longrightarrow FeS \downarrow$	Ec. (5.2)	1.74 g Fe/g $S^{2-}$
$Cu^{2+} + S^{2-} \longrightarrow CuS \downarrow$	Ec. (5.3)	1.98g Cu/g $S^{2-}$
$Mn^{2+} + S^{2-} \longrightarrow MnS \downarrow$	Ec. (5.4)	1.71 g Mn/g $S^{2-}$
$Zn^{2+} + S^{2-} \longrightarrow ZnS \downarrow$	Ec. (5.5)	2.04 g Zn/g $S^{2-}$



**Figura 5.3.** Producción de sulfuros del reactor sulfato-reductor de lecho empacado.

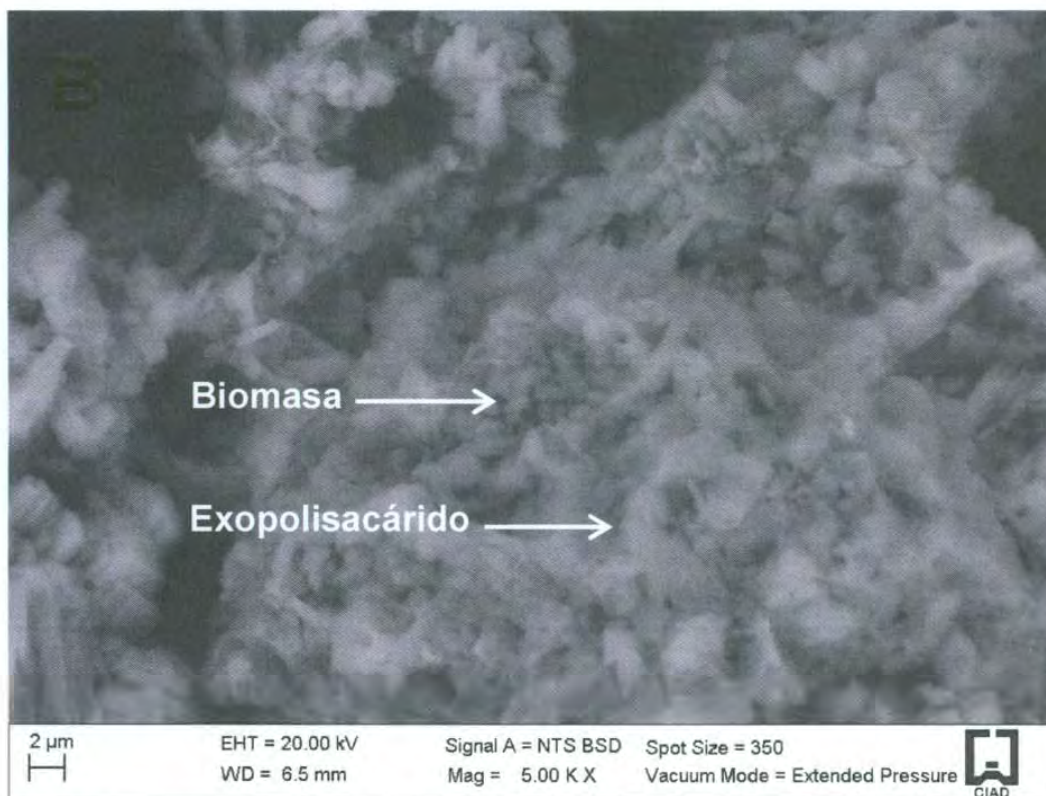
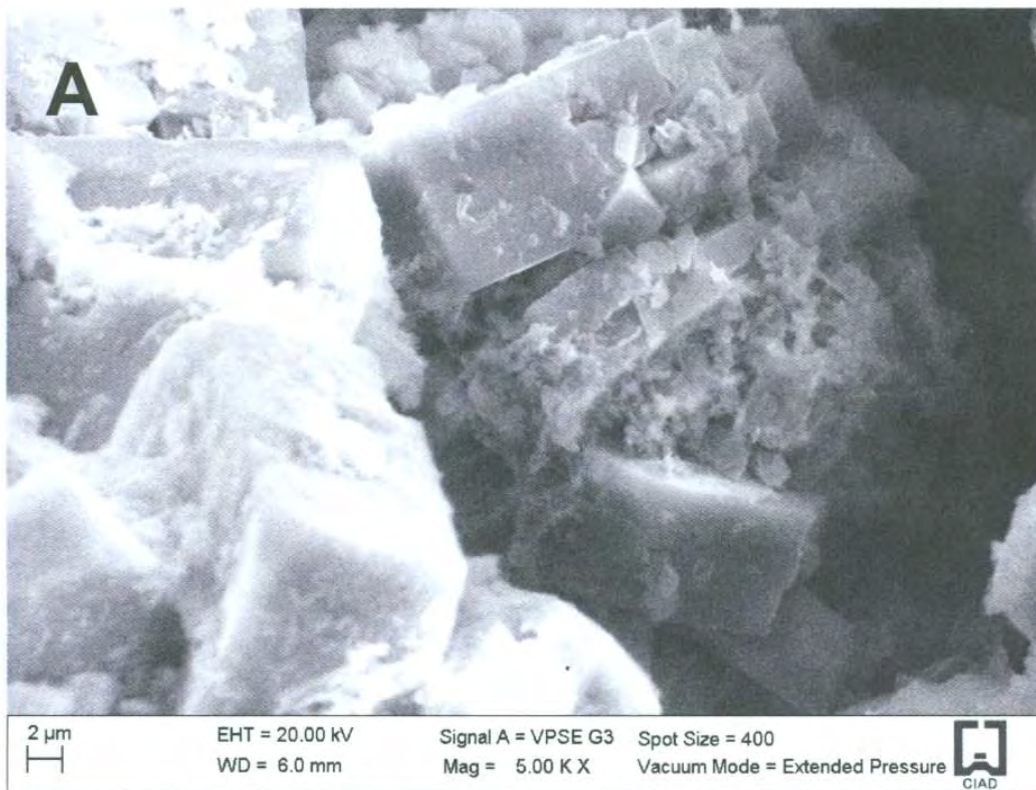
En la Figura 5.4 se observa que la biomasa sulfato-reductora se inmovilizó sobre la zeolita clinoptilolita a partir del segundo día con un valor de 0.0150 g biomasa/g zeolita y alcanzó un máximo al día 15 de 0.0363 g biomasa/g zeolita con una velocidad de formación de biomasa de 0.9 gSVI/d en el reactor.

