



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DEGRADACIÓN DEL 4-CARBOXIBENZALDEHIDO POR
SULFATO-REDUCCIÓN Y METANOGÉNESIS SIMULTÁNEA**



**COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA**

TESIS

Para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
Presenta

ING. BIOQ. RAMÓN JACOBO RAMÍREZ CARRILLO

Tutor: DR. OSCAR MONROY HERMOSILLO
Asesor: DR. SERGIO REVAH MOISEEV

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE DE 1998

INDICE GENERAL

	página
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE TABLAS	
RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Producción de ácido tereftálico	1
1.2 Estudios de biodegradación	2
1.3 Propiedades del 4-carboxibenzaldehido	5
1.4 Digestión anaerobia y sulfato-reducción	7
1.5 Reactor anaerobio UASB	4
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVO GENERAL	16
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Modelo experimental	17
4.2 Inóculo	17
4.3 Medio de alimentación	18
4.4 Reactor	19
4.5 Métodos analíticos	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Degradación de la demanda química de oxígeno total	23
5.2 Eliminación del sulfato	24
5.3 Producción de metano	26
5.4 Eliminación del 4-carboxibenzaldehido y del ácido tereftálico	29
5.5 Reacciones que participan en la metanización y sulfato-reducción de la lactosa y 4-carboxibenzaldehido	33
6. CONCLUSIONES	35
7. BIBLIOGRAFÍA	36

Indice de figuras.

Figura 1.1: (pag. 1) Reacción de síntesis del ácido tereftálico (Bemis *et al.*, 1982).

Figura 1.2: (pag. 3) Vía de degradación propuesta del ácido tereftálico (Karegoudar y Pujar, 1985).

Figura 1.3: (pag. 4) Vía de degradación por tratamiento anaerobio del AT (Lixian, *et al.* 1991).

Figura 1.4: (pag. 5) Inhibición relativa de la metanogénesis hidrogenotrofa por ATF, ApT y 4-CBA (Fajardo *et al.*, 1996).

Figura 1.5: (pag. 8) Competencia entre bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras (Rinzema y Lettinga, 1988).

Figura 1.6: (pag. 11) Velocidad específica de crecimiento de BSR y BM.

Figura 1.7: (pag. 12) Fracción de DQO consumido por las BSR en función de la relación DQO/SO₄ (Rinzema y Lettinga, 1988).

Figura 1.8: (pag. 14) Esquema de un reactor UASB. (A) cajas de distribución, (B) campanas de recolección de biogás, (C) distribuidores y (D) lecho de lodos.

Figura 1.9: (pag. 15) Organización bacteriana en un gránulo (Guiot *et al.*, 1991).

Figura 4.1: (pag. 19) Equipo de experimentación.

Figura 4.2: (pag. 20) Cuantificador digital de flujo.

Figura 5.2: (pag. 25) Consumo de sulfato en el reactor UASB.

Figura 5.3: (pag. 27) Balance de metano. Se muestra la curva obtenida por medición del gas χ , contra la calculada de acuerdo a la ecuación 5.3 χ .

Figura 5.4: (pag. 28) DQO consumida. DQO calculada a partir de la diferencia de la ecuación 5.1 y \square DQO calculada a partir de las ecuaciones 5.2.1 y 5.3.2

Figura 5.5: (pag. 30) Eliminación de 4-CBA y su transformación en ácido tereftálico.

Indice de tablas.

Tabla 1.1: (pag.2) Características del agua residual de la producción del ácido tereftálico (Fajardo *et al.*, 1996).

Tabla 1.2: (pag. 5) Características físicas del 4-CBA.

Tabla 1.3: (pag. 6) Benzaldehidos degradados por digestión anaerobia.

Tabla 1.4: (pag. 9) Sulfato-reducción y metanogénesis en la biodegradación de compuestos recalcitrantes (Evans y Fuchs, 1988; Zellner *et al.*, 1990; Todini y Hulshoff Pol, 1992).

Tabla 1.5: (pag.10) Metabolismo anaerobio del ácido benzoico (AB) (Fuchs *et al.*, 1994).

Tabla 1.6: (pag.11) Constantes cinéticas de algunas bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras (Visser, 1995).

Tabla 1.7: (pag. 12) Efecto de la relación $DQO/SO_4^{=}$ sobre la competencia entre bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras.

Tabla 4.1: (pag.17) Etapas del experimento.

Tabla 4.2: (pag. 18) Contenido de sólidos suspendidos del inóculo.

Tabla 4.3: (pag. 18) Soluciones del medio basal de Balch *et al.* (1979).

Tabla 4.4: (pag. 19) Medio basal sin fuente de carbono.

Tabla 5.1: (pag. 31) Caracterización de la operación del reactor UASB.

Tabla 5.2: (pag. 32) Relaciones entre sulfato-reducción (SR) y metanogénesis (M).

Tabla 5.3: (pag.34) Posibles rutas de oxidación del 4-CBA por sulfato-reducción(SR).

RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue arrancar y estabilizar un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB), adaptando el reactor a la degradación del 4-carboxibenzaldehído (4-CBA) con sulfato-reducción y metanogénesis como vías de degradación y estudiar el proceso por medio de los balances de materia.

El 4-CBA es el compuesto más inhibitorio para la metanogénesis de las aguas residuales de la producción de ácido tereftálico (AT). Se estudió la degradación del 4-CBA induciendo el crecimiento y actividad de las bacterias sulfato-reductoras en un reactor metanogénico, usando un reactor UASB de 1.5 litros de volumen de operación, alimentado con un medio compuesto por 90 mg/L de sulfato, 100 mg/L de 4-CBA, 1000 mg/L de lactosa y un suplemento de sales minerales, a pH 7, a una temperatura de 36°C y con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de un día. Los resultados mostraron que el grupo aldehído del 4-CBA se oxidó, con una eficiencia del 100%, a ácido tereftálico y este a su vez fue degradado con una eficiencia de 67%. Únicamente se encontró al AT como intermediario. Se hizo una prueba testigo para saber si la oxidación del grupo aldehído del 4-CBA se podía llevar a cabo químicamente y se encontró que en condiciones anóxicas no se lleva a cabo ninguna transformación química. La eficiencia de remoción de la DQO fue del 83%. Las bacterias sulfato-reductoras eliminaron el 3.26 % de la DQO total y se encontró que esta actividad es el triple de la que se necesita para oxidar el 4-CBA a AT, teniendo 22.96 mg/L de sulfato excedente que sirvieron para oxidar la lactosa o alguno de los productos de la acidogénesis. Las eficiencias de eliminación fueron para el 4-CBA del 100%, para el AT del 67%, para la lactosa del 86% y para los sulfatos fue del 36%. Además, la fracción de la DQO oxidada por sulfato-reducción que se utilizó para oxidar el grupo aldehído del 4-CBA fue del 28% y se encontró que no todo el AT se degradó por sulfato-reducción. Se concluye que el acoplamiento de estos dos tipos de bacterias permiten la transformación del 4-carboxibenzaldehído y la degradación parcial del ácido tereftálico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Producción de ácido tereftálico

El ácido tereftálico (AT) es el principal monómero que sirve para la producción de plásticos de polietilentereftalato (PET), películas de poliéster para fotografía y empaques (Bemis *et al.*, 1982). La producción mundial en 1993 fue de 9.3 millones de toneladas y de 0.5 millones de toneladas por año en México en sólo dos plantas (Macarie *et al.*, 1995). México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en la carga orgánica de los efluentes de este tipo de industria, únicamente superado en orden de importancia por India, Taiwan y Corea del Sur (Macarie, 1996).

El ácido tereftálico y el dimetil tereftalato (otro monómero importante para la síntesis de poliéster) no fueron importantes en la industria química hasta después de la segunda guerra mundial. El ácido era producido por la oxidación de *p*-xileno en ácido nítrico diluido, pero no fue hasta 1965 cuando la compañía *Amoco Chemical Corporation* desarrolló un proceso económicamente más eficiente, que consiste en una oxidación por aire del *p*-xileno (dimetil-1,4 benceno) en una solución de ácido acético (Bemis *et al.*, 1982), como se muestra en la figura 1.1.

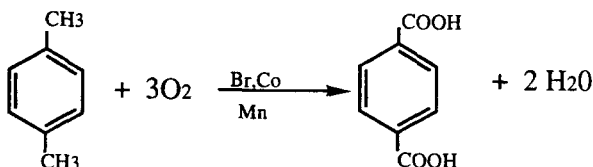


Figura 1.1 Reacción de síntesis del ácido tereftálico (Bemis *et al.*, 1982).

El proceso basado en la tecnología Amoco utiliza el ácido acético, aire, *p*-xileno y catalizadores que son alimentados en continuo al reactor, operando a 175 y 230°C y entre 1500 y 3000 kPa (220-435 psi) con tiempos de residencia que pueden variar entre 0.5 y 3 h.

Aunque más del 95 % del *p*-xileno es convertido a AT, el efluente del proceso contiene grandes cantidades de productos parciales de la oxidación como son: el 4-carboxibenzaldehído (4-CBA), el ácido *p*-toluico (ApT) y el ácido benzoico (AB).

En la tabla 1.1 se muestran las características del agua residual de la producción del AT (Fajardo *et al.*, 1996). Esta agua residual presenta un valor elevado de DQO, sin embargo los valores que presenta la relación DBO₅/DQO de 1-0.578 indican que el agua residual está compuesta en su mayoría por elementos bioquímicamente oxidables y por lo tanto el agua residual es degradable biológicamente. La DQO está compuesta principalmente de AT pero las fracciones restantes pueden intervenir en la inhibición del proceso.

Otra característica es la alta cantidad de sólidos suspendidos totales (SST) que presenta. Para que a un agua residual se le pueda aplicar un proceso biológico se deben tener valores de SST del orden de 1 Kg/m³ (Viñas, 1994). Por otro lado, el bajo valor de pH que presenta este tipo de agua residual requiere de un pretratamiento, como sería la recirculación del agua residual de la planta de tratamiento al influente del reactor o la adición de alguna base para neutralizar el pH.

Tabla 1.1 Características del agua residual de la producción del ácido tereftálico (Fajardo *et al.*, 1996).

	pH	DQO(g/L)	DBO ₅ (g/L)	DBO ₅ /DQO	SST(g/L)
intervalo	4.5	4.4-9.5	5.5	1-0.578	2.22
pulso máximo		13.0	7.5	0.577	
	PM	Intervalo DQO(g/L)	pulso máximo DQO	%DQO	
AT	166	1.1-2.2	5.0		31-39
ApT	136	0.3-0.68	0.75		10-19
AB	122.12	0.05-0.45	1.3		1-13
4CBA	150	0.003-0.02	0.18		0-3
AA	60	0.5-2.0			25-33

AT= ácido tereftálico, ApT= ácido *para*-toluico, AB= ácido benzoico, 4-CBA= 4-carboxibenzaldehído, AA= ácido acético, pulso máximo = descarga puntual máxima.

1.2 Estudios de Biodegradación

A los compuestos que no son degradables se les llama recalcitrantes, esto significa que, ya sean de origen natural o artificial, resisten la mineralización en sistemas convencionales de tratamiento biológico de desechos.

Los de origen artificial, conocidos como xenobióticos, son aquellos compuestos hechos por el hombre a los que los microorganismos no han estado expuestos a lo largo de la evolución (Alexander, 1994; Leisinger, 1986; Holliger *et al.*, 1988), tal es el caso del 4-CBA y del ácido tereftálico.

