

**CARACTERIZACIÓN DE *Thiobacillus denitrificans* Y ADAPTACIÓN SOBRE  
GUADUA PARA DISMINUIR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO  
SULFHÍDRICO DEL REACTOR ANAEROBIO DE FLUJO A PISTÓN (RAP)  
DE LA UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA**

**LYDA MILENA DURAN SÁNCHEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2005**

**CARACTERIZACIÓN DE *Thiobacillus denitrificans* Y ADAPTACIÓN SOBRE  
GUADUA PARA DISMINUIR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO  
SULFHÍDRICO DEL REACTOR ANAEROBIO DE FLUJO A PISTÓN (RAP)  
DE LA UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA**

**LYDA MILENA DURAN SÁNCHEZ**

**Proyecto de Grado para optar al título de Bióloga**

**Directora  
Mariela Carreño de Arango  
MSc. En Microbiología Industrial**

**Codirectores**

**HUMBERTO ESCALANTE  
Doctor en Ingeniería Química**

**YOLANDA GAMARRA HERNÁNDEZ  
Esp. Administración y Docencia Universitaria**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2005**

**A Dios,  
Por impulsarme a  
seguir luchando.**

**A mis padres y hermanos,  
Por su amor, apoyo  
y comprensión.**

**A Henry,  
Por su paciencia,  
colaboración y amor.**

**Lyda Milena**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar los más sinceros agradecimientos a la Doctora Mariela Carreño de Arango del Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), por su orientación, dirección, dedicación y apoyo en el desarrollo de éste proyecto de investigación.

A la Doctora Yolanda Gamarra de la Universidad Pontificia de Bucaramanga y al Doctor Humberto Escalante de la Universidad Industrial de Santander por su orientación y apoyo en la codirección de éste proyecto.

A Juan Diego Navarro y a Joao Fernando Barón por ser mis compañeros de proyecto, por su dedicación y constancia en la realización experimental.

A la Universidad Pontificia Bolivariana por el apoyo financiero de esta investigación.

Al Laboratorio de Microbiología del CINBIN que me permitió hacer todos los experimentos necesarios en este proyecto y especialmente al Doctor Jorge Hernández, Mariela Carreño y Mónica Hernández por toda su colaboración y acogida en este centro de investigación.

Al personal del Laboratorio de Aguas Residuales y de Microbiología de la Universidad Pontificia Bolivariana por su colaboración en las mediciones de H<sub>2</sub>S.

A la Doctora Mariela Carreño especialmente por su amistad y confianza brindada incondicionalmente.

A mis compañeros de Laboratorio Ana Bella, Aura, Claudia, Lesly, Andrea, Enrique, Lucio, que me apoyaron en todos los momentos difíciles y sobretodo por brindarme su amistad.

A mis padres y hermanos, quienes lucharon por ayudarme en mi formación profesional, brindándome todo el amor y apoyo necesario.

A Henry, por ser mi refugio en momentos de desesperación y estar a mi lado para culminar con éxito esta investigación. Por su ternura, amor y comprensión.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
2. <b>MARCO TEORICO</b> .....	3
2.1 <b>FUENTES DE AGUAS RESIDUALES</b> .....	3
2.2 <b>CARACTERÍSTICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMESTICAS</b> .....	3
2.3 <b>FUENTES DE GENERACIÓN DE OLOR</b> .....	4
2.4 <b>GENERACIÓN DE ÁCIDO SULFÚDRICO (H<sub>2</sub>S)</b> .....	5
2.5 <b>EFFECTOS ADVERSOS PARA LA SALUD POR EXPOSICIÓN A H<sub>2</sub>S</b> .....	7
2.6 <b>DEFINICIÓN DE BIOFILTRO</b> .....	8
2.7 <b>CRECIMIENTO BACTERIANO</b> .....	9
2.7.1 Curva de crecimiento.....	9
2.8 <b>BACTERIAS DEL GÉNERO <i>Thiobacillus</i></b> .....	11
2.8.1 <i>Thiobacillus denitrificans</i> .....	12
2.9 <b>IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS</b> ..	13
2.9.1 Prueba de Nitratos.....	14
2.9.2 Prueba de Azúcares.....	14
2.9.3 Prueba de Citrato.....	14
2.9.4 Prueba de Motilidad.....	15
2.10 <b>TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL DENTRO DE LA PTAR UPB</b> .....	16

3.	<b>ANTECEDENTES.....</b>	19
4.	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	24
4.1	<b>MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SULFUROS TOTALES EN EL EFLUENTE DEL RAP.....</b>	25
4.2	<b>CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL AGUA RESIDUAL DEL RAP DE LA UPB.....</b>	27
4.3	<b>AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Thiobacillus denitrificans</i>.....</b>	28
4.4	<b>ENSAYOS PRELIMINARES PARA LA ADECUACIÓN DE <i>T. denitrificans</i> A LAS CONDICIONES DEL EFLUENTE DEL RAP.....</b>	30
4.4.1	Curva de crecimiento de <i>Thiobacillus denitrificans</i> en medio selectivo.....	30
4.4.2	Curva de crecimiento de <i>Thiobacillus denitrificans</i> en solución de sulfuro.....	31
4.4.3	Determinación de porcentajes de remoción de sulfuros totales por parte de <i>T. denitrificans</i> en solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm.....	33
4.4.4	Incidencia del flujo de solución de sulfuro a una concentración de 50 ppm, sobre el comportamiento del crecimiento de <i>T. denitrificans</i> en la fase de crecimiento estacionaria.....	34
4.5	<b>ADAPTACIÓN, CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE SULFUROS TOTALES DE <i>T. denitrificans</i> EN AGUA RESIDUAL EFLUENTE DEL RAP.....</b>	34
4.5.1	Adaptación de <i>T. denitrificans</i> al agua residual efluente del RAP.....	34
4.5.2	Remoción de sulfuros totales por parte de <i>T. denitrificans</i> en agua residual efluente del RAP.....	35

4.6	<b>ADAPTACIÓN, CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE SULFUROS TOTALES DE <i>T. denitrificans</i> EN AGUA RESIDUAL EFLUENTE DEL RAP COMO SUSTRATO Y GUADUA COMO MEDIO DE SOPORTE.....</b>	36
4.6.1	Formación de biopelícula de <i>T. denitrificans</i> sobre guadua como medio de soporte.....	36
4.6.2	Remoción de sulfuros totales por parte de <i>T. denitrificans</i> en el efluente del RAP utilizando guadua como medio de soporte.....	37
5.	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	39
5.1	<b>MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SULFUROS TOTALES EN EL EFLUENTE DEL RAP.....</b>	39
5.2	<b>CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL AGUA RESIDUAL DE LA UPB.....</b>	40
5.3	<b>AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>T. denitrificans</i>.....</b>	41
5.4	<b>ENSAYOS PRELIMINARES PARA LA ADECUACIÓN DE <i>T. denitrificans</i> A LAS CONDICIONES DEL EFLUENTE DEL RAP.....</b>	44
5.4.1	Curva de crecimiento de <i>Thiobacillus denitrificans</i> en medio selectivo.....	44
5.4.2	Curva de crecimiento de <i>Thiobacillus denitrificans</i> en solución de sulfuro.....	44
5.4.3	Determinación de porcentajes de remoción de sulfuros totales por parte de <i>T. denitrificans</i> en solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm.....	47
5.4.4	Incidencia del flujo de solución de sulfuro a una concentración de 50 ppm, sobre el comportamiento del crecimiento de <i>T. denitrificans</i> en la fase de crecimiento estacionaria.....	48
5.5	<b>ADAPTACIÓN, CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE SULFUROS TOTALES DE <i>T. denitrificans</i> EN AGUA RESIDUAL EFLUENTE DEL RAP.....</b>	49