Durante la inmovilización se observaron depósitos color amarillo-blanquecino, una característica del azufre elemental de origen biológico (Lens y Hulshoff Pol, 2000). Utilizando un microscópico electrónico de barrido ambiental Carl Zeiss modelo EVO LS 10 con detector de electrones secundarios y retrodispersos y una magnificación de 5000X, se observan en las fotomicrografías de MEB la adherencia de la biomasa en la zeolita presentando una alta concentración de exopolímeros asociado con la formación de la biopelícula (Figura 5.5. B) en comparación con el blanco de zeolita sin biomasa (Figura 5.5 A).

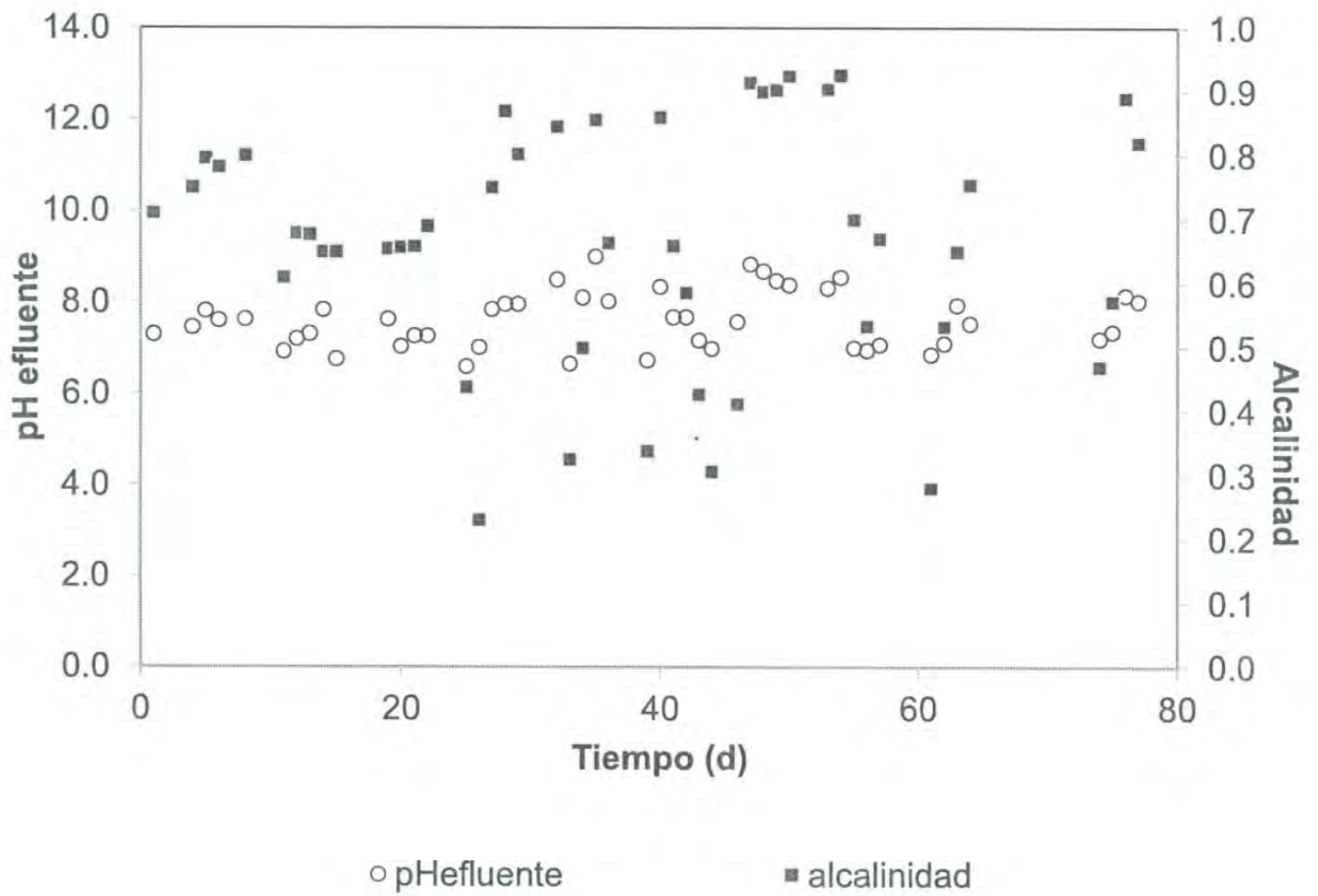


**Figura 5.4.** Inmovilización de biomasa sulfato-reductora sobre zeolita clinoptilolita.





**Figura 5.5.** Fotomicrografías de MEB A) Zeolita tomada con un detector de electrones secundarios; B) Biomasa inmovilizada en zeolita (día 15) tomada con un detector de electrones retrodispersos



**Figura 5.6.** Capacidad amortiguadora del reactor sulfato-reductor de lecho empacado.



Durante el desarrollo experimental, el reactor fue alimentado con un pH de entrada de 6.5, y en la salida se observó un pH promedio de 7.6 y una relación de alcalinidad en promedio de 0.8 lo que indica una buena producción de  $\text{HCO}_3^-$  (ecuación 5.1). Durante el periodo se presentaron días en los que la alcalinidad bajo a niveles inferiores a 0.5 posiblemente por una alta producción de ácidos grasos volátiles (Figura 5.6), pero se controló el proceso agregando  $\text{NaHCO}_3$  directamente en el sobrenadante del biorreactor.

Según Barton y Tome (1995), las BSR crecen mejor bajo condiciones levemente alcalinas, en un relativamente estrecho rango de pH (entre 7.0 y 7.8). Sin embargo, se han encontrado BSR con capacidad de tolerar ambientes levemente ácidos (pH 4.0) así como también especies con capacidad de desarrollarse en ambientes alcalinos (pH 9.5).