En la ruta de degradación del AT (Karegoudar y Pujar, 1985) el primer paso es la formación del tereftalato dihidrodiol, que se transforma posteriormente en el ácido protocatecuatico (3,4-dihidroxi benzoato) (figura 1.2). A partir de ahí se propone una ruptura del anillo aromático en posición *orto*. Existen estudios sobre el metabolismo del protocatecuatico y *m*-hidroxibenzaldehído en condiciones anaerobias (Berry *et al.*, 1987).

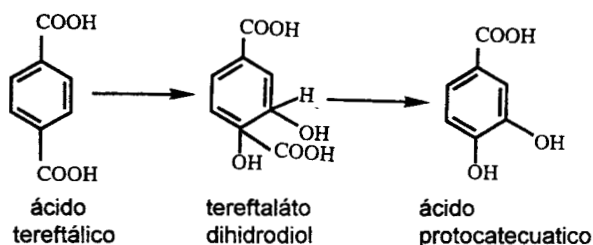


Figura 1.2 Vía de degradación propuesta del ácido tereftálico (Karegoudar y Pujar, 1985).

Estudios con marcadores radioactivos han permitido que se conozca la vía de degradación anaerobia del ácido tereftálico (Evans, 1977; Afring y Taylor, 1981; Berry *et al.*, 1987; Lixian *et al.*, 1991) encontrándose como subproductos de degradación, una mezcla de compuestos como son el ácido benzoico, los alquil-bencenos, los hidrocarburos saturados C₈-C₁₃, las oleofinas C₈-C₁₂, los aldehídos, los alcoholes, los ácidos orgánicos y los ésteres (figura 1.3).

En estudios recientes (Fajardo *et al.*, 1996) se han encontrado que las concentraciones de 4-CBA que se encuentran normalmente en las aguas residuales de este tipo de industrias son inhibitorias de la actividad hidrogenotrofa en la metanización. El 4-CBA resulta ser el más tóxico de todos los compuestos presentes pues las concentraciones necesarias para causar un 50% de inhibición en la metanogénesis hidrogenotrofa son de 5.4 mM de 4-carboxibenzaldehído (0.8 g/L), 34 mM de ácido *p*-toluico (5.6 g/L) y 100 mM de ácido tereftálico (16 g/L). Se puede observar en la tabla 1.1. que existe poca diferencia entre la concentración del 4-CBA en el efluente del agua residual y la concentración que provoca una inhibición del 50%.

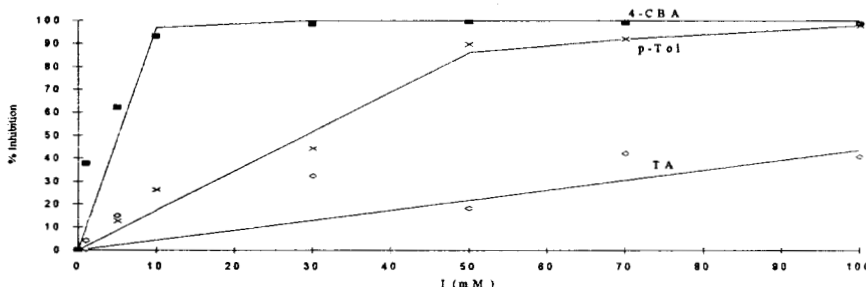


Figura 1.4 Inhibición relativa de la metanogénesis hidrogenotrofa por ATF, ApT y 4-CBA (Fajardo *et al.*, 1996).

1.3 Propiedades del 4-carboxibenzaldehido

El 4-CBA es un compuesto aromático, con un constituyente carbonilo y uno carboxilo en posición *para*. Las características físicas se muestran en la tabla 1.2 .

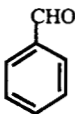
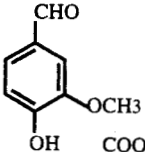
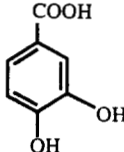
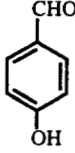
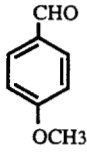
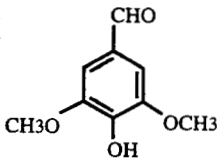
Tabla 1.2 Características físicas del 4-CBA.

Nombre común	ácido tereftaldehido	
Nombre IUPAC	ácido formil 4-benzoico	
Fórmula condensada	C ₈ H ₆ O ₃	
Fórmula desarrollada		
Peso molecular (g/mol)	150.14	
Temperatura de fusión (°C)	256	
Temperatura de ebullición(°C)	sublima	
DQO teórico (mg O ₂ /g compuesto)	1705.07	
Solubilidad g/100g de solvente		
agua	en agua caliente y en forma de sal.	
éter	muy soluble	
cloroformo	soluble	
Toxicidad	5.4 mM (50% inhibición)	

La inestabilidad del doble enlace del grupo carbonilo hace pensar que la oxidación de este grupo a su correspondiente ácido sea relativamente fácil, sin embargo, existen estudios sobre la degradación biológica de benzaldehidos (Tabla 1.3) donde se encuentran involucrados alguno de los

siguientes procesos: metanogénesis, acetogénesis, o sulfato-reducción (Zellner *et al.*, 1989; Zellner *et al.*, 1990; Todini y Hulshoff Pol L., 1992; Gößner *et al.*, 1994). En tales condiciones, la oxidación química del grupo funcional aldehído no se lleva a cabo.

Tabla 1.3 Benzaldehídos degradados por digestión anaerobia.

Nombre común	Nombre IUPAC	Fórmula desarrollada	Referencia
Benzaldehído			1,3
Vainillina	4-hidroxi-3-metoxi benzaldehído		1,2,4
Protocatecuático	3,4-dihidroxi benzoato		1,2,4
4-formilfenol	<i>p</i> -hidroxi benzaldehído		1,2
<i>p</i> -anisaldehído	4-metoxi benzaldehído		2
Siringaldehído	4-hidroxi-3,5-dimetoxi benzaldehído		2

1. Sleat y Robinson, 1984; 2. Zellner *et al.*, 1990; 3. Todini y Hulshoff Pol L., 1992; 4. Gößner *et al.*, 1994.

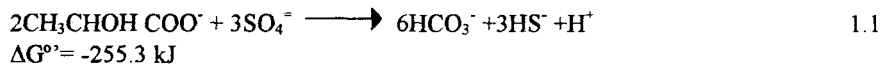
1.4 Digestión anaerobia y sulfato-reducción

1.4.1 Microbiología y bioquímica

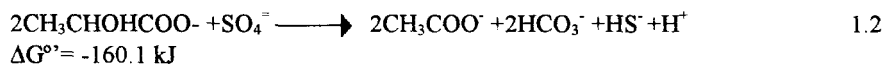
Las bacterias sulfato reductoras (BSR) al igual que las bacterias metanogénicas (BM) son anaerobias estrictas. El potencial redox de las BSR es de -100 mV y de -330 mV el de las BM (Zehnder y Stumm, 1988; Gibson, 1990; Pfennig *et al.*, 1992, Lettinga y Hulshoff Pol, 1995). Las BSR son responsables de la reducción del sulfato, sulfito, tiosulfato u otros compuestos azufrados utilizándolos como aceptores de electrones durante la oxidación de compuestos orgánicos (Visser^a, 1995). Los ácidos grasos desde valérico hasta ácido esteárico, ácidos aromáticos y fenoles, hidrógeno, lactato, alcoholes, glicerol, azúcares y amino ácidos son la gama de donadores de electrones útiles a las BSR (Widdel, 1988).

Por otro lado, los compuestos que son fuente de energía y carbono para el crecimiento de las BM son simples y de número limitado en comparación con la amplia variedad de compuestos que pueden utilizar las BSR. Utilizan como aceptor de electrones al CO₂ y como donador de electrones al H₂, al formiato, al acetato y al metanol (Ramírez, 1992). Sus requerimientos alimenticios van desde metilaminas, metildisulfuros, ácidos grasos, vitaminas, iones de amonio, elementos traza como cobalto, fierro, molibdeno, níquel, manganeso y potasio. La mayoría crece en los intervalos de pH entre 6 y 8 y a una temperatura óptima de 35°C (Oremland, 1988).

Las BSR se clasifican en dos grupos. El primer grupo oxida completamente los compuestos orgánicos hasta CO₂, a este grupo pertenecen los géneros *Desulfobulbus*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*. La reacción característica se muestra en la reacción 1.1



El segundo grupo únicamente transforma los compuestos orgánicos hasta acetato, los géneros que se encuentran dentro de este grupo son: *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*. La ecuación 1.2 muestra su reacción característica.



Los requerimientos nutricionales para las BSR son: un aceptor de electrones inorgánico (sulfato, sulfito y tiosulfato), pudiendo utilizar también nitrato,

metales férricos, incluso se ha reportado que el oxígeno puede servir como aceptor de electrones, sin embargo esta respiración no está asociada al crecimiento (Hamilton, 1998) y amonio como fuente de nitrógeno. Sin embargo, el molibdeno es tóxico para estas bacterias (Lovley y Klung, 1983; Widdel, 1988; Yadav y Archer, 1989). Durante el tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfatos, como son los casos de la industria papelera, la industria de fermentación y de aceites comestibles (Rinzema y Lettinga, 1988), es posible la competencia por el sustrato entre las BM y las BSR (figura 1.5). Se reconocen tres niveles, competencia por el acetato e H_2 entre las BSR y las BM, competencia entre las BSR y bacterias acetogénicas por sustratos como propionato y butirato y la competencia entre BSR y bacterias fermentativas por sustratos como los azúcares y los aminoácidos (Harada *et al.*, 1994; Visser^b, 1995). Es importante tomar en cuenta, como se puede apreciar en la figura 1.5, que las bacterias sulfato-reductoras pueden contribuir de manera importante en la producción de acetato, por lo que las bacterias sulfato-reductoras forman parte del consorcio microbiano que lleva a cabo la acidogénesis y la acetogénesis (Winfrey y Ward, 1983).

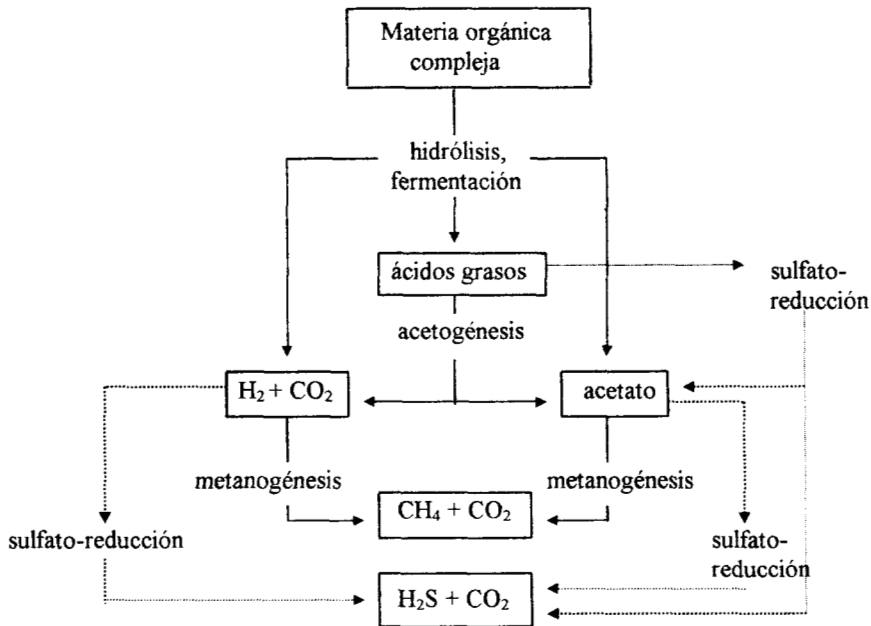


Figura 1.5 Competencia entre bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras (Rinzema y Lettinga, 1988).