5.5.1	Adaptación de <i>T. denitrificans</i> en agua residual efluente del RAP.....	49
5.5.2	Remoción de sulfuros totales por parte de <i>T. denitrificans</i> en agua residual efluente del RAP.....	52
5.6	<b>ADAPTACIÓN, CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE SULFUROS TOTALES DE <i>T. denitrificans</i> EN AGUA RESIDUAL EFLUENTE DEL RAP COMO SUSTRATO Y GUADUA COMO MEDIO DE SOPORTE.....</b>	54
5.6.1	Formación de biopelícula de <i>T. denitrificans</i> sobre guadua como medio de soporte.....	54
5.6.2	Remoción de sulfuros totales por parte de <i>T. denitrificans</i> en el efluente del RAP utilizando guadua como medio de soporte.....	55
6.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	57
7.	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	59
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	60

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo del desarrollo experimental.....	24
<b>Figura 2.</b> Procedimiento seguido para la preparación de patrones de sulfuro de 1000 ppm.....	27
<b>Figura 3.</b> Montaje experimental para el crecimiento de <i>T. denitrificans</i> en medio selectivo.....	31
<b>Figura 4.</b> Montaje experimental para el crecimiento de <i>T. denitrificans</i> en solución de sulfuro.....	32
<b>Figura 5.</b> Montaje experimental para la determinación de remoción de <i>T. denitrificans</i> en solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm.....	33
<b>Figura 6.</b> Montaje experimental para la remoción de sulfuros totales en agua residual.....	35
<b>Figura 7.</b> Montaje para la adaptación de <i>T. denitrificans</i> al efluente del RAP como sustrato y guadua como soporte.....	36
<b>Figura 8.</b> Montaje experimental para la determinación de remoción de sulfuros totales del efluente del RAP utilizando <i>T. denitrificans</i> sobre guadua como medio de soporte.....	38
<b>Figura 9.</b> Promedio de las concentraciones de sulfuros totales en un día.....	39
<b>Figura 10.</b> Promedio de la concentración de sulfuros totales en una semana.....	40
<b>Figura 11.</b> Cepa de <i>Thiobacillus denitrificans</i> aislada del efluente de la mina Reina Oro.....	42
<b>Figura 12.</b> Morfología microscópica de <i>Thiobacillus denitrificans</i> .....	42
<b>Figura 13.</b> Curva de crecimiento de <i>Thiobacillus denitrificans</i> en medio selectivo.....	44
<b>Figura 14.</b> Curva de crecimiento de <i>Thiobacillus denitrificans</i> en solución de sulfuro.....	45

<b>Figura 15.</b> Cinética de consumo de sulfuros totales.....	46
<b>Figura 16.</b> Determinación de constante cinética.....	46
<b>Figura 17.</b> Concentración residual de sulfuro sintético versus tiempo.....	47
<b>Figura 18.</b> Concentración de sulfuros totales (ppm) versus Unidades formadoras de colonias (UFC).....	49
<b>Figura 19.</b> Adaptación de <i>T. denitrificans</i> a las condiciones del efluente del RAP.....	51
<b>Figura 20.</b> Crecimiento de <i>T. denitrificans</i> a través del tiempo para cada uno de los porcentajes de agua residual del RAP.....	51
<b>Figura 21.</b> Concentración residual de sulfuros totales del efluente del RAP versus tiempo.....	52
<b>Figura 22.</b> Sección de guadua con formación de biopelícula de <i>T.denitrificans</i> .....	54

## LISTA DE TABLAS

	<b>pàg</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición de excrementos y orina humanos.....	4
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de H <sub>2</sub> S y efectos negativos para la salud.....	8
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de diseño del RAP de la Universidad Pontificia Bolivariana.....	17
<b>Tabla 4.</b> Lista de especies encontradas en el efluente del RAP.....	40
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la pruebas bioquímicas para la identificación de <i>T.denitrificans</i> .....	43
<b>Tabla 6.</b> Porcentajes de remoción con tiempo de residencia de 3 horas en medio sintético.....	48
<b>Tabla 7.</b> Recuentos bacterianos en adecuación del inóculo a las condiciones efluente del RAP.....	50
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de remoción con tiempo de residencia de 3 horas en agua residual con <i>T. denitrificans</i> .....	53
<b>Tabla 9.</b> Porcentajes de remoción con tiempo de residencia de 3 horas en agua residual para el control .....	53
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de la formación de biopelícula de <i>T. denitrificans</i> sobre guadua como soporte.....	55
<b>Tabla 11.</b> Porcentajes de remoción de sulfuros totales en el efluente del RAP por parte de <i>T. denitrificans</i> sobre guadua como medio de soporte.....	55

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
<b>Anexo A</b> Medio de cultivo selectivo para <i>Thiobacillus denitrificans</i> .....	65
<b>Anexo B</b> Procedimiento para la prueba de nitratos y nitritos.....	66
<b>Anexo C</b> Procedimiento para la prueba de azúcares.....	67
<b>Anexo D</b> Procedimiento seguido para la prueba de citrato.....	68
<b>Anexo E</b> Procedimiento seguido para la prueba de motilidad.....	69
<b>Anexo F</b> Metodología de Mc Farland para la evaluación de crecimiento bacteriano.....	70
<b>Anexo G</b> Mediciones de la concentración de sulfuros totales en el efluente del RAP durante jornada laboral.....	71

## RESUMEN

**TITULO:** CARACTERIZACIÓN DE *Thiobacillus denitrificans* Y ADAPTACIÓN SOBRE GUADUA PARA DISMINUIR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO DEL REACTOR ANAEROBIO DE FLUJO A PISTÓN (RAP) DE LA UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA\*.

**AUTOR:** DURÁN SÁNCHEZ, LYDA MILENA\*\*

**Palabras claves:** H<sub>2</sub>S, RAP, *Thiobacillus denitrificans*, guadua, medio de soporte, agua residual, biofiltro, TRH.

### DESCRIPCIÓN:

Como alternativa de tratamiento para la remoción de H<sub>2</sub>S, compuesto responsable de un alto impacto oloroso en la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) producto del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de la comunidad universitaria, generado en los Reactores Anaerobios de Flujo a Pistón (RAP), se planteó una metodología basada en el aislamiento e identificación de una cepa de la especie *Thiobacillus denitrificans* obtenida a partir del efluente de la Mina Reina de Oro (Vetas, Santander), para luego ser bioaumentada y adaptada al efluente del RAP como sustrato. Una vez adaptado el inóculo a las condiciones del efluente del RAP, se procedió a dar paso a la formación de biopelícula sobre guadua hasta conseguir un crecimiento apreciable para determinar los porcentajes de remoción de H<sub>2</sub>S en el efluente del RAP (considerando la remoción de sulfuros totales como un indicador de la remoción de H<sub>2</sub>S).