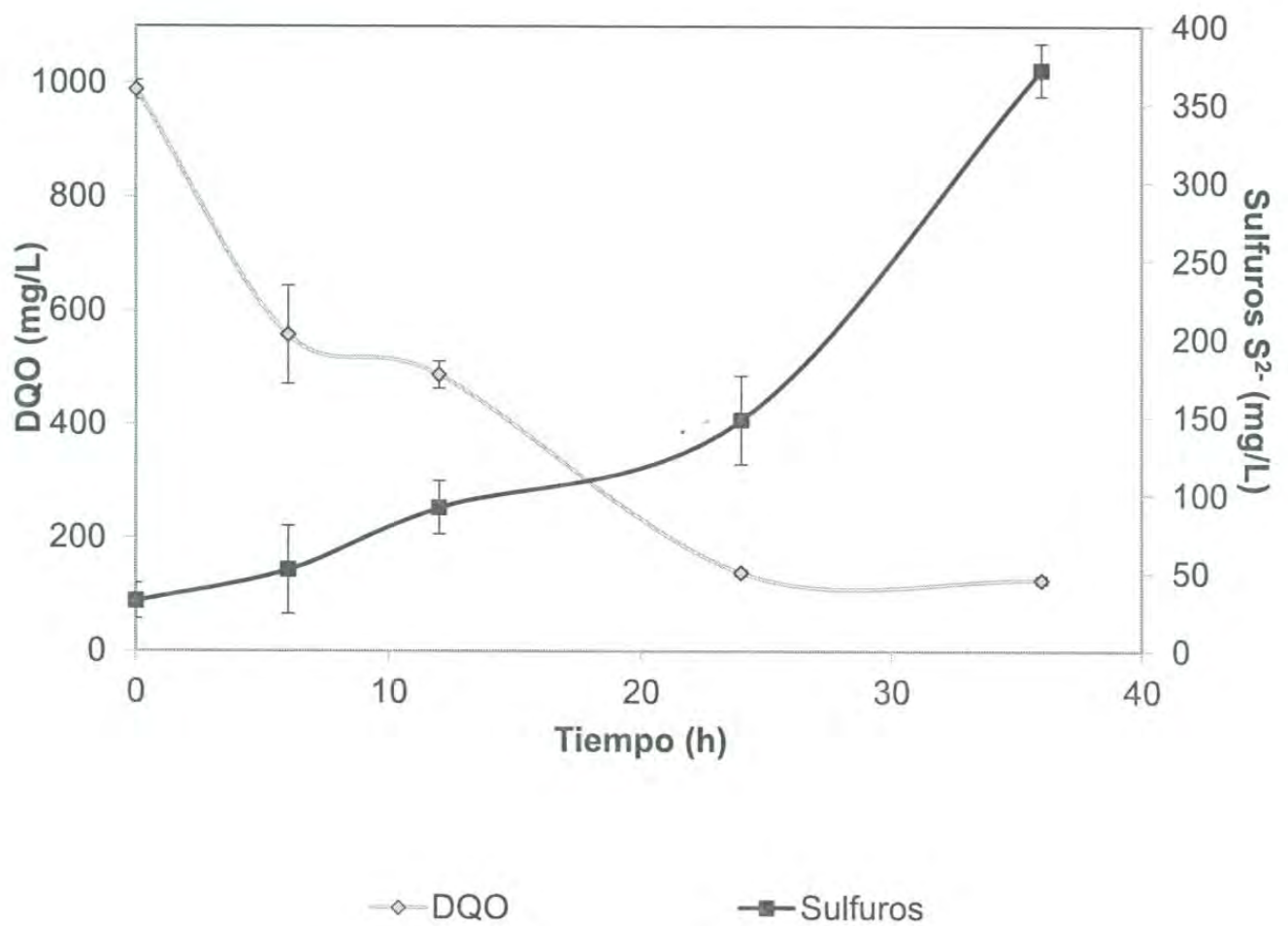
## 5.2. Estudios en lote

En el día 55, se extrajo del reactor una muestra del lodo con la finalidad de realizar estudios en lote para determinar la capacidad de la biomasa sulfato-reductora inmovilizada de producir sulfuros. En la Figura 5.7 se observa que la remoción de la materia orgánica se logró en 24h con una actividad de remoción específica de 0.4 gDQO/gSSV-d.