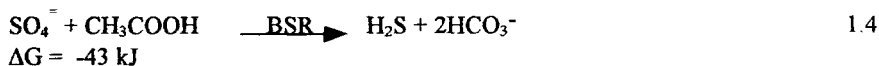
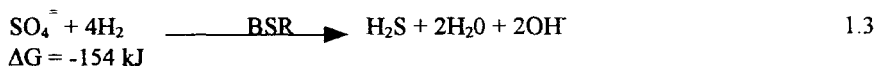
En la tabla 1.4 se presentan estudios en donde aparecen procesos de metanogénesis y sulfato-reducción en la biodegradación de compuestos recalcitrantes. Es importante resaltar que en los procesos de oxidación de compuestos aromáticos que presentan un grupo funcional aldehído se encuentran involucradas especialmente bacterias sulfato-reductoras y además no se ha encontrado reportes sobre la degradación del 4-CBA.

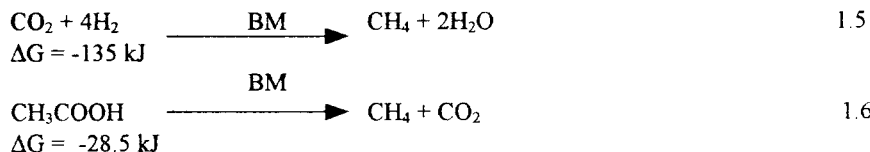
Tabla 1.4 Sulfato-reducción y metanogénesis en la biodegradación de compuestos recalcitrantes (Evans y Fuchs, 1988; Zellner *et al.*, 1990; Todini y Hulshoff Pol, 1992).

Proceso	Microorganismo	Sustrato
Sulfato-reducción	<i>Desulfovibrio sp.</i>	Benzoato
Sulfato-reducción	<i>Desulfococcus</i>	Hidroxibenzoatos
Sulfato-reducción	<i>Desulfonema</i>	Fenilacetato
Sulfato-reducción	<i>Desulfosarcina</i>	Fenol
Metanogénesis	Consorcio microbiano	Fenol, Benzoato, Catecol, Tirosina, Fenilalanina, Syringato, Benceno, Hidroxiquinona, Tolueno, Nitrofenoles.
Sulfato-reducción	<i>Desulfovibrio</i>	Vainillina, <i>p</i> -anisaldehído, 2-metoxibenzaldehído, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído, 3,4,5-trimetoxibenzaldehído, siringaldehído, protocateualdehído
Metanogénesis	Consorcio microbiano	Benzaldehído

1.4.2 Termodinámica.

Las reacciones que llevan a cabo las BSR son termodinámicamente más favorables que las correspondientes reacciones realizadas por las BM (Karhadkar, 1987; McCartney y Oleszkiewicz, 1991). A continuación se muestran las reacciones que las BSR y las BM llevan a cabo con el hidrógeno y el acetato (Karhadkar *et al.*, 1987):



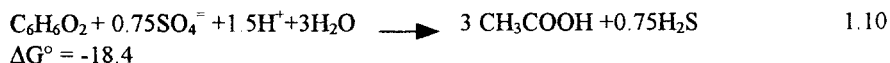


Esto da información acerca de la competencia por los sustratos. Dado que los procesos biológicos no están necesariamente en equilibrio termodinámico, algunos compuestos aromáticos requieren para su degradación, de la interacción de dos o más grupos microbianos que acoplen entre ellos sus vías de respiración (Healy, 1979; Schink *et al.*, 1986; Evans y Fuchs, 1988; Battersby *et al.*, 1989). En la tabla 1.5 se muestra la manera en que pueden contribuir estas asociaciones para hacer posible la oxidación de un compuesto aromático como es el ácido benzoico.

Tabla 1.5 Metabolismo anaerobio del ácido benzoico (AB) (Fuchs *et al.*, 1994).

Oxidación		ΔG°	
$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$	\longrightarrow	$3\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$	+47 kJ 1.7
Acoplado a la reducción de:		$\Delta G^\circ\text{total}$.	
Sulfato			
$3\text{H}_2 + 0.75\text{SO}_4^{2-} + 1.5\text{H}^+$	\longrightarrow	$0.75\text{H}_2\text{S} + 3\text{H}_2\text{O}$	-65.4 kJ 1.8
CO_2			
$3\text{H}_2 + 0.75\text{CO}_2$	\longrightarrow	$0.75\text{CH}_4 + 1.5\text{H}_2\text{O}$	-31.8 kJ 1.9

Para poder llevar a cabo la oxidación del ácido benzoico (AB) a acetato es necesario que una reacción como la sulfato-reducción elimine el H_2 del medio para desplazar el equilibrio a la derecha de la reacción (hacer $\Delta G < 0$). Así, sumando las ecuaciones 1.7 y 1.8 resulta en la reacción 1.10.



Haciendo un análisis similar, se puede ver que, la reacción metanogénica no da suficiente energía para llevar a cabo la oxidación del AB, teniendo como resultado una $\Delta G^\circ = 15.2$

1.4.3 Cinética

En la competencia por un solo sustrato, los parámetros cinéticos, como la k_s y la μ_{max} juegan un papel importante. En la tabla 1.6 se muestran las

constantes cinéticas para la conversión de acetato e hidrógeno para los dos tipos de bacterias (Visser^b, 1995). Se puede observar que las BSR tienen ventajas cinéticas sobre las BM, ya que presentan una alta velocidad máxima específica de crecimiento (μ_m) y un valor bajo de la k_s .

Tabla 1.6 Constantes cinéticas de algunas bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras (Visser, 1995).

Microorganismo	Sustrato	k_s (mg/L)	μ_{max} (d ⁻¹)
<i>Bacterias metanogénicas</i>		54	
<i>Methanobacterium formicicum</i>	hidrógeno	2.0 μ M	2.0
<i>Methanospirillum hungatei</i>	hidrógeno	6.6 μ M	1.2
<i>Methanococcus concilii</i>	acetato	72	0.7
<i>Methanotherx soehngenii</i>	acetato	26	0.1
<i>Methanosarcina barkeri</i>	acetato	144	0.3
Bacterias sulfato-reductoras	acetato	55	0.11
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	hidrógeno	4 μ M	2.5

Para el caso del acetato, *M.concilii*, tiene una μ_{max} mayor que las BSR, como se puede observar en la curva de crecimiento mostrada en la figura 1.6, las bacterias metanogénicas van a superar a las BSR en cuanto a velocidad de crecimiento y por lo tanto en consumo de sustrato a concentraciones de acetato mayores a 4 mM.

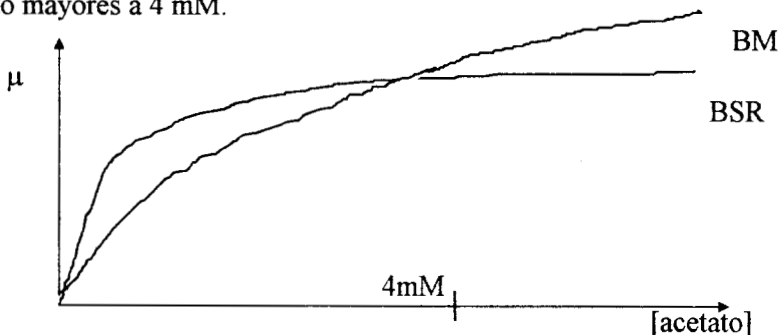


Figura 1.6 Velocidad específica de crecimiento de BSR y BM.

Se ha demostrado que en condiciones limitantes de sustrato las BSR dominan sobre las BM, sin embargo a altas concentraciones de acetato las BM tienen mucha mayor velocidad de consumo de sustrato que las BSR (Yoda, 1987). Cuando la competencia es por el acetato, factores como el pH, la concentración de sulfato y la concentración de sulfuro son determinantes. A

un pH inferior a 6.9, bajo condiciones mesofílicas, las BM crecen más rápido que las BSR. En el intervalo de pH entre 6.9 y 7.7 las BM son compatibles con las BSR a concentraciones bajas de sulfato (Visser^a, 1995). Existen parámetros generales para los valores de la relación $DQO/SO_4^{=}$ que pueden servir para plantear estrategias en la solución de problemas de esta índole. En la tabla 1.7 se muestran estos parámetros, sin embargo, es importante tomar con precaución estos valores, debido a la gran variedad de factores que intervinieron en la obtención de estos datos, como son la gran variedad de bacterias que pueden estar presentes de una a otra población, las condiciones ambientales, los sustratos que se encuentren disponibles, así como los compuestos inhibitorios para algunas de las bacterias de la cadena sintrófica presente.

Tabla 1.7 Efecto de la relación $DQO/SO_4^{=}$ sobre la competencia entre bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras.

$y = DQO / SO_4^{=}$	Observaciones
$y > 10$	No hay competencia con BSR
$y < 10$	Competencia con BSR
$y = 0.67$	Relación estequiométrica por BSR

En la figura 1.7 se muestra la relación entre el factor $DQO/SO_4^{=}$ y la fracción de DQO eliminado por las BSR (Rinzema y Lettinga, 1988), se puede observar que en presencia de carbohidratos las BSR oxidarán hasta un 33% de la DQO disponible.

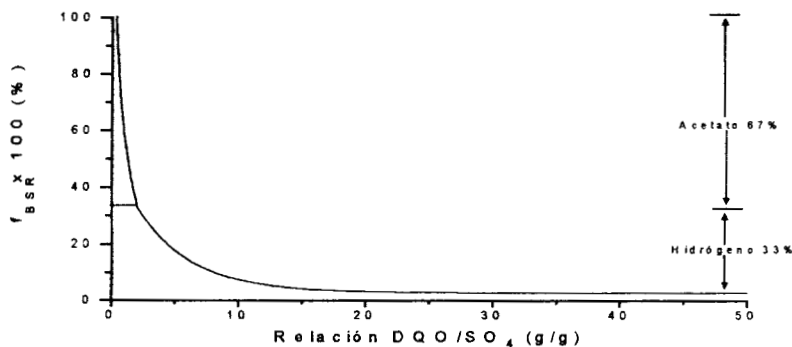
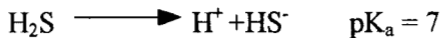


Figura 1.7 Fracción de DQO consumido por las BSR en función de la relación DQO/SO_4 (Rinzema y Lettinga, 1988).

1.4.4 Inhibición por ácido sulfhídrico (H_2S)

Los problemas asociados con el contenido de sulfatos en aguas residuales dependen de la cantidad de sulfuro producido y su permanencia en el medio líquido, el cual se encuentra en función del pH presente en el medio. El sulfuro es un compuesto inhibitorio para las bacterias anaerobias entre las que se encuentran las BM, las BSR y las bacterias acetogénicas (BA) (Hilton y Archer, 1987). Se piensa que el efecto inhibitorio del sulfuro es causado por el sulfuro de hidrógeno sin disociar, debido a que únicamente las moléculas sin carga eléctrica pueden permear la membrana celular (Visser^b, 1995). Una vez que el H_2S ha pasado la membrana celular puede desnaturalizar proteínas con la formación de enlaces sulfuro y disulfuro entre cadenas polipeptídicas. También puede interferir formando enlaces con las coenzimas A y M. Además es posible que afecte el pH interno de la célula. La concentración del sulfuro de hidrógeno sin disociar está determinado por el equilibrio fisicoquímico:



El pK_a de la reacción de disociación del ácido sulfhídrico es 7, por lo que pequeñas variaciones de pH en el rango de 6-8 trae como consecuencia efectos importantes en la concentración del H_2S .

A partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach se puede determinar el efecto del pH en las concentraciones relativas de ácidos y de bases.

$$pH = pK_a + \log [HS^-]/[H_2S]$$

Despejando las concentraciones de ácido y base se obtienen sus proporciones relativas para los valores de pH de 7, 8 y 6.

$$\begin{array}{ll} \frac{[HS^-]}{[H_2S]} = 10^{(pH-pK)} & \text{a pH 7 } [HS^-] = [H_2S] \\ & \text{a pH 8 } [HS^-] = 10[H_2S] \\ & \text{a pH 6 } [HS^-] = 0.1[H_2S] \end{array}$$

Ahora por la ley del equilibrio de Henry $y_{H_2S} = (X_{H_2S})(H_e)$ se tiene que el H_2S puede volatilizarse, siendo la constante de Henry $H_e = 0.3572 \text{ atm L/gH}_2\text{S}$. A pH 8 el H_2S se encuentra soluble en el agua y a pH 6 en forma de gas como sulfuro de hidrógeno (Koster *et al.*, 1986; McCartney *et al.*, 1991).

1.5 Reactor anaerobio UASB

El reactor UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*: reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente) tiene la característica de retener altas concentraciones de biomasa en forma de gránulos. La alta sedimentabilidad de la biomasa permite que se pueda operar el reactor a tiempos de residencia hidráulica del orden de 6 a 48 h (Viñas, 1994). En los reactores UASB la biomasa no requiere de ningún tipo de soporte externo. En la figura 1.8 se muestra un esquema de un reactor UASB en donde se puede apreciar que se encuentra formado por: (A) cajas de distribución, (B) un separador gas-sólido-líquido, (C) distribuidores del influente y (D) un lecho de lodos.

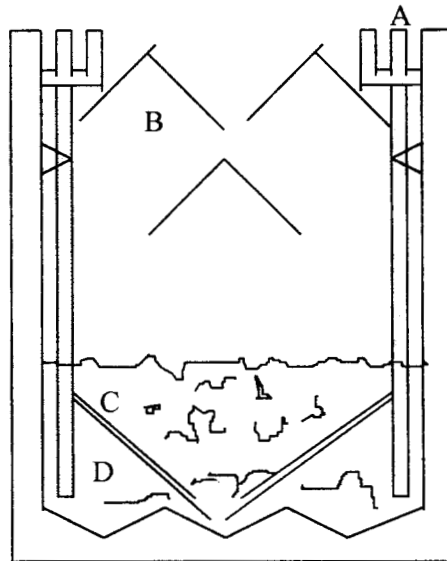


Figura 1.8 Esquema de un reactor UASB. (A) cajas de distribución, (B) campanas de recolección de biogás, (C) distribuidores y (D) lecho de lodos.

El lecho de lodos se localiza en la parte inferior del reactor a través del cual pasa el agua residual. Es en este lugar donde se llevan a cabo los procesos de digestión anaerobia y se produce el biogás que es separado del líquido en el separador gas-sólido-líquido. Los lodos que presenten una buena capacidad de sedimentación permanecerán en el reactor y aquellos lodos que presenten características de baja sedimentabilidad saldrán del reactor arrastrados por la fuerza ascendente del agua.

La organización interna de los gránulos se ha venido estudiando cada vez más en los últimos años (Harada *et al.*, 1988; Guiot *et al.*, 1991; Alphenaar, 1994; Schmidt y Ahring, 1996). Actualmente se acepta que los gránulos se encuentran constituidos por una estratificación de los diferentes grupos bacterianos. En la figura 1.9 se muestra un diagrama de la organización interna del gránulo, que permite apreciar cómo se dividen estos diversos grupos bacterianos.

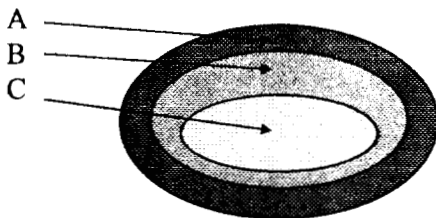


Figura 1.9 Organización bacteriana en un gránulo (Guiot *et al.*, 1991).

En la superficie del gránulo (A) las bacterias que predominan son las acidogénicas y en su caso las sulfato-reductoras. En la parte media (B) las bacterias que predominan son las acetogénicas y en la parte interna (C) del gránulo se encuentran las bacterias metanogénicas (Guiot *et al.*, 1991). Es importante señalar que en el caso de las aguas residuales que contienen sulfatos, el desarrollo de las BSR se va a llevar a cabo en la superficie debido a que tiene menor capacidad de fijación (Alphenaar, 1994) y a que tienen mayor rapidez de crecimiento que las metanogénicas y acetogénicas. Por estas razones es probable que sean los primeros grupos microbianos que entren en contacto con el sustrato y se inicie la degradación de los contaminantes presentes en el agua residual.

PROBLEMA

Los efluentes de la industria petroquímica productora del ácido tereftálico, presentan compuestos tóxicos para las bacterias metanogénicas.

2. HIPÓTESIS

Debido a que las bacterias sulfato-reductoras han presentado la capacidad de oxidar compuestos aromáticos (Häggblom *et al.*, 1993; Lovley *et al.*, 1995; Häggblom y Young, 1995) y benzaldehidos (Zellner, 1990), es posible que oxiden el 4-carboxibenzaldehido. El cual es tóxico para las bacterias metanogénicas, llevando a cabo la primera etapa de la degradación del 4-carboxibenzaldehido.

Debido a que las bacterias sulfato-reductoras presentan una mayor capacidad sobre las bacterias metanogénicas para competir por el acetato e hidrógeno es posible mediante la relación $DQO/SO_4^{=}$ evitar la inhibición de las bacterias metanogénica, de tal forma que no sea a partir exclusivamente de la sulfato-reducción que se lleve a cabo la oxidación de todos los compuestos orgánicos.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la degradación del 4-CBA presente en los efluentes de la industria petroquímica productora de ácido tereftálico.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Adaptar un reactor UASB a la degradación de 4-carboxibenzaldehido mediante la combinación de las reacciones de sulfato-reducción y de metanogénesis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

Se utilizó un reactor UASB de 1.5 L de volumen de trabajo a un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 1 día, a pH 7 y a una temperatura de 37 °C. El trabajo experimental se dividió en tres etapas (tabla 4.1). En la etapa “A”, se induce la actividad microbiana en el reactor y se establecen las condiciones de operación como son la carga orgánica y el TRH, se adiciona el sulfato para estimular el crecimiento de la población de bacterias sulfato-reductoras, es también el tiempo en que empieza a haber un incremento en la capacidad de degradación hasta que se alcanza por lo menos una eficiencia del 85%.

Tabla 4.1 Etapas del experimento.

Etapa	Característica	Sustratos
A	Inicio de la actividad microbiana. Establecimiento de la mayor eficiencia de degradación	Lactosa + sulfatos
B	Estabilización de la actividad metanogénica y sulfato-reductora.	Lactosa + sulfatos
C	Prueba de degradación del 4-CBA.	Lactosa + sulfatos + 4-CBA

La segunda etapa, “B” del experimento, tiene por finalidad alcanzar la estabilidad del reactor teniendo presentes a las BM y a las BSR. En la etapa “C”, se adicionó el 4-CBA, incluyéndolo en la preparación del medio utilizado. Todos los compuestos utilizados en la preparación del medio de alimentación fueron grado analítico, a excepción de la lactosa que fue grado industrial. El 4-CBA se adicionó en forma de sal. La adición de lactosa tuvo como finalidad promover la actividad anaerobia en todas las etapas: hidrólisis, fermentación, acetogénesis y metanogénesis.

4.2 Inóculo.

El reactor se inoculó con lodos provenientes de un reactor a escala laboratorio que trataba los efluentes de una industria de levaduras. En la tabla 4.2 se muestran los valores de sólidos suspendidos que presentó el inóculo. El volumen de inóculo fue de 500 ml. Estos valores corresponden al mínimo recomendado para arrancar un reactor UASB con lodos no granulares (Noyola, 1994).

Tabla 4.2 Contenido de sólidos suspendidos del inóculo.

Sólidos Suspendidos (SS)	Valores (g/L)
Totales (T)	47.61
Fijos (F)	24.46
Volátiles (V)	23.15

4.3 Medio de alimentación

Se alimentó el reactor con un medio de cultivo, que consiste en medio basal de Balch *et al.* (1979) al que se le eliminó la solución de vitaminas y la resarsurina debido a que no es necesario elaborar un medio anaerobio estricto para operar un reactor en continuo. En la tabla 4.3 se indican las soluciones que constituyen el medio basal y en la Tabla 4.4 se indica el volumen de cada solución para preparar un litro de medio basal. La fuente de carbono fue 1 g/L de lactosa y 100 mg/L de 4-CBA y 90 mg/L SO_4^-

Tabla 4.3 Soluciones del medio basal de Balch *et al.* (1979).

<u>Solución mineral 1 (g/L)</u>		<u>Solución mineral 2 (g/L)</u>		(g/L)
K_2HPO_4	6.0	$KHPO_4$	6.0	NaCl 12.0
		$KHPO_4$	6.0	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.1
		NH_4Cl	2.4	$CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.16
<u>Solución de oligoelementos</u>				
Se prepara una solución con 1.5 g de ácido nitrilo triacético en 950 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 6.5 con una solución de KOH y se afora a un litro. Agregar:				
	(g)		(g)	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01	
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0.5	$AlK(SO_4)_2$	0.01	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	H_3BO_3	0.01	
$CoCl_2$	0.1	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.01	
$ZnSO_4$	0.1			
<u>Solución de cloruro de níquel</u>				
$NiCl_2$ 0.005g/100 mL de agua destilada.				
<u>Solución de sulfato ferroso</u>				
$FeSO_4/H_2O$ 0.2g/100 mL de agua destilada.				

El medio basal se preparó adicionando los volúmenes de las soluciones de minerales y oligoelementos indicados en la Tabla 4.3. Una vez preparado el medio basal, se adicionaron la(s) fuente(s) de carbono y el sulfato. El medio final se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb/pulg².

Tabla 4.4 Medio basal sin fuente de carbono.

Medio basal	Volumen (mL)
Solución mineral 1	50.0
Solución mineral 2	50.0
Solución de oligoelementos	10.0
Solución de cloruro de níquel	10.0
Solución de sulfato ferroso	1.0
Agua destilada	1000.0

4.4 Reactor

En la figura 4.1 se muestra el diagrama del equipo empleado. El medio de cultivo se alimentó al reactor a un flujo de 1.5 L/día por medio de una bomba peristáltica Cole-Palmer de 1-100 RPM con un controlador MasterFlex, trabajando a un TRH de 1 día. El biogás producido pasó por una trampa de humedad y una de ácido sulfhídrico antes de llegar al medidor de volumen.