A escala de laboratorio, la biopelícula de *T. denitrificans* sobre guadua ha arrojado excelentes resultados en la remoción de sulfuros totales en fase líquida, proporcionando eficiencias mayores al 99% con 3 horas como tiempo de retención hidráulico (TRH). Con base en estos resultados se diseñará un biofiltro para el tratamiento de H<sub>2</sub>S en la UPB usando *Thiobacillus denitrificans* soportados en guadua.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, UIS, Directora: Mariela Carreño Mcs

## SUMMARY

**TITLE:** *Thiobacillus denitrificans*' CHARACTERIZATION AND ADAPTATION ON GUADUA BAMBOO TO DECREASE CONCENTRATION OF HYDROGEN SULFIDE FROM THE PISTON FLOW ANAEROBIC REACTOR (RAP) AT UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA.\*

**AUTHOR:** DURÁN SÁNCHEZ, LYDA MILENA\*\*

**Keywords:** H<sub>2</sub>S, RAP, *Thiobacillus denitrificans*, *Guadua bamboo*, packing material, wastewater, bio-films, HRT.

### DESCRIPTION:

As an alternative of treatment for removal of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S), compound responsible of a high odor impact at Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), the anaerobic treatment procedure from the sewages of university community, emanated from the Piston Flow Anaerobic Reactors (RAP) was put into action as a methodology based on the isolation and identification of a pure strain of *Thiobacillus denitrificans* species, which was isolated from Gold Queen Mine (Vetas, Santander). Then, it was bioincrease and adjusted to RAP's wastewater as substratum. Once the inocule was adjusted to the RAP, it was proceeded to make form of the biofilm on *Guadua bamboo* to get a measurable growing to determine the percentages of removal of H<sub>2</sub>S from the RAP (it was considered the removal of sulfide as a mark of the H<sub>2</sub>S removal) .

At a laboratory scale, bio-films of *Thiobacillus denitrificans* on Guadua Bamboo have shown excellent removal results of total sulfide reduction in liquid phase, providing greater efficiencies of more than 99% per 3 hours as hydraulic retention time (HRT). Based on these results, it might be designed a biofilm for the treatment of H<sub>2</sub>S at the UPB using *T.denitrificans* on *Guadua bamboo* packing material.

---

\* Thesis Project.

\*\* Science Faculty, Biology School, UIS, Mariela Carreño Mcs. Director

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la comunidad de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) seccional Bucaramanga, se ve afectada por la producción de olores ofensivos, producto de la degradación anaerobia de la materia orgánica contenida en agua residual dentro de los Reactores Anaerobios de Flujo a Pistón (RAP).

El tratamiento anaerobio de efluentes contaminados que contienen compuestos azufrados conlleva a la formación de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ), compuesto responsable del alto impacto oloroso, así como de repercusiones en la salud y corrosión de sistemas de alcantarillado. Se consideran indeseables concentraciones mayores a 1 mg/L en agua residual y mayores a 3 ppm en la atmósfera.

Para el tratamiento de  $H_2S$ , con el tiempo ha venido ganando importancia el uso de biofiltros, en donde el efluente contaminado se pone en contacto con un complejo microbiano presente en un medio de soporte, en donde se lleva a cabo una transformación bioquímica de los contaminantes. Las especies del género *Thiobacillus* han sido ampliamente utilizadas para el tratamiento de efluentes con alto contenido de  $H_2S$  dando lugar a la formación de azufre elemental y sulfatos, entre otros.

Como tratamiento del  $H_2S$  producido en el RAP de la UPB, se planteó una metodología basada en el aislamiento e identificación de una cepa de la especie *Thiobacillus denitrificans* obtenida a partir del efluente de la Mina Reina de Oro (Vetas, Santander), para luego ser bioaumentada y adaptada al efluente del RAP como sustrato. Una vez adaptado el inóculo a las condiciones del efluente del RAP, se procedió a dar paso a la formación de biopelícula sobre guadua hasta conseguir un crecimiento apreciable para determinar los porcentajes de remoción de  $H_2S$  en el efluente del RAP (considerando la remoción de sulfuros totales como un indicador de la remoción de  $H_2S$ ).

Los resultados a nivel de laboratorio muestran remociones de H<sub>2</sub>S en fase líquida superiores al 99%, con tiempos de residencia de entre 1 y 3 horas. Con base en estos resultados se diseñará un biofiltro para el tratamiento de H<sub>2</sub>S en la UPB usando *Thiobacillus denitrificans* soportados en guadua.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1 FUENTES DE AGUAS RESIDUALES**

Aguas residuales son fundamentalmente las aguas de abastecimiento de una población, después de haber sido impurificadas por diversos usos. Desde el punto de vista de su origen, resultan de la combinación de los líquidos o desechos arrastrados por el agua, procedentes de las residencias, edificios comerciales e instituciones, junto con los provenientes de los establecimientos industriales, y las aguas subterráneas, superficiales o de precipitación que puedan agregarse<sup>1</sup>.

### **2.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES**

Las aguas residuales consisten de agua, de los sólidos disueltos en ella y de los sólidos suspendidos en la misma. La cantidad de sólidos es generalmente muy pequeña, casi siempre menos de 0,1 por ciento en peso, pero es la fracción que presenta el mayor problema para su tratamiento y disposición adecuada. El agua provee solamente el volumen y es el vehículo para el transporte de los sólidos<sup>2</sup>. En la tabla 1, se muestra la composición típica de excrementos y de orina humanos en agua residuales domesticas.

---

<sup>1</sup> DEPARTAMENTO DE SANIDAD DEL ESTADO DE NUEVA YORK. Manual de tratamiento de aguas negras. México: Limusa Noriega, 1998. p. 15.

<sup>2</sup> Ibid., p. 17.

**Tabla 1.** Composición de excrementos y orina humanos

<i>Característica</i>	<b>Materia Fecal</b>	<b>Orina</b>
Cantidad (húmeda) por persona por día.	135 – 270 g	1 – 1,3 kg
Cantidad (seca) por persona por día.	35 – 70 g	50 – 70 g
Humedad, %	66 – 80	93 – 96
Materia Orgánica, %	88 – 97	65 – 85
Nitrógeno, %	5,0 – 7,0	15 – 19
Fósforo (como P <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), %	3,0 – 5,4	2,5 – 5,0
Potasio (como K <sub>2</sub> O), %	1,0 – 2,5	3,0 – 4,5
<b>Carbón, %</b>	44 – 55	11 – 17
Calcio (como CaO), %	4,5	4,5 – 6,0

**Fuente:** ROMERO ROJAS, Jairo. Tratamiento de Aguas Residuales: Teoría y principios de diseño. Santa Fe de Bogotá: Escuela Colombiana de Ingeniería, 1999. p.28

### 2.3 FUENTES DE GENERACIÓN DE OLOR

Olor es la impresión producida en el olfato por las materias volátiles contenidas en el agua; las causas de olor, se agrupan en dos grandes tipos: naturales y originadas por el hombre. En el primer tipo se incluyen algas, hojas, pasto, vegetación en descomposición, limo orgánico (lodo con alto contenido de organismos), materia orgánica y minerales; en la segunda, se agrupan aquellas derivadas de las aguas residuales y residuos industriales. En la transformación anaerobia de la materia orgánica se forman una serie de productos, muchos de los cuales son volátiles y de olores desagradables: ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), metano (CH<sub>4</sub>), amoníaco (NH<sub>3</sub>), anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>), entre otros<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> UNDA OPAZO, Francisco. Ingeniería Sanitaria Aplicada a Saneamiento en Salud Pública. México: Limusa S.A, 1993; p. 94, 128,188-192, 270,271.