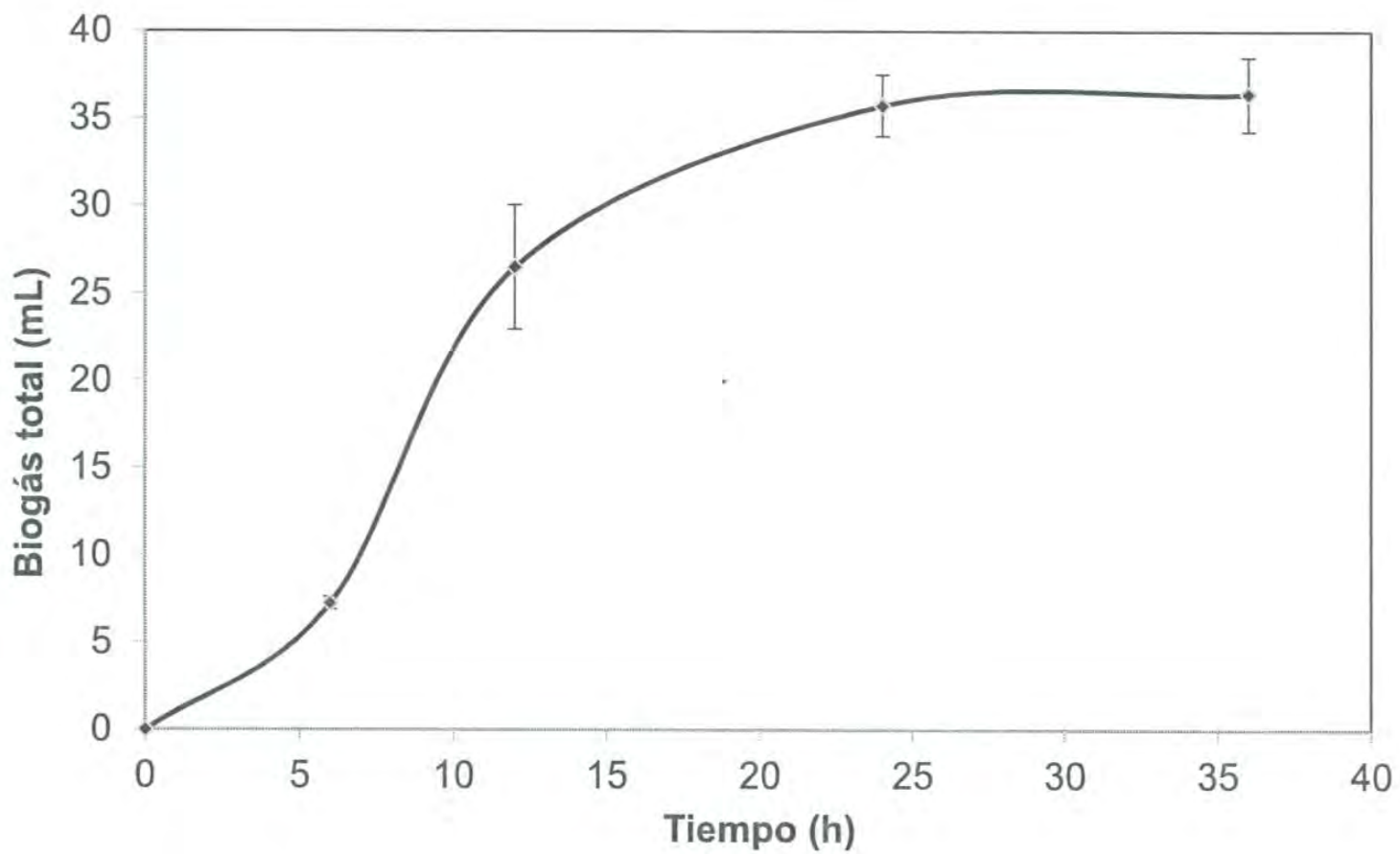
Con la remoción de la DQO, se logró la bioconversión del  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{S}^{2-}$ , obteniendo una producción de 372 mg/L de sulfuros con una actividad sulfidogénica específica de 0.11 g $\text{S}^{2-}$ /gSSV-d y de acuerdo a la ecuación 5.1 se logró recuperar el 75% del sulfuro esperado, lo cual pudo deberse a que el sulfuro restante pudo liberarse en forma de gas como  $\text{H}_2\text{S}$  lo cual se evidenció por un olor característico a huevo podrido en el biogás recuperado (Figura 5.7).

En la Figura 5.8 se observa que la producción de biogás total alcanzó un máximo de 36 mL. El biogás total recuperado puede estar compuesto por  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y una pequeña cantidad de  $\text{CH}_4$  (Gibson, 1998).





**Figura 5.7.** Remoción de la materia orgánica por la biomasa inmovilizada.



**Figura 5.8.** Producción de biogás por las bacterias sulfato-reductoras inmovilizadas.



## 6. CONCLUSIONES

- La zeolita clinoptilolita debido a su naturaleza porosa resultó ser buen soporte para la inmovilización de biomasa sulfato-reductora, logrando que las bacterias se adhirieran durante los primeros 5 días alcanzando el máximo a partir del día 15.
- Las condiciones de operación como la relación de  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0.67, pH, TRH permitieron la rápida activación del consorcio sulfato-reductor obteniendo una bioconversión del sulfato a sulfuro relacionada con el consumo de la materia orgánica, superior al 90% a partir del octavo día.
- Los experimentos en lote demostraron que la zeolita es un buen soporte para inmovilizar biomasa sulfato-reductora, ya que esta presentó una buena actividad sulfidogénica de  $0.11 \text{ gS}^{2-}/\text{gSSV-d}$ , con un consumo del 90% de la materia orgánica en 24h.
- Por último, se concluye que el proceso es eficaz para remover simultáneamente materia orgánica, sulfatos y bioprecipitar metales, ya que con la cantidad de sulfuro producido de  $507 \text{ mg/L}$  el sistema puede ser apto para el tratamiento de efluentes con concentraciones de metales pesados divalentes en el rango de  $0.88$  a  $1.03 \text{ g de } M^{2+}/L$ .

## ANEXO A

### Cálculo de la DQO teórica de la glucosa

El equivalente teórico de la demanda química de oxígeno (DQO) de la glucosa se calculó de acuerdo a la reacción de oxidación de la glucosa por el oxígeno (ecuación 1).



$$180 \text{ gGlucosa} \equiv 192 \text{ gO}_2$$

$$1 \text{ gGlucosa} \equiv 1.066 \text{ gO}_2 = 1.066 \text{ gDQO/gGlucosa}$$

$$1.066 \text{ gO}_2 = 1.066 \text{ gDQO/gGlucosa}$$

### Cálculo de la relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

La DQO que se convierte en sulfuro puede calcularse basándose en las concentraciones de sulfato consumido o del sulfuro producido. En estos cálculos la cantidad de sulfato reducido o sulfuro producido debe de convertirse en términos de DQO usado de acuerdo a la reacción 5.1:

$$180 \text{ gGlucosa} \equiv 288 \text{ gSO}_4^{2-}$$

$$1 \text{ gGlucosa} \equiv 1.066 \text{ gDQO/gGlucosa}$$

$$1 \text{ gGlucosa} \equiv 1.6 \text{ gSO}_4^{2-}$$

$$\text{DQO/ SO}_4^{2-} = 0.67$$

T-150095



## ANEXO B

### Curva de calibración para determinar la DQO

Tabla B.1. Curva estándar de la demanda química de oxígeno (DQO).