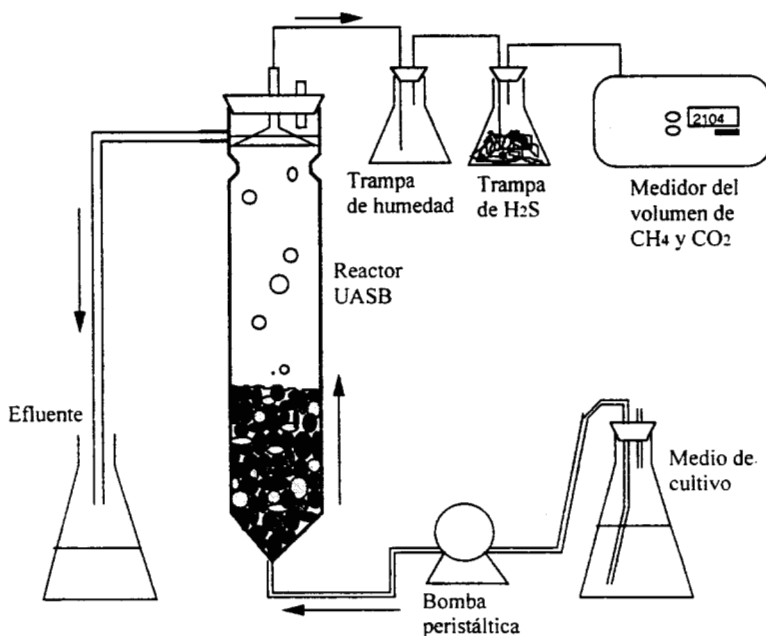


Figura 4.1 Equipo de experimentación.

4.5 Métodos analíticos

Determinación del volumen de biogás ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$). El volumen de biogás producido se midió con un cuantificador digital de flujo DENEb CDF-402 que funciona de la siguiente manera, el biogás producido por el reactor pasa primero por una trampa de humedad, después por una trampa que contiene limaduras de fierro para eliminar el ácido sulfhídrico. A continuación, entra a una válvula solenoide de tres pasos que dirige el gas a un sistema de vasos comunicantes (figura 4.2), que contiene una solución salina saturada y tres electrodos colocados a diferente altura. La distancia entre los dos electrodos superiores representa un volumen definido de 5 mL. Al entrar el biogás al primer vaso ejerce una presión tal que desplaza el líquido al segundo recipiente. Al subir el nivel del segundo al tercer electrodo se manda una señal eléctrica a la válvula solenoide que libera el gas acumulado en el primer recipiente. Al regresar el agua a su nivel original se registra un ciclo.

Determinación de la composición del biogás. La composición del efluente gaseoso se analizó por cromatografía de gases, en un equipo GOW MAC serie 550 con detector de conductividad térmica, con temperatura del inyector de 170°C , temperatura de la columna de 140°C , temperatura del detector de 190°C , con una corriente en los filamentos de 120 mA, la presión del helio 50 psi y un flujo de 30 mL/min.

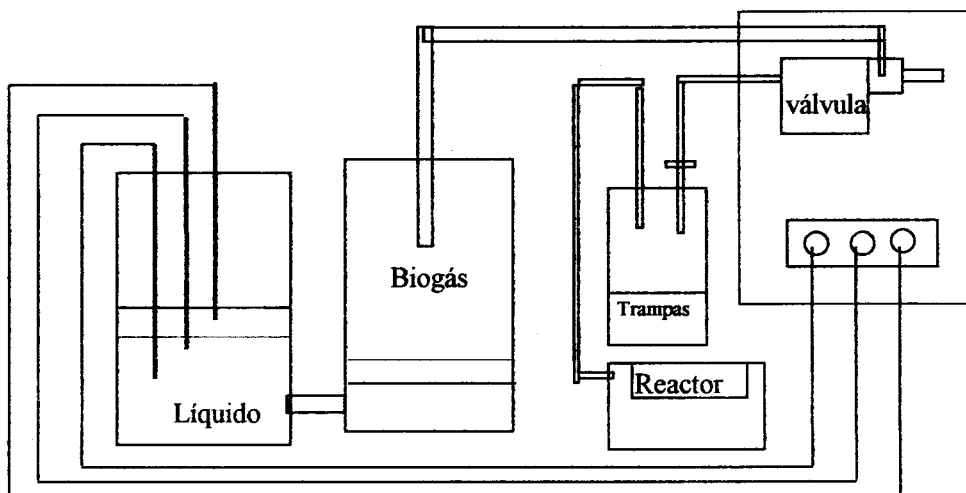


Figura 4.2 Cuantificador digital de flujo.

Determinación de la Demanda Química de Oxígeno DQO. La materia orgánica se midió como DQO, utilizando el método de reflujó cerrado (Standard Methods, 1985), modificado por Wilson y Jarbas (1989). En un tubo de ensaye se adiciona 2.5 mL de muestra, 1.5 mL de dicromato de potasio y 3.5 mL de una solución de ácido sulfhídrico con sulfato de plata. Se pone en una parrilla a 150°C por dos horas, después se deja enfriar y se lee en un espectrofotómetro *Spectronic 20 Bausch & Lomb* a una longitud de onda de 620 nm.

Determinación de 4-carboxibenzaldehido y ácido tereftálico. Los compuestos aromáticos como el 4-CBA y el AT se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) modelo GS3540, marca *LDC analytical*, constituido por una bomba modelo constaMetric 3500 (controladora del gradiente), una bomba constaMetric 3200 (controladora del flujo), un detector programable UV/VIS spectroMonitor 4100, una válvula de inyección Rheodyne 7125 y un desgasificador de membrana controlado por un programa Lctalk en ambiente Windows en una computadora *American Megatrend 486DX* con monitor VGA. Se utilizó una columna μ Bondapak TM C18 10 μ M (300*4.5 mm D.I.) No. 027324. La fase móvil estuvo constituida por las soluciones A y B en una proporción (9:1) a un flujo de 2 mL/min.

Reactivos. Los solventes utilizados fueron: agua marca Mallinckrodt Chrom AR, metanol marca OmniSolv y ácido acético marca Chromanorm, todos ellos grado HPLC. Los compuestos aromáticos usados fueron: ácido tereftálico, sal disódica 96% de pureza (Aldrich); 4-carboxibenzaldehido 97% de pureza (Aldrich); ácido benzoico, sal de sodio (Sigma) y fosfato de tetrabutíl amonio (Waters).

Se prepararon las soluciones estándar de los ácidos tereftálico, 4-carboxibenzaldehido y benzoico, a una concentración no mayor a 1 g/L. Los solventes se filtraron con membranas Cole-Palmer de 0.45 μ m de nylon. Los solventes se prepararon como se indica a continuación:

Solución A: ácido acético 5%, pH 3.5 con NaOH 5N.

Solución B: ácido acético 5% en metanol, pH 3.5.

Determinación de sulfatos. La determinación de sulfatos se realizó por el método turbidimétrico (426 C, Standard Methods, 1985). Las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

Buffer solución A: Se disolvió 30 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, 1 g KNO_3 , y 20 mL CH_3COOH (99%) en 500 mL de agua destilada y se aforó a 1000 mL.

Buffer solución B: (se requiere cuando la concentración de sulfatos en la muestra es menor de 10 mg/L): los mismos reactivos y cantidades que la anterior más 0.111 g Na_2SO_4 .

$BaCl_2$, cristales de 20-30 mallas.

Se tomaron 100 mL de muestra dentro de un matraz erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 20 mL de solución buffer y se mezclaron en una parrilla de agitación. Una vez agitado y mientras continúa en agitación se añadió 0.4 g de cristales $BaCl_2$, que habían sido tamizados previamente y se agitó por 60 segundos a velocidad constante. Después de este tiempo, se puso la solución en una celda y se midió en el espectrofotómetro a 420 nm después de 5 min.

Determinación de pH: Las determinaciones de pH se realizaron por medio de un equipo Cole-Palmer 8350 y electrodo 5992-20.

Las determinaciones que se llevaron a cabo en los lodos fueron (Standard methods, 1992): sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos fijos (SSF), sólidos suspendidos volátiles (SSV).

Prueba de oxidación fisicoquímica del 4-carboxibenzaldehído.

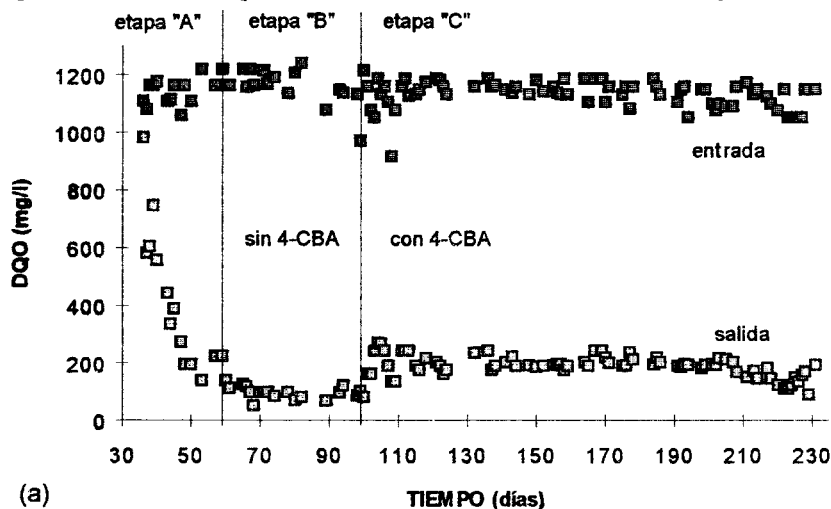
La estabilidad del 4-carboxibenzaldehído a la oxidación química se probó en un medio de cultivo de Balch bajo condiciones anóxicas, estériles y en agitación.

- 1.- Se prepararon por separado soluciones de: medio de cultivo basal de Balch, solución de 4-CBA 3g/L a pH 11, sulfato de sodio 2 g/L, y bicarbonato de sodio 10%. Todos los reactivos fueron grado analítico.
- 2.- Se llenaron las botellas serológicas con 49 mL de medio basal y se cerraron con tapones de hule sellandolas.
- 3.- Se esterilizaron las soluciones y se hicieron pruebas de pH.
- 4.- Se adicionaron a las botellas serológicas el 4-CBA y el sulfato de sodio en condiciones estériles. La concentración final del 4-CBA fue de 50 mg/L, el pH de 7 y el volumen de operación de 60 mL.
- 5.- Las botellas se pusieron en agitación a 30 r.p.m. a una temperatura de 34°C por un tiempo de 8 días.
- 6.- Se tomó 1 mL de muestra para medir el 4-CBA por HPLC.

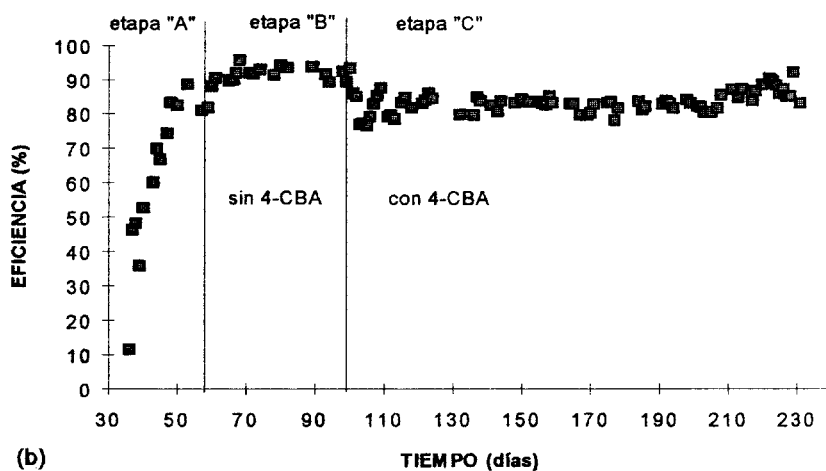
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Degradación de la demanda química de oxígeno total

La figura 5.1.a muestra el comportamiento del reactor alimentado con 1 g/L de lactosa y 90 mg/L de sulfato. La etapa "A", iniciada desde el día cero, muestra la adaptación del reactor a las condiciones de sulfato-reducción y la etapa "B" muestra un período de eliminación del 90% de la DQO.