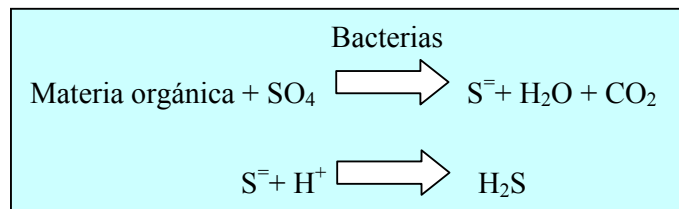
La mayoría de los constituyentes responsables de los malos olores en las PTAR's son compuestos que contiene azufre; entre ellos el sulfuro de hidrógeno es el que tiene mayor impacto oloroso debido a su bajo punto de ebullición (0.62 grados centígrados)<sup>4</sup>.

## 2.4 GENERACIÓN DE ÁCIDO SULFHÍDRICO (H<sub>2</sub>S)

El ácido sulfhídrico es un producto de la descomposición anaerobia de la materia orgánica que contiene azufre presente en las aguas residuales<sup>5</sup>.

En el desdoblamiento de las proteínas se liberan pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>S además de amoniaco. Este ácido procede principalmente de los aminoácidos sulfurados cistina (o cisteína) y metionina<sup>6</sup>.

También se produce ácido sulfhídrico debido a la reducción anaerobia de los sulfatos por la acción microbiana:



La cantidad de sulfatos en las aguas residuales es un factor importante para determinar la magnitud de los problemas que pueden derivarse de la reducción de sulfatos a ácido sulfhídrico. En la digestión anaeróbica de lodos y residuos industriales, los sulfatos son reducidos a ácido sulfhídrico, que es emitido junto con metano y dióxido de carbono.

<sup>4</sup> BALDASANO, Juan. Control de olores debidos a la formación de H<sub>2</sub>S en las EDARs. En: Tecnología del agua. España: Numero 217, 2001 ; p.22-24.

<sup>5</sup> MANNAN, Stanley. Environmental Chemistry. USA: Lewis Publishers., 2000 ; p. 197.

<sup>6</sup> RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las aguas. España: ACRIBIA S.A., 1987 ; p. 200-201.

En ausencia de oxígeno disuelto y nitratos, los sulfatos sirven como aceptores finales de electrones para la oxidación bioquímica producida por bacterias anaerobias. Bajo condiciones anaerobias, el ión sulfato es reducido al ión sulfuro, el cual establece un equilibrio con el ión hidrógeno para formar ácido sulfhídrico de acuerdo con su constante primaria de ionización  $K_1$   $9.1 \times 10^{-8}$ . A valores de pH de 8 y mayores predominan los iones  $HS^-$  y  $S^{2-}$  y la cantidad de  $H_2S$  libre es tan pequeña que su presión parcial es insignificante y los problemas de olor no ocurren. A valores de pH inferiores a 8, el equilibrio cambia rápidamente hacia la formación de  $H_2S$  no ionizado y es un 80% completa a pH de 7. Bajo tales condiciones la presión parcial de ácido sulfhídrico se vuelve lo suficientemente grande para causar serios problemas de olor siempre y cuando la reducción de sulfato produzca una cantidad significativa de ión sulfuro<sup>7</sup>.

El ión sulfuro tiene una gran afinidad por muchos metales pesados y la precipitación de sulfuros metálicos con frecuencia acompañan a la producción de  $H_2S$ <sup>8</sup>.

La formación de  $H_2S$  en las PTAR's es debida a varios factores, entre los que se destacan las condiciones de operación anóxicas y un potencial Redox muy bajo (inferior a  $-50$  mV) en los tratamientos del agua residual; estos factores unidos a un alto contenido de materia orgánica soluble del agua residual y un pH ácido (menor a 6), favorecen la formación de ácido sulfhídrico<sup>9</sup>.

Adicionalmente, la industria petroquímica, fábricas de papel, fábricas de textiles, curtiembres y el tratamiento de combustibles pueden también contener  $H_2S$  dentro de sus procesos<sup>10</sup>.

---

<sup>7</sup> SAWYER, Clair y Mc CARTY, Perry. Chemistry for Environmental Engineering. USA: Mc Graw – Hill., 1978; p. 476-481.

<sup>8</sup> MANNAN, Op cit., p. 197.

<sup>9</sup> BALDASANO, Op. cit., p.26.

<sup>10</sup> CHUNG, Yin *et al.* Comparison of Autotrophic and Mixotrophic Biofilters for  $H_2S$  Removal. [En línea] Versión en HTML. Journal of Environmental Engineering. USA, 1998. Disponible en Internet: <http://search.epnet.com/direct.asp?an=412163&db=ath>

La corrosión en las redes del alcantarillado y de las plantas de tratamiento está, a menudo, relacionada con la producción de  $H_2S$ . Al exponer el agua residual a la atmósfera se desprende  $H_2S$  y se detecta un claro olor ofensivo a huevo podrido. Cuando el gas se acumula en la corona de las alcantarillas, éste puede disolverse en la humedad condensada sobre las paredes del tubo y oxidarse biológicamente en  $H_2SO_4$ , para corroer las tuberías de concreto. El  $H_2S$  mezclado con  $CH_4$  y  $CO_2$  es corrosivo, tóxico al sistema respiratorio, incoloro e inflamable y explosivo en ciertas condiciones. Se consideran indeseables concentraciones de  $H_2S$ , en aguas residuales, mayores de 1 mg/L, así como concentraciones en la atmósfera superiores a 3 ppm<sup>11</sup>.

Este gas se detecta por el olfato humano a concentraciones muy bajas (0.0005 ppm en el aire), percibiéndose un fuerte olor a huevos podridos; además de esto, dicho compuesto presenta toxicidad (el valor límite de exposición a 10 ppm es de tan solo 10 minutos)<sup>12</sup>.

## **2.5 EFECTOS ADVERSOS PARA LA SALUD POR EXPOSICIÓN A $H_2S$**

El principal peligro que origina el ácido sulfhídrico es el de muerte por inhalación; cuando la cantidad de gas absorbido por la corriente sanguínea excede a la fácil oxidación, se provoca el envenenamiento del cuerpo, con una acción general sobre el sistema nervioso, rápidamente se produce una dificultad respiratoria, con concentraciones de 700 ppm y superiores a esta. Esta condición puede alcanzarse, casi sin advertirlo, ya que el olor del ácido sulfhídrico que originalmente se detectó, puede desaparecer debido a la parálisis del sentido del olfato. Entonces se produce la muerte por asfixia a menos que la persona expuesta sea llevada inmediatamente a un lugar fresco y se le estimule la respiración a través de respiración artificial.