Concentración (mg/L)	ABS (620nm)
0	0
100	0.057
200	0.097
400	0.203
800	0.386
1000	0.503

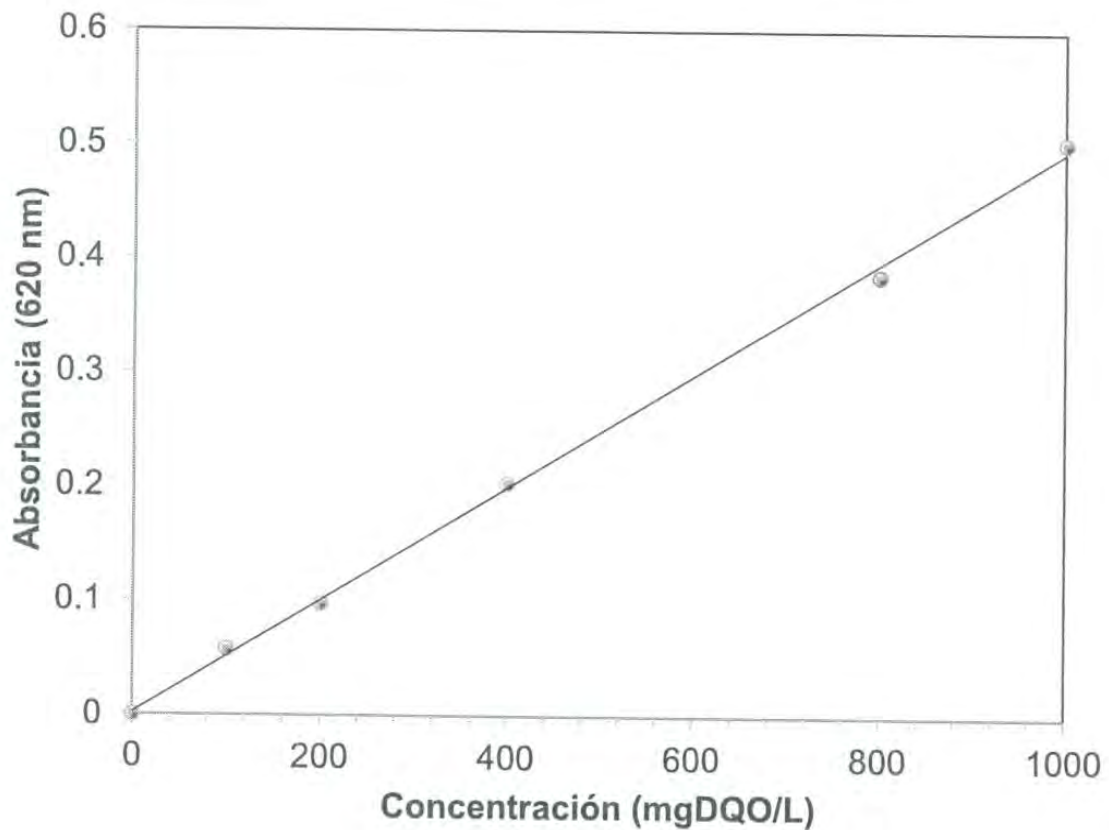


Figura B.1. Curva estándar de la demanda química de oxígeno.  
( $ABS = 0.0005 \cdot DQO + 0.002$ ;  $R^2 = 0.9988$ )

## ANEXO C

### Cálculo velocidad ascensional

$$V_{as} = \frac{F + F_R}{A_r} [=] \frac{m}{h}$$

Dónde:

F= Velocidad influente

F<sub>R</sub>= Velocidad reflujó

A<sub>r</sub>= Área seccional

$$V_{as} = \frac{\left| 1.2 \frac{L}{d} + 12 \frac{L}{d} \right| \left| \frac{1m^3}{1000L} \right| \left| \frac{1d}{24h} \right| [=] 0.1314 \frac{m}{h}}{\left| 41.85cm^2 \right| \left| \frac{1m^2}{10000cm^2} \right|}$$



## ANEXO D

### Resultados de la inmovilización celular

Día 2:

Muestra	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso seco a 100 °C (g)	Peso cenizas a 550 °C (g)	SST (gSST/glodo)	SSF (gSSF/glodo)	SSV (gSSV/glodo)
1	1.0561	13.1717	13.7260	13.7095	0.5249	0.5092	0.0157
2	1.4729	16.2957	17.0628	17.0410	0.5208	0.5060	0.0148
3	1.2245	13.0657	13.6893	13.6716	0.5093	0.4948	0.0145
<b>Promedio:</b>							0.0150

Día 6:

Muestra	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso seco a 100 °C (g)	Peso cenizas a 550 °C (g)	SST (gSST/glodo)	SSF (gSSF/glodo)	SSV (gSSV/glodo)
1	1.2785	17.7287	18.4499	18.4176	0.5641	0.5388	0.0253
2	1.6042	16.1859	17.0545	17.0097	0.5415	0.5135	0.0280
3	1.2955	15.6058	16.2993	16.2638	0.5353	0.5079	0.0274
<b>Promedio:</b>							0.0269

Día 10:

Muestra	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso seco a 100 °C (g)	Peso cenizas a 550 °C (g)	SST (gSST/glodo)	SSF (gSSF/glodo)	SSV (gSSV/glodo)
1	1.5636	12.5873	13.3930	13.3388	0.5153	0.4806	0.0347
2	1.3518	13.8239	14.5123	14.4709	0.5092	0.4786	0.0306
3	1.0246	13.1711	13.7107	13.6767	0.5266	0.4935	0.0332
<b>Promedio:</b>							0.0328

Día 15:

Muestra	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso seco a 100 °C (g)	Peso cenizas a 550 °C (g)	SST (gSST/glodo)	SSF (gSSF/glodo)	SSV (gSSV/glodo)
1	1.0751	12.5861	13.1562	13.1170	0.5303	0.4938	0.0365
2	1.7213	13.5579	14.4282	14.3659	0.5056	0.4694	0.0362
3	1.3377	16.2957	16.9692	16.9208	0.5035	0.4673	0.0362
<b>Promedio:</b>							0.0363

Día 23:

Muestra	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso seco a 100 °C (g)	Peso cenizas a 550 °C (g)	SST (gSST/glodo)	SSF (gSSF/glodo)	SSV (gSSV/glodo)
1	2.2179	15.6065	16.7233	16.6431	0.5035	0.4674	0.0362
2	1.8728	13.8243	14.7823	14.7132	0.5115	0.4746	0.0369
3	2.1108	13.1718	14.2502	14.1733	0.5109	0.4745	0.0364
<b>Promedio:</b>							0.0365

Día 29:

Muestra	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso seco a 100 °C (g)	Peso cenizas a 550 °C (g)	SST (gSST/glodo)	SSF (gSSF/glodo)	SSV (gSSV/glodo)
1	1.0082	12.5856	13.1092	13.0752	0.5193	0.4856	0.0337
2	0.9650	13.5560	14.0473	14.0159	0.5091	0.4766	0.0325
3	1.1208	16.2948	16.8594	16.8252	0.5037	0.4732	0.0305
<b>Promedio:</b>							0.0323

Día 31:

Muestra	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso seco a 100 °C (g)	Peso cenizas a 550 °C (g)	SST (gSST/glodo)	SSF (gSSF/glodo)	SSV (gSSV/glodo)
1	1.8024	15.6058	16.5091	16.4511	0.5012	0.4690	0.0322
2	1.1773	13.8240	14.4367	14.3961	0.5204	0.4859	0.0345
3	1.2117	13.1714	13.8039	13.7634	0.5220	0.4886	0.0334
<b>Promedio:</b>							0.0334



## 7. REFERENCIAS

- Akhtar, N., Iqbal, J. y Iqbal, M., (2004), Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by *Loofa* sponge immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana* characterization studies. *J. Hazard. Mater.* 94: 108, 85.
- Alexander M. (1999). Biodegradation and Bioremediation. Second Edition. *Academic Press*.
- Almendáriz-Tapia F.J. (2005). Tratamiento de sosas gastadas en un reactor de lecho expandido de lodos granulares anaerobios (EGSB). Tesis de Doctorado en Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa*. 98p.
- Altaş L. (2008). Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. *Journal of Hazardous Materials*. Article in press. 6p.
- Alvarez M.T., Crespo C. y Mattiasson B. (2007). Precipitation of Zn(II), Cu(II) and Pb(II) at bench-scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids. *Chemosphere*. 66(9), pp. 1677-1683.
- Andalib M., Nakhla G., McIntee E. y Zhu J. (2011). Simultaneous denitrification and methanogenesis (SDM): Review of two decades of research. *Desalination Elsevier*.
- Angelova V., Ivanova R., Delibaltova V. e Ivanov K. (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19:197-205.
- Angelova, M.B., Pashova, S.B., Slokoska, K.S. (2000), Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells. *Enzyme Microbiology Technology*. 26: 544–549.

- APHA, (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington DC., USA.
- Badmus M.A.O., Audu T.O.K. y Anyata B.U. (2007). Removal of heavy metal from industrial wastewater using hydrogen peroxide. *African Journal of Biotechnology*. 6(3), pp. 238-242.
- Barton L. L. and Tomei F. A. (1995) Characteristics of sulphate reducing bacteria. In: Barton L. L. (Editor), *Biotechnology Handbooks: Sulphate Reducing Bacteria*, Plenum Press, New York.
- Bhagat M., Burgess J.E., Antunes A.P.M., Whiteley C.G. y Duncan J.R. (2004). Precipitation of mixed metal residues from wastewater utilising biogenic sulphide. *Minerals Engineering*. 17(7-8), pp. 925-932.
- Bandhyopadhyay, K., Das, D., Maiti, B. (1999). Solid matrix characterization of immobilized *Pseudomonas putida* MTCC 1194 used for phenol degradation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51: 891-895.
- Betancourth M., Botero J. E., Rivera S. P. (2004) Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica* 35: 34-39.
- Beyenal H., y Lewandowski Z. (2004) Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. *Water Research* 38: 2726-2736.
- Bina B., Kermani M., Movahedian H. y Khazaei Z. (2006). Biosorption and recovery of copper and zinc from aqueous solutions by nonliving biomass of marine brown algae of *Sargassum* sp. *Pak. J. Biol. Sci.*, 9(8), pp. 1525-1530.
- Blanco, A., Sanz, B., Llama, M.J., Serra, J.L. (1999), Biosorption of heavy metals to immobilized *Phormidium laminosum* biomass. *Journal of Biotechnology*. 69: 227–240.
- Bolton H. y Gorby YA. (1995). An Overview of the bioremediation of metal contaminated industrial effluents using waste sludges. *Water Sci. Technol.* (34) pp. 9-15.



- Buisman, C.N.J., Ijspeert, P., Hof, A., Janssen, A.J.H., ten Hagen, R. y Lettinga, G. (1991). Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur with oxygen. *Biotech. Bioeng.* 38, 813-820.
- Cañizares-Villanueva R.O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42(3), 131-143.
- Celis-García M.L.B. (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis de Doctorado en Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. *Universidad Autónoma Metropolitana*. Iztapalapa. México, D.F. 123p.
- Certucha-Barragán M. T, Duarte-Rodríguez G. R, Acedo-Félix E, Almendariz-Tapia F. J, Monge-Amaya, Valenzuela Garcia J. L, Leal-Cruz A. (2010) Estudio de la Biosorción de Cobre Utilizando Lodo Anaerobio Acidogénico. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2: 26-36.
- Chitiva, L., Dussán, J. (2003). Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas spp.* En biorremediación de fenol. *Revista colombiana de biotecnología.* 2: 5-10.
- Christensen B., Laake M. y Lien T. (1996). Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria: Results from a bench scale experiment. *Water Res.* (30), pp. 1617-1624.
- Cohen, Y. (2001). Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology.* 77: 257-274.
- Couto, S., Toca, J. (2006) Industrial and biotechnological application of laccases: A review. *Biotechnology advances,* 24: 500-513.
- Diaz, M.P., Boyd, K., Grigson, S., Burgués, J. (2002), Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology and Bioengineering.* 79: 145-153.