(a)



(b)

Figura 5.1 Eliminación de la materia orgánica total en el reactor. En el día 101 se adicionó el 4-CBA, a) concentración b) eficiencia.

Cuando se consideró que el reactor estaba estable se adicionaron 100 mg/L de 4-CBA, que tiene un valor de DQO equivalente a 170.5 mgDQO/L, iniciándose así la etapa "C", en donde la carga orgánica estuvo constituida por lactosa y 4-CBA; La lactosa se redujo a 900 mg/L, que tiene un valor de DQO equivalente a 959.4 mg DQO/L. Se aprecia que al principio la DQO de salida aumentó, para restablecerse a una concentración constante de 201 mg/L, obteniéndose así 83 % de eficiencia eliminada de la DQO ($\eta_{DQO} = 0.83$) como se muestra en la figura 5.1.b. El choque que sufrió el reactor por la presencia de este compuesto tóxico fue superado en un período de 15 días, esto significa que la eficiencia no continuo descendiendo, con lo que se muestra la capacidad del reactor para soportar compuestos tóxicos, a concentraciones comunes en los sistemas de tratamiento de aguas de este tipo de industria. Un análisis estadístico mostró con un nivel de significancia $\alpha = 0.01$ que hay diferencias entre la etapa B y C.

Podemos definir el consumo total de la DQO con la ecuación 5.1

$$B = (DQO_o - DQO) = M + S \quad 5.1$$

En donde:

B = DQO degradada (mg/L)

DQO_o = concentración en la entrada (gDQO/L)

DQO = concentración en la salida (gDQO/L)

M = DQO consumida por metanogénesis (gDQO/L)

S = DQO consumida por la actividad sulfato-reductora (g DQO/L)

5.2 Eliminación de sulfato

En la figura 5.2 se muestra el comportamiento del ión sulfato a lo largo de los 231 días del experimento. Durante la etapa de estabilización "B" se redujeron 33 mg/L de SO_4^{2-} lo que equivale a una eficiencia en la reducción de 36 % ($\eta_{SO_4} = 0.36$). Sin embargo, con la adición del 4-CBA en la etapa "C" la actividad sulfato-reductora disminuyó inicialmente hasta el 9%. Por lo que presentó mayor sensibilidad que la mostrada por el reactor en el consumo de la DQO. Gradualmente la actividad sulfato-reductora se fue recuperando hasta alcanzar la actividad mostrada antes de la adición del 4-CBA. Esta recuperación se llevó a cabo en 20 días. Para determinar la cantidad eliminada de la DQO debida a la actividad sulfato-reductora se definió la DQO consumida por la actividad SR (ecuación 5.2) dando como resultado S= 22.11 mg DQO/L.

Debido a que la DQO consumida por metanogénesis fue de $M = 656.9$ mgDQO/L se pudo calcular el porcentaje de DQO consumido por la actividad sulfato-reductora a partir de la ecuación 5.4 que fue en promedio de 3.26 %.

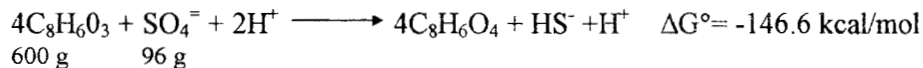
$$\% S = S / (S + M) \tag{5.4}$$

En donde:

% S = Porcentaje de la DQO consumida por sulfato-reducción.

M = DQO consumida por metanogénesis (gDQO/L)

Por medio de la ecuación 5.5 se determinó que se necesitan 33 mg/L de sulfato para transformar 206.25 mg de 4-CBA en AT, que es el doble de la concentración de alimentación. Por lo que no sólo la actividad sulfato reductora participa en la transformación del 4-CBA en AT, sino que además puede participar en la degradación del AT o en alguna otra de las etapas de la digestión anaerobia.



$$\frac{96 \text{ g } SO_4^{=}}{600 \text{ g } 4\text{-CBA}} = \frac{0.16 \text{ g } SO_4^{=}}{\text{g } 4\text{-CBA}} \tag{5.5}$$

5.3 Producción de metano

Para verificar las transformaciones químicas es fundamental realizar un balance de masa, porque indica si se están considerando todas las reacciones que toman parte en el proceso de mineralización del 4-CBA. La figura 5.3 muestra la comparación entre la producción de metano experimental y la teórica en L/día de CH₄ producido. Se puede observar una disminución en la producción de metano, de aproximadamente 31%, ocasionado por la adición del 4-CBA, pasando de una producción de 0.48 L metano/d a 0.33 L metano/d. Esta comparación entre la cantidad de metano producido, y el metano teórico se obtiene a partir de la ecuación 5.6; Cuando en el agua residual se encuentran presentes sulfatos, la eliminación de la materia orgánica por digestión anaerobia no sólo se va a llevar a cabo por metanogénesis, sino que una parte se consumirá también por sulfato-reducción. La ecuación presenta la producción de metano teórica, que se

obtiene restando la contribución de la sulfato-reducción al consumo total de la DQO.

$$F [(S_o - S) - (SO_4^-_o - SO_4^-) \delta_s] \delta_M = L CH_4/d \quad 5.6$$

En donde:

F = Flujo de alimentación (L/d)

S_o = sustrato en la entrada (gDQO/L)

S = sustrato en la salida (gDQO/L)

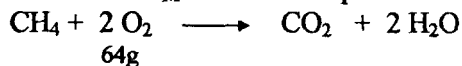
SO₄⁻_o = sulfato en la entrada (g/L)

SO₄⁻ = sulfato en la salida (g/L)

δ_s = 0.67 g DQO consumida / g SO₄ reducido

δ_M = 2.9 g DQO consumida / L CH₄ producido

La relación δ_M se obtiene a partir de la reacción de oxidación del metano.



$$\delta_M = \frac{64 \text{ g } O_2}{\text{mol } CH_4} \Bigg| \frac{\text{mol } CH_4}{22 \text{ L}} = 2.9 \text{ g DQO / L } CH_4$$

Aunque los datos experimentales muestran valores más bajos que los cálculos teóricos, los dos presentan el mismo perfil de comportamiento, por lo que es posible que existieran fallas en el sistema de medición del gas.

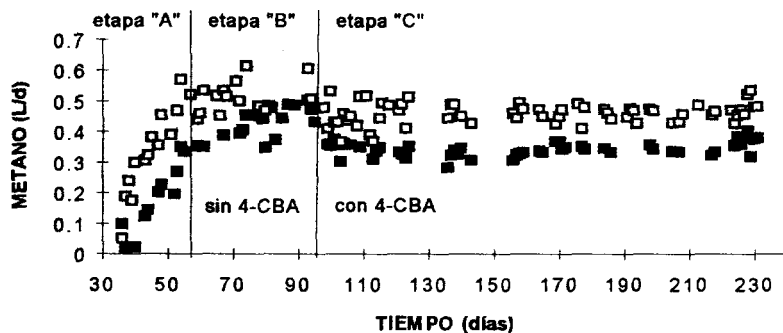


Figura 5.3 Balance de metano. Se muestra la curva obtenida por medición del gas □, contra la calculada de acuerdo a la ecuación 5.3 □.

El balance de la DQO que se grafica en la figura 5.4 se obtuvo a partir de la ecuación 5.1 y de las ecuaciones 5.2.1 y 5.3.2. La ecuación 5.7 se obtiene de la transformación a valores de DQO de la producción de metano que se da por litro de medio de cultivo alimentado al reactor.

$$M = (Q/F)(\delta_M) \tag{5.7}$$

En donde:

M = DQO consumida por metanogénesis (gDQO/L)

Q = Metano producido (L CH₄/d)

F = Flujo de alimentación (L/d)

$\delta_M = 2.9$ g DQO consumida / L CH₄ producido

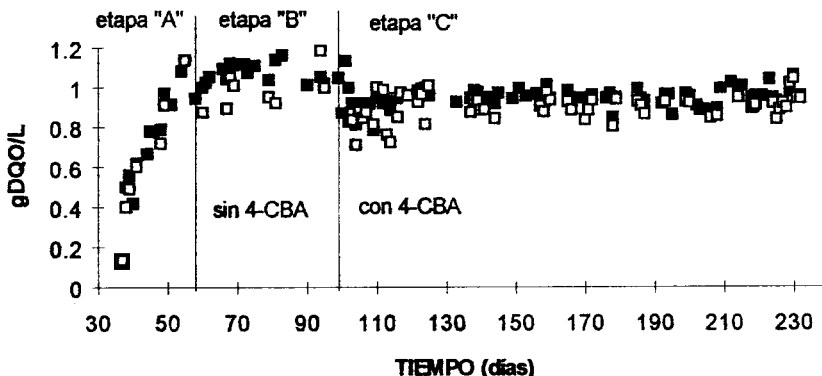


Fig. 5.4 DQO consumida. DQO calculada a partir de la diferencia de la ecuación 5.1 y □ DQO calculada a partir de las ecuaciones 5.2.1 y 5.3.2

De esta manera se puede calcular la DQO eliminada por metanogénesis, que fue de 656.9 mgDQO/L, calculado a partir de la ecuación 5.7. Teniendo una participación del 96.74% en la eliminación de la DQO. Este se obtuvo de la ecuación 5.8.

$$\% M = M / (S + M) \tag{5.8}$$

En donde:

% M = Porcentaje de la DQO consumida por metanogénesis

M = La DQO consumida por metanogénesis.

S = La DQO consumida por sulfato-reducción.

Además se calculó la DQO eliminada por consumo de lactosa, que si bien no se determinó en el efluente del reactor, se pudo calcular con la ecuación 5.9, el cual fue de $C = 773 \text{ mgDQO/L}$. Para el caso de AT se restó la concentración presente en el efluente a la concentración calculada a partir de la transformación completa del 4-CBA en AT.

$$C = B - A \quad 5.9$$

En donde:

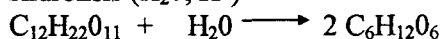
$C = \text{DQO eliminada por consumo de lactosa (g DQO / L)}$

$B = \text{DQO total degradada.}$

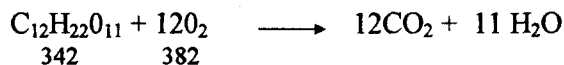
$A = \text{DQO eliminada por consumo de 4-CBA y AT.}$

En cuanto a la lactosa, se tiene que su aportación en DQO se da a partir de los monosacáridos formados de la hidrólisis de la misma:

Hidrólisis (H_2O , H^+)



Oxidación



$$\frac{382 \text{ g O}_2}{342 \text{ g Lactosa}} = \frac{1.122 \text{ g DQO}}{\text{g Lactosa}} \quad 5.10$$

5.4 Eliminación del 4-CBA y del AT

Como se puede observar en la figura 5.5, existe una completa transformación del 4-CBA en AT. Se encontró en la salida del reactor una total ausencia del 4-CBA y de algún posible intermediario, como serían el ácido benzoico y el protocatecuato (3,4-dihidroxibenzaldehído). Estos compuestos han sido reportados como intermediarios en estudios de biodegradación de compuestos aromáticos con grupos funcionales aldehídos y carboxilos (Bemis *et al.*, 1982; Todini y Hulshoff Pol, 1992; Gößner *et al.*, 1994; Fuchs *et al.*, 1994). Únicamente apareció en la salida el ácido tereftálico a una concentración de 0.36 mmoles/L (60 mg/L), disminuyendo en los siguientes cuatro días hasta alcanzar una concentración media de 0.24 mmoles/L (40 mg/L).