---

<sup>11</sup> ROMERO, Jairo. Tratamiento de Aguas Residuales: Teoría y principios de diseño. Santa Fé de Bogotá: Escuela Colombiana de Ingeniería., 1999. p. 28,29.

<sup>12</sup> HUMBERT, Francisco *et al.* Nitrato cálcico para la eliminación de olores en la depuradora de Lloret de Mar. En: Tecnología del agua. España. Numero 225; 2002 ; p. 44-49.

Otros niveles de exposición más bajos pueden ocasionar los siguientes síntomas de manera individual o en combinaciones: dolor de cabeza, mareo, agitación, náusea o problemas gastrointestinales, sequedad y sensación de dolor en la nariz, garganta y pecho, tos y somnolencia<sup>13</sup>. En la tabla 2, se muestran los efectos negativos para la salud a diferentes concentraciones.

**Tabla 2.** Concentraciones de H<sub>2</sub>S y efectos negativos para la salud.

Concentración, mg/m <sup>3</sup> (a 0 °C y 760 mm Hg.)	Efectos
0.14	<b>Olor detectable.</b>
4.2	Olor desagradable, olor a huevos podridos.
14	Dolor de cabeza, náuseas, irritación de los ojos y la garganta.
70	<b>Lesiones oculares</b>
140	Perdida del sentido del olfato, conjuntivitis, irritación del tracto respiratorio.
420	Inminente peligro de muerte, edema pulmonar.
700	Fuerte estimulación del sistema nervioso, apnea. Colapso respiratorio inmediato con parálisis y muerte.
1400 a 2800	Colapso respiratorio inmediato con parálisis y muerte.

**Fuente:** ANDRADES BALAO, José et al. Compuestos de azufre en los sistemas de saneamiento. *En:* Tecnología del Agua, No. 193 (Oct de 1999); p.74.

## 2.6 DEFINICIÓN DE BIOFILTRO.

La palabra filtro sugiere una malla física que remueve partículas del agua residual. Los biofiltros son un ambiente controlado donde los olores y solventes son puestos en contacto con microorganismos que los usan como fuente de alimento. El fundamento del proceso consiste en pasar el contaminante a través de un medio de soporte, el cual

<sup>13</sup> AGUIRRE, Enrique. Efectos físicos del envenenamiento por ácido sulfhídrico. Argentina: 2001; Base de Datos En Línea. Disponible en Internet. *En:* <http://www.estrucplan.com.ar/Articulos/sulfhidrico.asp>

puede ser de origen orgánico o sintético, donde los microorganismos capturan los contaminantes y son metabolizados<sup>14</sup>.

En los últimos años, la biofiltración se ha desarrollado efectivamente para el control de olores incluyendo emisiones de H<sub>2</sub>S en corrientes de gases residuales diluidas. A pesar de que la biofiltración ha demostrado ser una tecnología eficiente, práctica y simple para el control de olores, los parámetros de diseño y operación, como también los procesos microbiológicos que requiere no están muy bien definidos. Por esta razón muchos biofiltros se diseñan y operan empíricamente. Como resultado, el comportamiento de los sistemas de biofiltración no es predecible y las condiciones de operación pueden no ser las mejores para obtener la eficiencia deseada en el control del olor<sup>15</sup>.

## 2.7 CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento bacteriano es el incremento en el número de células microbianas en una población, el cual también puede ser medido como un incremento en la masa microbiana. Durante este ciclo de división celular, todos los componentes estructurales se duplican<sup>16</sup>.

**2.7.1 Curva de crecimiento.** La curva de crecimiento se divide en varias fases: de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte.

---

<sup>14</sup> GARNER, Loren. Case studies in odor and H<sub>2</sub>S control using biological systems. [En línea]. Versión en PDF. Bio-Reaction Industries. Tualatín, 2002. Disponible en Internet: <http://www.bioreaction.com/papers/papers/70482.pdf>

<sup>15</sup> CHÁVEZ, Carlos *et al.* Biofiltración de ácido sulfhídrico ( H<sub>2</sub>S ) utilizando bagazo de caña de azúcar y piedra pómez como material de soporte. *En* : Ingeniería y Competitividad. No 2(May 2004); p. 7-15.

<sup>16</sup> MADIGAN, Michael; PARKER, Jack y MARTINKO, Jhon. Brock Biología De Los Microorganismos. España: Prentice Hall, 1998; p.168,491-494,500,526,540,638,661-664.

- **Fase de latencia.** Cuando una población microbiana se inocula en medio fresco, no ocurre crecimiento inmediatamente, sino después de cierto tiempo llamado tiempo de latencia, que puede ser más largo o corto dependiendo de muchos factores. Si un cultivo en crecimiento exponencial se inocula exactamente en el mismo medio, no se observa esta fase sino que sigue creciendo exponencialmente. Sin embargo, si el inóculo se toma a partir de un cultivo viejo, entonces tiene lugar una fase de adaptación, porque las células carecen de determinados componentes esenciales y tiene que transcurrir un cierto tiempo para que se proceda a su síntesis<sup>17</sup>.

- **Fase exponencial.** Es el incremento de la población en el que el número de células se dobla cada cierto período de tiempo. La mayoría de microorganismos crecen exponencialmente, pero las velocidades de crecimiento exponencial pueden variar esencialmente. Tal velocidad es influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo), así como por las características genéticas del microorganismo en cuestión<sup>18</sup>.

- **Fase estacionaria.** En esta fase no hay incremento neto (o decremento) del número de células. Lo que habitualmente sucede es que, o bien un nutriente esencial del medio de cultivo se acaba, o algún producto de desecho se acumula en el medio hasta alcanzar concentraciones inhibitorias del crecimiento exponencial. Sin embargo, aunque en fase no tiene lugar crecimiento, todavía ocurren muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos<sup>19</sup>.

---

<sup>17</sup> Ibid., p.152.

<sup>18</sup> Ibid., p. 153.

<sup>19</sup> Ibid., p. 154,155.

## 2.8 BACTERIAS DEL GÉNERO *Thiobacillus*

El género *Thiobacillus* comprende bacilos Gram negativos pequeños ( $\sim 0.5 \times 1.0-4.0 \mu\text{m}$ ) con flagelación polar que pueden obtener energía de la oxidación de azufre elemental, sulfuros y tiosulfato; su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra entre los  $50-60^\circ \text{C}$ .<sup>20</sup> Todas las especies pueden fijar dióxido de carbono por medio del Ciclo de Calvin y son capaces de crecer autotróficamente; algunas especies son quimiolitotróficas obligadas, mientras otras son capaces de crecer quimiorganotróficamente<sup>21</sup>. Los compuestos azufrados más comunes que se usan como fuente de energía son el ácido sulfhídrico, el azufre elemental y el tiosulfato. En la mayor parte de los casos el producto final de la oxidación es el sulfato, y el número total de electrones implicados desde el  $\text{H}_2\text{S}$  (estado de oxidación -2) al sulfato (estado de oxidación +6) es de 8. La oxidación del compuesto más reducido,  $\text{H}_2\text{S}$ , ocurre en fases, y el primer paso de oxidación origina la formación de azufre elemental. Algunas bacterias oxidantes del  $\text{H}_2\text{S}$ , depositan dentro de la célula el azufre elemental que se forma. El azufre depositado como resultado de la oxidación inicial es una reserva de energía, y cuando el suministro de  $\text{H}_2\text{S}$  se agota, se puede obtener energía adicional del azufre a sulfato<sup>22</sup>.