- Domínguez A., Couto S., Sanromán Ma. (2005). Dye decolorization by *Trametes hirsute* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:405–409.
- Doronina, N., Nazarov, N., Ezhov, V., Trotsenko, Y. (2006). Biodegradation of Methyl and Ethyl Acetates by Immobilized *Pseudomonas esterophilus* Cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42(1):45-4.
- Elferink Oude, S.J.W.H., Visser A., Hulshoff Pol L.W., y Stams A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic reactors. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 119-136.
- Ertugay N. y Bayhan Y.K. (2008). Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by biomass of *Agaricus bisporus*. *Journal of Hazardous Materials*. 154(1-3), pp. 432-439.
- Espinosa-Chávez B. (2007). Evaluación del desarrollo de la actividad sulfatorreductora en un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños. Tesis de maestría en ciencias aplicadas. División de ciencias ambientales. *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.* San Luis Potosí, S.L.P. 101p.
- Fernández-Polanco M. y García Encina R.A. (2006). Capítulo "Application of biological treatment systems for sulfate-rich wastewaters". En *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters*. Editado por F.J. Cervantes, S.G. Pavlostathis y A.C. van Haandel. IWA Publishing, London, Uk. ISBN: 1843391147.
- García, M., Romero, L., Sales, D. (1997). Inmovilización de biomasa anaerobia termofílica en soportes porosos. *Ingeniería del agua*. 4 (3): 11-16.
- Gardin, H., Lebeault, J., Pauss, A. (2001). Degradation of 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) by co- immobilization of anaerobic and aerobic microbial communities in an up flow reactor under air-limited conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*. 56: 524-530.



- Garzón-Jiménez C. y Barragán-Huerta B.E. (2008). Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, Vol. 2, No. 1. pp. 23-34.
- Gibson, G. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 769-797.
- González-Blanco Gehovana. (2007). Conversión de sulfato a azufre elemental en un reactor de lecho fluidificado inverso bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto. Tesis de Maestría en Biotecnología. División de ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapala. 108p.
- Gourari S, Achkari-Begdouri A. (1997). Use of baked clay media as biomass supports for anaerobic filters. *Appl Clay. Sci*;12:365–75.
- Gupta R., Perna Ahuja, Seema Khan, R. K. Saxena and Mohapatra H. (2000) Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *CURRENT SCIENCE*, 78, 8, 967-973.
- Hanaki, K., Chatsanguthai, S., Matsuo, T. (1994). Characterization of accumulated biomass in anaerobic filter treating various types of substrates. *Bioresour. Technol.* 47, 275-282.
- Hao, O.J., Chen, J.M., Huang, L. y Buglass, R.L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26, 155-187.
- Herlihy A. T., Mills A. L., Hornberger G. M. and Bruckner A. E. (1987) The importance of sediment sulphate reduction to the sulphate budget of an impoundment receiving acid mine drainage. *Water Resources Research.* 23 (2): 287-292.
- Jenkins S.R., Morgan J.M. y Sawyer C.L (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *J. Water. Pollut. Control Fed.* 55(5), pp. 448-453.

- Jin, K., Peirce, J. (1998) Biodegradation kinetics of chlorophenols in immobilized-cell reactors using a white-rot fungus on wood chips. *Water Environment Research*. 70(2): 205-213.
- Jong T., Parry D.L. (2003) Removal of sulphate and heavy metal by sulphate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37: 3379-3389.
- Johnson D. B., Ghauri M. A. and McGinness S. (1993) Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiological Reviews*. 11: 63-70.
- Kabaivanova, L., Dimitrov, P., Boyadzhieva, I., Engibarov, S., Dobрева, E., Emanuilova, E. (2008). Nitrile degradation by free and immobilized cells of the thermophile *Bacillus sp.* UG-5B, isolated from polluted industrial waters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Riekkola-Vanhanen M., Franzmann P.D. y Puhakka J.A. (2006). The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Hydrometallurgy*. 83(1-4), pp. 204-213.
- Kaksonen A.H. y Puhakka J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. Review. *Eng. Life Sci.* 7(6), pp. 541-564.
- Karegoudar, T., Manohar, S. (1998) Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas sp.* Strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. *Applied Microbiology Biotechnology* 49: 785-792.
- Karel, S., Libicki, S., Robertson, C. (1985). The immobilization of whole cells engineering principles. *Chemical Engineering Science*. 40, 1321–1354.
- Karri S., Sierra-Alvarez R. & Field J.A. (2006). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. Short Communication. *Chemosphere*. 62(1), pp. 121-127.



- Kocadagistan B., Kocadagistan E., Topcu N., Demirciođlu N. (2005). Wastewater treatment with combined upflow anaerobic fixed-bed and suspended aerobic reactor equipped with a membrane unit. *Process Biochemistry*. 40: 177–182.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R., Koutinas, A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 21: 377-397.
- Krebs W., Brombacher C., Bosshard P.P., Bachofen R., Brandl H. (1997) Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 605-617.
- Lazarova, V., Manem, J. (1995), Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*. 29(10): 2227-2245.
- Ledin M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soil systems. *Earth-Sci Rev*. 51:1-31.
- Lens, P., y Kuenen, J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Wat. Sci. Technol*. 44 (8): 57-66.
- Lens P.N.L., Omil F., Lema J.M. & Hulshoff-Pol L.W. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. En: *Environmental technologies to treat sulfur pollution-principles and engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed). *International Water Association*. Londres. pp. 153-174.
- Lens P. N. L., Visser A., Jansen A. J. H., Hulshoff Pol L. W. and Lettinga G. (1998) Biotechnological treatment of organic sulphate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 28: 41-88.
- Lens, P., y Hulshoff Pol, L. (2000). Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Published by IWA Publishing, Alliance House, London*.

- Leyva Ramos R., Medellín C. N. A., Guerrero C. R.M., Berber M. M.S., Aragón P. A. y Jacobo A. A. (2005) Intercambio iónico de plata (I) en solución acuosa sobre clinoptilolita. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21 (4) 193-200.
- Li, P., Li, H., Stagnitti, F., Wang, X., Zhang, H., Gong, Z., Liu, W., Xiong, X., Li, L., Austin, C., Barry, D. (2005) Biodegradation of Pyrene and Phenanthrene in Soil Using Immobilized Fungi *Fusarium sp.* *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 75: 443-450.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (1998). Brock Biología de los microorganismos. Octava edición. *Prentice Hall.* pp 1064.
- Malik A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International.* 30: 261-278.
- Mileva A., Sapundzhiev, Ts., Beschkov, V. (2008). Modeling 1,2-dichloroethane biodegradation by *Klebsiella oxytoca* 8391 immobilized on granulated activated carbon. *Bioprocess Biosystem Engineering.* 31: 75-85.
- Moosa S. (2000) A kinetic study on anaerobic sulphate reduction. *Ph.D. Thesis.* University of Cape Town, South Africa.
- Moosa S., Nemat M., Harrison S. T. L. (2002) A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, part I: Effects of sulphate concentration. *Chemical Engineering Science.* 57: 2773-2780.
- Monge Amaya Onofre, Certucha Barrgán María Teresa y Almendáriz Tapia Francisco Javier. (2013). Capítulo 2 "Microbial Biomass in Batch and Continous System". En *Biomass Now- Sustainable growth and use.* Editado por Miodrag Darko Matovic. *INTECH.* 449-478. ISBN 978-953-51-1105-4.
- Mudryk Z. J., Podgórska B., Ameryk A., Bolałek J. (2000). The occurrence and activity of sulphatereducing bacteria in the bottom sediments of the Gulf of Gdańsk. *Oceanología* 42: 105–117.