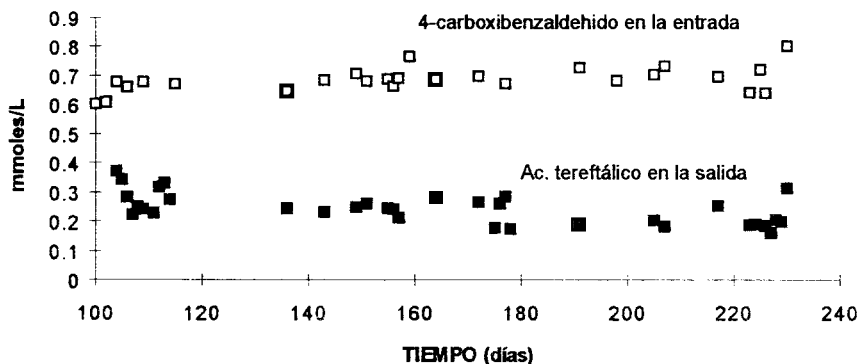
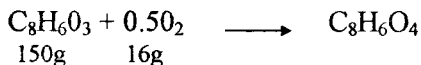


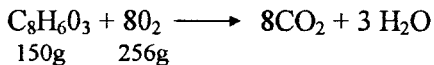
Figura 5.5 Eliminación de 4-CBA y su transformación en ácido tereftálico.

Se calculó la DQO eliminada que corresponde a la transformación de 4-CBA a AT. A partir de la remoción completa del 4-CBA y por medio de la ecuación 5.11 se obtiene que se eliminaron 10.6 mg DQO/L.

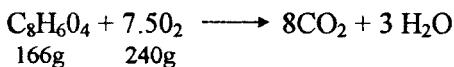


$$\delta_{\text{CBA}} = \frac{16 \text{ g O}_2}{150 \text{ g 4-CBA}} = \frac{0.106 \text{ g DQO}}{\text{g 4-CBA}} \quad 5.11$$

Para la degradación completa del 4-CBA y AT se calculó la ecuación 5.12 y 5.13 respectivamente, que indican sus valores de DQO .



$$\frac{256 \text{ g O}_2}{150 \text{ g 4-CBA}} = \frac{1.705 \text{ g DQO}}{\text{g 4-CBA}} \quad 5.12$$



$$\delta_{\text{AT}} = \frac{240 \text{ g O}_2}{166 \text{ g AT}} = \frac{1.44 \text{ g DQO}}{\text{g AT}} \quad 5.13$$

Tomando en cuenta que la ecuación 5.11 se llevó a cabo completamente, se puede decir que la eficiencia de eliminación alcanzada para el 4-CBA fue de 100% y del aromático total (4-CBA + AT) fue de 67%. La DQO eliminada por consumo de 4-CBA y AT se obtuvo a partir de la ecuación 5.14. Dando como resultado 113 mg DQO/L.

$$A = (4CBA_o - 4CBA)\delta_{CBA} + (AT_o - AT)\delta_{AT} \quad 5.14$$

En donde:

A = DQO eliminada por la degradación del 4-CBA y AT (g DQO/L)

4CBA_o = concentración del 4-CBA en la entrada (g/L) = 100 g/L

4CBA = concentración del 4-CBA en la salida (g/L)

AT_o = concentración del AT en el reactor al transformarse
todo el 4-CBA (g/L) = 110.76 g/L

AT = concentración del AT en la salida (g/L)

En la tabla 5.1 se muestra un resumen de las concentraciones de los componentes que se midieron en la entrada y en la salida del reactor, así como las eficiencias alcanzadas respectivamente. La eficiencia de eliminación del AT se determinó calculando la concentración de este en el reactor, a partir de la transformación completa del 4-CBA (ecuación 5.11).

Tabla 5.1 Caracterización de la operación del reactor UASB.

	Entrada (mg/L)	Salida (mg/L)	η eliminación (%)
DQO	1174	201	83
SO ₄ ⁼	90	57	36
4-CBA	100	0	100
Lactosa	900	127	86
AT	110.76*	40	64
Aromáticos	100	40	67

* Calculado a partir de la transformación completa del 4-CBA.

La tabla 5.2 muestra que la DQO es degradada principalmente por las BM. Es posible que el 28% del sulfato reducido se hubiera empleado en oxidar el grupo aldehído del 4-CBA a carboxilo del AT (ecuación 5.15). El 70% restante puede oxidar otras moléculas presentes, sin embargo, la relación "E" indica que la fracción total de 4CBA y AT que se degrada es mayor que el potencial de oxidación del sulfato que se redujo (ecuación 5.16), esto indica

que no todo el AT se oxidó por sulfato-reducción. Por lo tanto es importante tratar de encontrar las posibles vías que sigue el 4-CBA para degradarse. Las relaciones “D” y “E” de la tabla 5.2 mencionadas anteriormente se determinaron por medio de las ecuaciones 5.15 y 5.16 mostradas a continuación.

$$D = (\delta_{CBA}) (4-CBA_o) / S \tag{5.15}$$

En donde

D = Fracción de la DQO utilizada para oxidar el grupo aldehído del total eliminado por SR

S = DQO eliminada por actividad SR.

$$E = A / S \tag{5.16}$$

En donde

E = Fracción de la DQO utilizada para oxidar el 4-CBA a AT del total eliminado por SR.

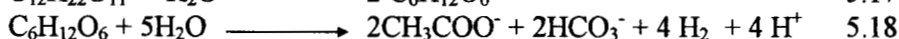
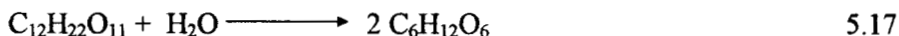
A = DQO eliminada por la degradación del 4-CBA y AT.

Tabla 5.2 Relaciones entre sulfato-reducción (SR) y metanogénesis (M).

B	DQO eliminada total	974 mg DQO/L
A	DQO eliminada por consumo de 4-CBA y AT	113 mg DQO/L
C	DQO eliminada por consumo de lactosa	862 mg DQO/L
M	DQO eliminada por metanogénesis	657 mg DQO/L
η_M	Eficiencia de eliminación por M	96.74 %
S	DQO eliminada por sulfato-reducción	22.1 mg DQO/L
η_S	Eficiencia de eliminación por SR	3.26 %
D	Fracción de la DQO utilizada al oxidar el grupo aldehído del total eliminado por SR	28 %
E	Fracción de la DQO utilizada al oxidar el 4-CBA a AT del total eliminado por SR	E > 1

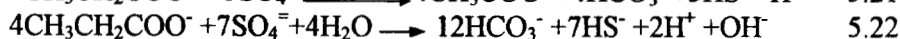
5.5 Reacciones que participan en la metanización y sulfato-reducción de la lactosa y 4-CBA.

Haciendo una recopilación de las reacciones que se llevan a cabo para lograr la metanización y sulfato-reducción de la lactosa y el 4-CBA se muestra la siguiente serie de reacciones. La lactosa por hidrólisis y fermentación puede dar como resultado cuatro moléculas de acetato, de acuerdo a la ecuación 5.17 y 5.18.

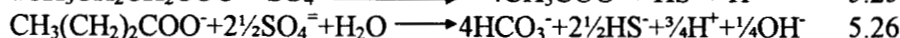
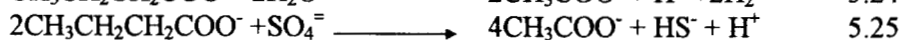
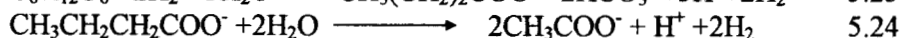
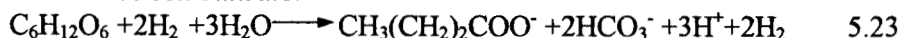


De la glucosa generada a partir de la lactosa se puede obtener, además de acetato, al propionato y al butirato que servirá de sustrato para las bacterias acetogénicas y sulfato-reductoras.

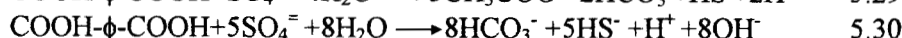
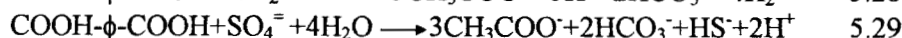
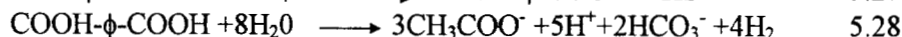
Reacciones con propionato.



Reacciones con butirato.



En la hipótesis de la tesis, la primera reacción de transformación se lleva a cabo por sulfato-reducción, oxidando el 4-CBA y dando lugar a una molécula de AT. A partir del AT se dan las reacciones de sulfato-reducción y fermentación.



ϕ = anillo aromático.

Para determinar hasta donde la sulfato-reducción de 33 mg SO₄⁼ (tabla 5.1) oxida al 4-CBA se presentan seis hipótesis alternativas (tabla 5.3).

La primera hipótesis se basa en la reacción de oxidación del 4-CBA a AT (ecuación 5.27). Para llevar a cabo esta reacción sólo se requieren 10.6 mg DQO o 15.8 mg SO₄⁼ reducido (ecuaciones 5.3 y 5.11).

En la segunda hipótesis se prosigue la degradación hasta ácido benzoico (AB). Con esta reacción se necesitarían 10.2 mg DQO proporcionado por el sulfato.

En la tercera hipótesis el 4-CBA se oxida a AT y de ahí a ácido acético, con lo que se requieren 30.7 mg DQO ó 45.3 mg SO₄⁼. En esta hipótesis hay un exceso de 13 mg/L de sulfato que no se redujo, por lo que se descarta la hipótesis.

Tabla 5.3 Posibles rutas de oxidación del 4-CBA por sulfato-reducción(SR).

Hipótesis alternas	Oxidación hasta	Cantidad de DQO necesario para 4CBA → AT (mgDQO/L)	Cantidad de DQO necesario para AT → X (mgDQO/L)	DQO total (mg DQO/L)
1°	AT	10.6	-----	10.6
2°	AT y a AB	10.6	-0.42	10.2
3°	ac. acético	10.6	20.12	30.72
4°	ac. propionico	10.6	-----	10.6
5°	ac. butírico	10.6	-----	10.6
6°	ac. protocatecuatico	10.6	13.2	23.3

La cuarta y quinta hipótesis, en donde hay formación de propionato y butirato respectivamente quedan descartadas porque implican una reducción del AT. Por lo que la SR no participaría en esta vía.

La sexta hipótesis muestra que para la degradación del 4-CBA hasta el ácido protocatecuatico (figura 1.2) se requieren de 23.2 mg DQO, equivalentes a 34.7 mg SO₄⁼. Por lo que el papel de las BSR en la degradación del 4-CBA podría quedar justificado hasta esta reacción.

Del ácido protocatecuatico en adelante las reacciones que se llevarían a cabo son las de fermentación, acidogénesis y metanogénesis (tabla 1.3).

6. CONCLUSIONES

La hipótesis planteada, esto es, que las BSR son las responsables de oxidar el 4-CBA es verdadera. Se encontró que las BSR son las responsables de la oxidación del 4CBA a AT, y además que es posible que intervengan en la transformación del AT al ácido protocatecuático. En este trabajo se encontró que es posible degradar el 4-CBA y el AT con eficiencias del 100% y 64% respectivamente por actividad sulfato-reductora en un reactor metanogénico. El mantener una relación $DQO/SO_4^- = 13.3$ ayudó a prevenir la competencia entre BSR y BM, llevando a cabo las BM el 96% de la remoción de la DQO total, sin existir aparentemente un efecto inhibitorio del H_2S .