Las especies del género *Thiobacillus* son las más importantes para oxidar el azufre en las aguas. Su difusión es muy amplia y por eso puede comprobarse su presencia en la mayoría de los ríos, lagos y aguas costeras. Se multiplican bajo condiciones apropiadas donde quiera que se produzca  $\text{H}_2\text{S}$ . Por eso en los lagos eutróficos suele haber una capa limitante muy neta entre la masa de agua que contiene  $\text{H}_2\text{S}$  y la portadora de  $\text{O}_2$ . Esta capa limitante es el emplazamiento principal de los *Thiobacillus* aerobios sobre todo

---

<sup>20</sup> Ibid., p. 691.

<sup>21</sup> JAMES, S et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkins, 2000. v.3, p.1852-1853.

<sup>22</sup> MADIGAN, Op. cit., p.691

cuando se encuentra en la zona afótica; en cambio si radica en la eufótica, los microorganismos que la pueblan son principalmente las sulfobacterias púrpuras y /o las clorobacterias, en cuyo caso los *Thiobacillus* solo pueden tener un papel subordinado en ella; estos microorganismos provocan fluctuaciones diarias en la concentración de H<sub>2</sub>S<sup>23</sup>.

Sin embargo, estos organismos no pueden realizar la reducción asimilatoria de nitrato y necesita amonio como fuente de nitrógeno. En las operaciones de lixiviado a cielo abierto, la luz puede ejercer un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de algunas especies de *Thiobacillus*, cuya máxima inhibición ocurre a longitudes de ondas cortas<sup>24</sup>

La presencia de microorganismos es necesaria para una efectiva remoción de H<sub>2</sub>S. Cultivos mixtos de microorganismos han sido usados en la operación de biofiltros y son requeridas de 1 a 3 semanas como tiempo de aclimatación. Recientemente, el uso de cultivos puros está ganando gran atención debido a que requieren menos tiempo de arranque y se obtienen mayores eficiencias en remoción. Algunas bacterias autótrofas como los miembros de las especies del género *Thiobacillus* han sido empleadas dentro de bioreactores y han sido usadas para metabolizar H<sub>2</sub>S. Los productos de la oxidación de H<sub>2</sub>S, dependen de la especie de *Thiobacillus* empleada<sup>25</sup>

**2.8.1 *Thiobacillus denitrificans*** es un microorganismo aerobio facultativo. Morfológicamente son bacilos cortos (0.5 X 1.0-3.0 μm), pueden ser móviles por medio de un flagelo polar. Sus colonias son clareas o poco opalescentes. El rango óptimo de pH es de 6 a 8, y su temperatura óptima de 28-32° C para el crecimiento. Se encuentra en el suelo, barro, agua dulce y sedimentos marinos, especialmente en condiciones anóxicas<sup>26</sup>

---

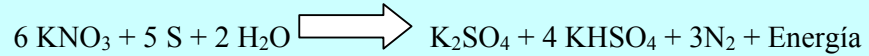
<sup>23</sup> RHEINHEIMER, Op. cit., p. 229

<sup>24</sup> BARTHA, Richard y ATLAS, Ronald. Ecología microbiana y Microbiología Ambiental. España: Addison Wesley, 1998;p .420,425,445,601.

<sup>25</sup> CHUNG, Op. cit., p. 367.

<sup>26</sup> JAMES, S et al, Op cit., p 1855.

Este microorganismo puede obtener energía por oxidación anaerobia de azufre o compuestos azufrados con nitrato como agente oxidante. El nitrato no puede ser sustituido por otros componentes.



En la reacción química, el nitrato es reducido a nitrógeno gaseoso, el proceso se conoce como desnitrificación<sup>27</sup>.

Su importancia reside en que pueden oxidar también el azufre en el medio anaerobio en la zona afótica en presencia de nitratos. Como el hidrógeno sulfurado se oxida químicamente con gran rapidez cuando esta presente el oxígeno, solo puede acumularse en los medios anaerobios<sup>28</sup>

## 2.9 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS

La identificación bacteriana se realiza tras el estudio de las características tintorales, morfológicas y bioquímicas de los microorganismos. La identificación bioquímica se basa en la habilidad de las bacterias de producir enzimas fácilmente detectables, en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, etc.

Las pruebas bioquímicas evalúan la capacidad metabólica de un microorganismo relacionado con:

- Los sustratos que pueda utilizar la bacteria para crecer (DNA, hidratos de carbono, aminoácidos).

---

<sup>27</sup> BURROWS, William. Textbook of Microbiology. USA: Saunders company, 1959; p. 166, 167.

<sup>28</sup> RHEINHEIMER, Op. cit., p. 229.

- Las enzimas que posee la bacteria (ureasas, peroxidasas, descarboxilasas).
- Productos metabólicos producidos por las bacterias (ácido fórmico, succínico, butírico, etc.)
- La capacidad de reducir ciertos iones (ferroso o férrico).
- La presencia o ausencia de estructuras propias como flagelos (motilidad).
- La producción o no de hemolisinas.
- El requerimiento o no de ciertos factores especiales para el crecimiento bacteriano (proteínas séricas).

**2.9.1 Prueba de Nitratos.** La capacidad de un organismo para reducir nitratos a nitritos es una característica importante utilizada para la identificación y diferenciación de especies de muchos grupos de microorganismos. Los organismos que reducen nitratos tienen la capacidad de obtener oxígeno de los nitratos para formar nitritos y otros productos de reducción. La presencia de nitritos en el medio se detecta añadiendo  $\alpha$ -naftilamina y ácido sulfanílico, con la formación de un colorante rojo de diazonio, p-sulfobenceno-azo- $\alpha$ -naftilamina<sup>29</sup>.

**2.9.2 Prueba de Azúcares.** Muchas bacterias, utilizan hidratos de carbono mediante lo que se llama una “fermentación ácida mixta”, en la cual se produce finalmente una variedad de ácidos orgánicos que derivan del ácido pirúvico. Las bacterias difieren en los hidratos de carbono que pueden utilizar y en los tipos y cantidades de ácidos mixtos producidos. Estas diferencias de actividad enzimática constituyen una de las características importantes por las cuales se reconocen las diferentes especies<sup>30</sup>.

**2.9.3 Prueba de Citrato.** El citrato de sodio es una sal de ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ciclo de Krebs). Algunas bacterias pueden obtener energía por vía

---

<sup>29</sup> KONEMAN, Elmer *et al.* Diagnóstico microbiológico. Bogotá : Panamericana. 1983; p. 157.

<sup>30</sup> Ibid., p. 178.

distinta de la fermentación de hidratos de carbono, utilizando citrato como única fuente de carbono. Cualquier medio empleado para detectar utilización de citrato por parte de las bacterias en estudio debe estar desprovisto de proteínas e hidratos de carbono como fuentes de carbono.

La utilización de citrato por una bacteria se detecta en un medio con citrato mediante la formación de subproductos alcalinos. El medio incluye citrato de sodio, un anión, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoníaco ( $\text{NH}_3^+$ ), llevando a la alcalinización del medio por conversión del  $\text{NH}_3^+$  en hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). El azul de bromotinol, amarillo a pH menor de 6 y azul a pH mayor de 7,6, es el indicador<sup>31</sup>.