- Nagpal S., Chuichulcherm S., Peeva L., Livingston A. (2000) Microbial Sulphate Reduction in a Liquid-Solid Fluidised Bed Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 70: 370-380.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología*. 67:61-72.
- Navarro, J., Durand, G. (1977). Modification of yeast metabolism by immobilization on to porous glass. *Journal of Applied Microbiology*. 4: 243–254.
- Nina Chambe M. (2008). Evaluación de los métodos químicos y biogénicos para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala laboratorio. Tesis para optar el grado académico de Máster en Ciencias Ambientales. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Lima, Perú. 105 p.
- Okabe S., y Characklis W. G. (1992) Effects of temperature and phosphorous concentration on Microbial Sulfate Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology and Bioengineering* 39:1031-1042.
- Onofre Monge, Leobardo Valenzuela y Evelia Acedo (2010). Biosorción de Cobre con Bacterias Aerobias Inmovilizadas en Zeolita. Aislamiento, Caracterización, Selección de Microorganismos y Cinética de Biosorción. *Lambert Academic Publishing*.
- O’reilly, K., Crawford, R. (1989). Kinetics of p-Cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas sp.* *Applied and Environmental Microbiology*. 55(4): 866-870.
- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura ONU/WWAP (Naciones Unidas/Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos) “Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo: Agua para todos, agua para la vida”. UNESCO y Berghahn Books. París, Nueva York y Oxford, (2003).
- Polprasert, C., 1989. Organic Waste Recycling. Wiley, New York. In Cohen, Y. (2001). *Bioresource Technology*. 77: 257-274

- Postgate J. R. (1954) Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriological Reviews* 29: 425-441.
- Postgate J. R. (1984) The sulphate reducing bacteria, 2<sup>nd</sup> Edition. *University press, Cambridge, UK*.
- Reyes E. D., Cerino C. F. y Suárez H. M. A. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*. IX, 31: 59-64.
- River Luis, Aspe Estrella, Roeckel Marlene, Mart M. Cristina (1998). Evaluation of Clean Technology Processes in the Marine Products Processing Industry. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 217-226.
- Servin R. L. (2006) Metalurgia de minerales no metálicos, zeolitas. En: Monge Amaya Onofre, Certucha Barrgán María Teresa y Almendáriz Tapia Francisco Javier. (2013). Capítulo 2 "Microbial Biomass in Batch and Continuous System". En Biomass Now- Sustainable growth and use. *INTECH*. 449-478. ISBN 978-953-51-1105-4.
- Sampaio R.M.M., Timmers R.A., Xu Y., Keesman K.J. y Lens P.N.L. (2009). Selective precipitation of Cu from Zn in a pS controlled continuously stirred tank reactor. *Journal of Hazardous Materials*. 165(1-3), pp. 256-265.
- Suzuki, I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45: 97-105.
- Smet, E., Lens, P. y van Langenhove, H. (1998). Treatment of waste gases contaminated with odorous sulfur compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 28 (1), 89-117.
- Steudel, R. (1998). Sulfur chemistry: Speciation, natural occurrence, redox reactions and colloidal aspects. En: *Sulfur Cycle: Environmental Science and Technology*. Memorias del curso de verano. Abril 19-24. Wageningen Agricultural University. Wageningen, Holanda.



- Tomko J., Bačkor M. y Štofko M. (2006). Biosorption of heavy metals by dry fungi biomass. *Acta Metallurgica Slovaca*. 12: 447-451.
- Tsukamoto T. K., Killion H. A., Miller G. C. (2004) Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research*. 38: 1405-1418.
- Tuppurainen K.O., Väisänen A.O. y Rintala J.A. (2002). Zinc removal in anaerobic sulphate-reducing liquid substrate process. *Minerals Engineering*. 15(11), pp. 847-852.
- Urrutia, I., Serra, J., Llama, M. (1995), Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilizes in polymeric foams. *Enzyme Microbiology. Technology*. 17: 200–205.
- Veglio F., Beolchini F. (1997) Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*. 44: 301- 316.
- Van den Ende, F., Meier, J., y van Gemerden, H. (1997). Syntrophic growth of sulfate reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol*. 23: 65-80.
- Viera Marisa y Donati Edgardo R. (2004). Microbial processes to metal recovery from waste products. *Current Topics in Biotechnology*. 1: 117-117.
- Vikrama Krishnan Baskaran. (2005). Kinetics of anaerobic sulphate reduction in immobilized cell bioreactors. M.C. Thesis. University of Saskatchewan, Saskatoon, SK. Canada.
- Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph.D. Thesis. *Wageningen Agricultural University*, Wageningen, Holanda.
- Vullo D.L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva* 2. Disponible en [quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

- Yamaguchi, T., Ishida, M., Suzuki, T. (1999). An immobilized cell system in polyurethane foam for the lipophilic micro-alga *Prototheca zopfii*. *Process Biochemical*. 34: 167–171.
- Warounsak L. y Ajit P.A. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*. 25, 452-463.
- White C., Gadd G.M. (1996). A comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metals as sulphides. *Journal of Industrial Microbiology*. 17:116-123.
- Widdel F. (1988) Microbiology and ecology of sulphate- and sulphur- reducing bacteria. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder, A.J.B. (Ed.). *Wiley & Sons Inc*. New York. pp. 469-585.
- Widdel F., y Bak F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: *The Prokaryote, IV* (Eds: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H.), *Springer-Verlag*, Berlin, pp. 3352-3378.