Se logró adaptar un reactor UASB a la degradación del 4-CBA por medio de las reacciones de sulfato-reducción y metanogénesis.

Se hizo un experimento para determinar si se podía llevar a cabo la oxidación espontánea del 4-CBA. Se encontró que no ocurre ninguna oxidación, por lo que se puede decir, que la metanización no es inhibida por el 4-CBA, porque es oxidado a ácido tereftálico por las BSR. Las bacterias sulfato-reductoras fueron en un inicio más sensibles a la presencia del 4-CBA, al disminuir casi en su totalidad su actividad, sin embargo, el sistema se adaptó a la presencia de este compuesto, obteniendo una eficiencia de remoción de la DQO del 85% a una carga de 1.2 gDQO/l.d.

Recomendaciones

1. Se sugiere probar diferentes cargas orgánicas y concentraciones de sulfatos para encontrar la óptima relación DQO/SO_4^- que permita la mejor degradación del 4-CBA y del AT y la utilización total del sulfato en el efluente.
2. Se sugiere hacer la medición del protocatecuático, de los AGV's y de otros posibles intermediarios.
3. Las posibilidades que se presentan para la aplicación de un sistema metanogénico-sulfato reductor son muy importantes, la capacidad de las dos poblaciones microbianas (BM y BSR) para mantener la actividad en el mismo reactor presenta primero la ventaja del ahorro de espacio, en lugar de tener dos reactores uno sulfato-reductor y otro metanogénico. Segundo, la posibilidad de acoplar los sistemas de tratamiento de aguas y de gases en una misma industria, como puede ser, enriqueciendo el influente del reactor UASB, con los sulfatos provenientes del efluente de un biolavador, que trata los contaminantes gaseosos azufrados. De esta manera se puede aumentar la capacidad de degradación de los compuestos recalcitrantes en la planta de tratamiento de aguas residuales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Afring, R.P. and Taylor, B.F. (1981). Aerobic and anaerobic catabolism of phthalic acid by a nitrate-respiring bacterium. *Arch. Microbiol.*, **130**:101-104.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press. 177- 178.
- Alphenaar, A. (1994). *Anaerobic granular sludge: characterization, and factors affecting its functioning*. Doctoral thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R. and Wolfe R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology Review* 3(2):260-296.
- Battersby, N.S. and Wilson, V. (1989). Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(2):433-439.
- Bemis A.G., Dindorf J.A., Horwood B., Samans C. and Amoco Chemicals Co. (1982). Phthalic acids and other benzenepolycarboxylic acids in: *ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY*. Edited by Kirk-Othmer. Third edition Vol. 17. pp.753.
- Berry, D.F.; Francis, A.J.; and Bollag, J.M. (1987). Microbial metabolism of homocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. rev.*, **51**(1):43-59.
- Evans, W.Ch. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature*, **270**(3):17-22.
- Evans, W.Ch. and Fuchs, G. (1988). Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Ann. Rev. Microbiol.*, **42**:289-317.
- Fajardo, C. Guyot J.P., Macarie H. y Monroy O. (1996). Inhibición de la digestión anaerobia por el ácido tereftálico y sus subproductos. en: *IV SEMINARIO-TALLER LATINOAMERICANO SOBRE TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES*, 19-22 DE Noviembre de 1996, Bucaramanga, Colombia. pp: 116-124.
- Fuchs G., Mohamed M.E.S., Altenschmidt U., Koch J., Lack A., Brackmann R., Lochmeyer Ch. and Oswald B. (1994). Biochemistry of anaerobic degradation of aromatic compounds Chapter 16 in: *Biochemistry of microbial degradation*. Edited by Colin Ratledge. Kluwer Academic Publishers. pp: 513-553.
- Gibson, G.R. (1990). Physiology and ecology of the ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**:769-797.
- Gößner A., Daniel S.L., and Drake H.L. (1994). Acetogenesis coupled to the oxidation of aromatic aldehyde groups. *Arch. Microbiol.*, **161**:126-131.
- Guiot, S.R.; Pauss, A. and Costerton, J.W. (1991). A structured model of the anaerobic granule consortium. Sixth International Symposium on Anaerobic Digestion, São Paulo, Brazil. 12-16 May. p 1-10.
- Hägglblom M. M., Rivera M. D., and Young L.Y. (1993). Influence of alternative electron acceptor on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(4):1162-1167.
- Hägglblom M. M., and Young L.Y. (1995). Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate-reducing consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(4): 15546-15550.

- Harada, H.; Endo, G.; Tohya, Y.; Momonoi, K. (1988). High rate performance and its related characteristics of granulated sludges in UASB reactors treating various wastewater. In: Proceedings of the fifth international symposium on anaerobic digestion. Edited by A. Tilche and A. Rozzi. Monduzzi Editore, Bologna, Italy, 22-26 May. pp.1011-1020.
- Harada, H.; Uemura, S. and Momonoi, K. (1994). Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Wat.Res.* **28**(2):355-367.
- Healy, J.B. and Young, L.Y. (1979). Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**(1)84-89.
- Hilton, M.G. and Archer, D.B. (1987). Anaerobic Digestion of Sulfate-Rich Molasses Wastewater: Inhibition of Hydrogen Sulfide Production. *Biotech. and Bioeng.* **31**: 885-888.
- Holliger, C.; Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. (1988). Anaerobic degradation of recalcitrant compounds. in: Anaerobic digestion 1988, Proceeding of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion held in Bologna, Italy, 22-26 May, 1988. Editors Hall, E.R. and Hobson, P.N. Pergamon press. 211-224.
- Karegoudar, T.B. and Pujar, B.G. (1985). Degradation of terephthalic acid by a *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**:217-220.
- Karhadkar P.P.; Audic, J.M.; Faup, G.M. and Khanna, P. (1987). Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Wat.Res.* **21**(9):1061-1066.
- Koster, I.W.; Rinzema, A.; de Vegt, A.L. and Lettinga, G. (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. *Wat.Res.* **20**(12):1561-1567.
- Leisinger, T. (1986). Poorly degradable substances, in: Biotechnology, Vol. 8. Edited by H.J. Rehm and G. Reed. Federal Republic of Germany. 477-513.
- Lettinga G, and Pol L.W.H. (1995). Basic aspects of anaerobic wastewater treatment technology. Cap.2.in.: Curso-taller internacional sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales. Universidad del Valle. Cali, Colombia. 7-17.
- Lixian S. Mei L., Jianming and Zhongmin L. (1991). A study on the biodegradation pathway of terephthalic acid in anaerobic reactor. Sixth International Symposium on Anaerobic Digestion, São Paulo, Brazil. 12-16 May.
- Lovley, A. and Klug, J.M. (1983). Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(1):187-192.
- Lovley, D. R.; Coates, J.D.; Woodward, J.C. and Phillips, E.J.P. (1995). Benzene oxidation coupled to sulfate-reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(3):953-958.
- Macarie, H. et Oscar Monroy (1996). Le traitement des effluents de certaines industries chimiques et petrochimiques, un marche potentiel pour la digestion anaerobie. Journées Industrielles sur la Digestion Anaerobie, Narbonne, 18-19 juin.
- Macarie H., Noyola A., Guyot J.P. and Monroy O. (1995). Anaerobic treatment of petrochemical waste: the case of terephthalic acid wastewater. In: Proc. 2nd. Int. Minisymposium on removal of contaminants from water and soil. Ilangovan and Durán de Bazúa C. (eds.), Instituto de Ingeniería, UNAM, november 17 1995, pp. 35-51.

- MacCartney, D.M.; and Oeleskiewicz, J.A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Wat.Res.* **25**(2):203-209.
- Noyola A. (1994). Diseño, inoculación y arranque de reactores UASB. En : III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales" Montevideo-Uruguay. 133-143.
- Oremland, R.S.(1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. in: Biology of anaerobic microorganisms. Edited by Alexander J.B. Zehnder. John Wiley and Sons, inc. publications.641-687.
- Pfenning N., Widdel F. and Trüper H.G.(1992). The Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria, Chapter 74. In: The Prokaryotes. Vol. IV. Second Edition. Edited by: Albert Balows, Hans G. Trüper, Martin Dworkin, Wim Harder and Karl-Heinz Schleifer. Springer-Verlag New York. p: 926-940.
- Ramírez, F.V. (1992) Degradación anaerobia de acetamida. tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. 4-14.
- Rinzema A. and Lettinga G. (1988) Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. In: Bioenvironmental Systems. Edited by Wise D.L.. CRC press, Boca Raton, Florida. p 65-102.
- Schink, B.(1986). Environmental aspects of the degradation potencial of anaerobic bacteria, in: Biology of anaerobic bacteria, edited by H.C. Dubourguier. Elsevier Science Publisher. The Netherlands. 2-15.
- Schmidt, J.E. and Ahring, B.K. (1996). Granular sludge formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. *Biotech. and Bioeng.* **49**: 229-246.
- Shelton, D.R.; Boyd, S.A. and Tledje, J.M.(1984). Anaerobic biodegradation of acid esters in sludge. *Environ.Sci.Technol.* **18**:93-97.
- Sivamurthy, K. and Pujar, B.(1989). Bacterial degradation of dimethylterephthalate. *J.Ferm.Bioeng.* **68**(5):375-377.
- Sleat, R. and Robinson, J.P.(1984). The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds. *J.Appl.Bacteriol.*, **57**:381-394.
- Standard Methods for examination of water and wastewater (1985). sixteenth edition, APHA, AWWA, WPCF.
- Todini O and Hulshoff Pol L (1992). Anaerobic degradation of benzaldehyde in methanogenic granular sludge: the influence of additional substrates. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **38**:417-420.
- Viñas, M. (1994). Criterios de diseño y escalado de reactores anaerobios. dentro de: Tratamiento anaerobio, III Taller y seminario latinoamericano "tratamiento anaerobio de aguas residuales". Editores. María Viñas, Liliana Borzacconi, Matilde Soubes y Lucía Muxi. Montevideo,Uruguay. 111-122.
- Visser, A.^a(1995). Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Cap11. in: Curso-taller internacional sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales. Universidad del Valle. Cali, Colombia. 178-192.
- Visser, A.^b(1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater, Doctoral thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Widdel F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Biology of anaerobic microorganism. Edited by Zehnder A.J.B. John Wiley and Sons, New York. 469-585.

- Winfrey, M.R. and Ward, D.M. (1983). Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(1)193-199.
- Yadav, V. K. and Archer, D. B. (1989). Sodium molybdate inhibits sulphate reduction in the anaerobic treatment of high-sulphate molasses wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:103-106.
- Yoda, M.; Kitagawa, M. and Miyaji, Y. (1987). Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Wat. Res.* **21**(12):1547-1556.
- Zehnder, A.J.B. and Stumm, W. (1988). Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. in: *Biology of anaerobic microorganisms*. Edited by Zehnder. John Wiley and Sons, Inc. publication. USA. 24-36
- Zellner G., Messner P., Kneifel H. and Winter J. (1989). *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester. *Arch. Microbiol.* **152**:329-334.
- Zellner G., Kneifel H. and Winter J. (1990). Oxidation of benzaldehydes to benzoic acid derivatives by three *Desulfovibrio* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(7): 2228-2233.