**2.9.4 Prueba de Motilidad.** La motilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación final de una especie. Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y ubicación varía en las diferentes especies. Los medios para detectar motilidad contienen concentraciones de agar de 0,4% o menos. A mayores concentraciones el gel es demasiado firme como para permitir la libre diseminación de los organismos. La prueba de motilidad se interpreta realizando un examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación<sup>32</sup>.

---

<sup>31</sup> Ibid., p. 184

<sup>32</sup> Ibid., p. 185.

## 2.10 TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL DENTRO DE LA PTAR UPB

El proceso actual, consiste en degradar la materia orgánica que llega a la planta. Como sistema de pre-tratamiento se encuentra un sistema de barras (cribado), donde se retienen sólidos gruesos, una trampa de grasas y un desarenador donde quedan sedimentan partículas de arena y partículas con gravedad específica similar a la de la arena.

Como sistema de tratamiento secundario se encuentran dos Reactores Anaerobios de Flujo a Pistón (RAP), cuyas principales características se resumen en la tabla 3. Actualmente las remociones de Demanda Bioquímica de Oxígeno oscilan entre 65% y 75%.

Como post- tratamiento, existe un sistema terciario utilizando *Spirodela sp.*, que tiene por objeto remover Nitrógeno y Fósforo, Demanda Bioquímica de Oxígeno y Demanda Química de Oxígeno, entre otros.

El actual sistema de tratamiento de agua residual dentro de la PTAR de la UPB Bucaramanga, conformado por el RAP y por tratamiento terciario con *Spirodela sp.*, reporta porcentajes de remoción de: Demanda Bioquímica de Oxígeno (95.6%). Sólidos Suspendidos Totales (96.3%), grasas y aceites (96%).

Las principales fuentes generadoras de H<sub>2</sub>S dentro de la PTAR son:

- Pozo de succión
- Cámara desarenadora
- Reactores
- Caja del efluente.

**Tabla 3.** Condiciones de diseño del RAP de la Universidad Pontificia Bolivariana

<b><i>Bombeo</i></b>		
Capacidad	4.73	L/s
Tiempo de operación	300	s
Volumen de almacenamiento	1560	L
<b><i>Diseño del Reactor</i></b>		
Carga de diseño	80	Kg DBO <sub>5</sub> /d
Concentración máxima de sustrato influente	661	mg/L
Dimensionamiento del Reactor		
Carga volumétrica	0.85	Kg DBO <sub>5</sub> /m <sup>3</sup> -d
Tiempo de Retención	9.12	Horas
Volumen de los Reactores	28	m <sup>3</sup>
<b><i>Geometría del Reactor</i></b>		
Forma Cilíndrica ( eje horizontal)		
Diámetro	2.2	m
Borde Libre	0.25	m
Velocidad Hidráulica de los compartimientos	2.59	m/hora
<b><i>Relleno de los Módulos de polietileno</i></b>		
Ancho	0.395	m
Dimensiones	Largo	0.595
	Alto	0.237
Volumen que ocupa cada módulo	55.7	L
Porosidad	75-80	%

Fuente: DIAZ, Erika. Determinación de la calidad y potencialidad del lodo del reactor anaerobio de flujo a pistón (RAP) de la Universidad Pontificia Bolivariana Bucaramanga, 2002; p.19. Trabajo de grado (Ingeniería Sanitaria y Ambiental). Universidad Tesis de Grado. Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga. Facultad de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.

En la etapa inicial de operación de la PTAR de la UPB, se reportaron casos severos de intoxicación por parte de los operadores, presentándose irritación en los ojos, mareo y en algunos casos vómito con presencia de sangre.

En la actualidad la población estudiantil se ve afectada por la presencia de estos olores, que se encuentran a la entrada del campus universitario (sitio de vertimiento) y en las inmediaciones del RAP. Este hecho representa un inconveniente de tipo estético que genera molestias al estudiantado y a toda la comunidad universitaria. Los lugares donde se percibe con mayor frecuencia el olor, (entrada y/o puente vehicular, parqueaderos, bloque C y/o cafetería) corresponden a aquellos más concurridos en los intervalos de horas en los cuales, de acuerdo a las respuestas, se presentan también las mayores percepciones durante el día (7-8 a.m. , 9-10 a.m., 12-1 p.m., 2-3 p.m. y 5-6 p.m.); las cuales, de acuerdo a los horarios de clases, coinciden con las horas de entrada, salida y descansos<sup>33</sup>.

---

<sup>33</sup> OROZCO, Jacinto y SOTO, José. Evaluación del Sistema de Tratamiento de Gases de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga. Bucaramanga: Universidad Pontificia Bolivariana. 2000

### 3. ANTECEDENTES

En el tratamiento de sulfuro de hidrógeno se han utilizado tradicionalmente diversos procesos tales como los biofiltros y el lavado químico del aire mediante torres lavadoras de gases tipo "Scrubber" donde los gases, una vez inyectados en su interior por medio de un ventilador centrífugo, son tratados en contracorriente.

En Barcelona (España) se implantó un sistema de tratamiento en la PTAR de Mataró que funciona mediante la retención del gas producido en tres bioreactores. En el primero de ellos se produce la retención de sulfuro de hidrógeno, en el segundo se realiza un proceso de tratamiento con una bacteria funguicida y en el tercero se complementa la acción desodorante antes de la salida a la atmósfera. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento es adecuado para eliminar los olores causados por H<sub>2</sub>S ya que el sistema consigue retener este compuesto hasta en un 90%<sup>34</sup>.

En la Universidad de la Frontera en Temuco (Chile), se han realizado investigaciones enfocadas al control de olores utilizando el concepto de bacterias sulfuro-oxidantes y se han desarrollado bioreactores para remoción de H<sub>2</sub>S utilizando lodo activado y ácido butírico como fuente de carbono, lográndose conversiones a sulfato de hasta un 97.8% para el ácido sulfhídrico en un reactor columnar de lecho fijo con biomasa inmovilizada. El valor máximo de eliminación de ácido sulfhídrico alcanzado fue de 63.4 g/m<sup>3</sup>-h para cargas de ácido sulfhídrico de 60 a 100 g/m<sup>3</sup>-h<sup>35</sup>.

En la Universidad Católica de Valparaíso (Chile) se diseñó un biofiltro empacado con turba inoculada con *Thiobacillus thioparus* para el tratamiento de aire contaminado con

---

<sup>34</sup> BALDASANO, Op cit., p. 28.

<sup>35</sup> NAVIA, Rodrigo y VIDAL, Gladys. Tratamiento del biogás generado por la digestión anaerobia de efluentes: sustratos orgánicos con elevado contenido en sulfato. En : Tecnología del agua. España: Enero 2002; p. 64-70.

ácido sulfhídrico. El biofiltro alcanzó una eficiencia de remoción del 100% de eliminación operando a un flujo de  $30 \text{ L h}^{-1}$  y concentraciones en la alimentación menores a 355 ppm de  $\text{H}_2\text{S}$ , una capacidad máxima de eliminación de  $55 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  se obtuvo a  $140 \text{ L h}^{-1}$ , a esta condición se alcanzó un 60% de remoción<sup>36</sup>.

En Taiwán, un grupo interdisciplinario de profesionales, obtuvo excelentes resultados en cuanto a remoción de  $\text{H}_2\text{S}$ , utilizando cultivos puros de *Thiobacillus novellus*, una bacteria facultativa quimioautótrofa en un reactor a flujo continuo, bajo condiciones limitadas de nutrientes. Las pruebas de remoción de  $\text{H}_2\text{S}$ , fueron realizadas bajo ambientes autotróficos (utilizando como fuente de energía  $\text{CO}_2$ ) y mixotróficos (además de  $\text{CO}_2$ , se encuentra glucosa como fuente de energía adicional). A nivel experimental, se encuentra que en ambientes mixótrofos, se obtienen como producto predominante del metabolismo bacterial, sulfatos. Los sulfatos son una forma no tóxica frente a los compuestos reducidos del azufre tal como el  $\text{H}_2\text{S}$ , obteniendo una conversión del 97.6 % con un tiempo de residencia de 58 segundos dentro del bioreactor y mostrando una conversión de tan solo el 73.5 % para un tiempo de remoción de 288 segundos<sup>37</sup>.

En la PTAR de San Angelo (Texas- Estados Unidos de América), se seleccionó un tratamiento biológico para la emisión de olores, debido a  $\text{H}_2\text{S}$  y compuestos orgánicos sulfurados presentes en la corriente gaseosa. Los biofiltros fueron seleccionados como un método de control de olores debido a sus bajos precios, alta efectividad y ausencia de químicos a excepción de micronutrientes durante el arranque. Durante los primeros dos meses se monitoreo constantemente las tasas de irrigación de agua y el pH del drenaje de los biofiltros. El drenaje de los biofiltros siempre estuvo por debajo de 2, lo cual es un indicio de la fuerte oxidación de ácido sulfhídrico dentro de las unidades.

---

<sup>36</sup> AROCA, German; ARANCIBIA, Fernando y OYARZÚN, Patricio. Tratamiento de aire contaminado con  $\text{H}_2\text{S}$  utilizando un biofiltro de turba inoculado con *Thiobacillus thioparus*. Chile: Universidad Católica de Valparaíso. 2001; Base de Datos En Línea. Disponible en Internet. [En: http://www.inf.ucv.cl/~usr\\_fac/revista/Biofiltro.doc](http://www.inf.ucv.cl/~usr_fac/revista/Biofiltro.doc)

<sup>37</sup> CHUNG, Op. cit., p. 366

Las concentraciones de entrada, mostraron niveles de 300 a 500 ppm, con máximos valores de 800 ppm y se reportaron eficiencias de remoción 99 %<sup>38</sup>.

La compañía BIOREM (Canadá), desarrolló un biofiltro que trabaja a pH neutro y es capaz de tratar tanto H<sub>2</sub>S como compuestos reducidos del azufre, con un tiempo nominal de 60 segundos, obteniendo remociones de 99% de H<sub>2</sub>S con concentraciones de entrada por encima de 50 ppm, utilizando un medio de soporte inorgánico desarrollado por BIOREM. El biofiltro opera con bajo requerimiento de energía y bajos costos de mantenimiento<sup>39</sup>.

En un proyecto llevado a cabo por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Pohang y por el Instituto Hyundai de investigación Industrial, se operaron 4 biofiltros a escala de laboratorio con diferentes tipos de material filtrante para remover Sulfuro de Hidrógeno. Dichos materiales fueron: carbón activado, compost, poliuretano y una mezcla de compost y poliuretano. Todos los biofiltros trabajaron con *Thiobacillus thioparus* como inóculo. Las remociones alcanzadas fueron las siguientes: Carbón activado (87.3%), Poliuretano (37.36%), Compost (57.41%) y Mezcla de Compost y poliuretano (70.75%)<sup>40</sup>.

El departamento de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Kingsville (Texas), llevó a cabo un experimento en el que se evaluó el desempeño de compost natural y un medio

---

<sup>38</sup> STRAYHORN, Ellen. Selection, operation & start-up of odor control biofilter systems at the city of san angelo waste water treatment plant. Texas: Freese and Nichols, Inc. 2003; Base de datos en línea.

Disponible en: [http://www.bioway.com/tech\\_reviews/San\\_Angelo\\_Texas.pdf](http://www.bioway.com/tech_reviews/San_Angelo_Texas.pdf)

<sup>39</sup> HERNER, Brian y SHAREEFDEEN, Z. Expansion of the performance of BIOREM's Biosorbents™ Biofilter Media operating at neutral pH in the removal of Hydrogen Sulphide & reduced sulphur compounds from contaminated air streams. Canadá: BIOREM Technologies Inc. 2002; Base de datos en línea. Disponible en: <http://www.biorem.biz/resources/H2SDataReport-NeutralpH.pdf>

<sup>40</sup> JONES, Kim. Evaluation of Sulfur Toxicity and Media Capacity for H<sub>2</sub>S Removal in Biofilters Packed with Both Natural and Commercial Media. Kingsville: University of Kingsville. 2003. En línea [Base de datos en línea]. Disponible en internet: <http://www.bioreaction.com/papers/papers/69751.pdf>

sintético en la remoción de H<sub>2</sub>S, además se evaluó la toxicidad que implica la formación de sulfuro en el medio. Ambos medios mostraron eficiencias mayores al 95%<sup>41</sup>.

La empresa NABISCO ROYAL COLOMBIANA (Colombia), debido a la alta carga orgánica de sus efluentes, escogió el sistema anaerobio para su tratamiento y contrató el montaje bajo la modalidad "llave en mano" a la empresa BIOTEC COLOMBIA S.A. Como alternativa, se planteó la remoción biológica de los sulfuros con bacterias del género *Thiobacillus*, para su transformación en azufre elemental<sup>42</sup>.

La Corporación BIOTEC, la empresa SUCROMILES y la empresa LEVAPAN (Colombia) desarrollaron un biofiltro a escala piloto para el control de las emisiones de ácido sulfhídrico ( H<sub>2</sub>S ) en un efluente gaseoso, utilizando como materiales de soporte bagazo de caña y piedra pómez inoculados con un consorcio microbiano capaz de degradar H<sub>2</sub>S, obteniendo eficiencias de remoción mayores al 99 %<sup>43</sup>.

Con relación a la utilización de guadua como medio de soporte, la Universidad de Pereira adelanta investigaciones utilizando este material y bambú como medio de soporte de filtros anaerobios para el tratamiento de aguas residuales domésticas, mostrando eficiencias hasta de un 70% en remoción de carga y una disminución bastante significativa en costos operacionales y de construcción<sup>44</sup>.

En Bucaramanga, en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Río Frío, se están adelantando pruebas a nivel de laboratorio y pre-piloto, cuyo objetivo es desarrollar una

---

<sup>41</sup> JONES, Kim. Evaluation of Sulfur Toxicity and Media Capacity for H<sub>2</sub>S Removal in Biofilters Packed with Both Natural and Commercial Media. Kingsville: University of Kingsville. 2003. En línea [Base de datos en línea]. Disponible en internet: <http://www.bioreaction.com/papers/papers/69751.pdf>

<sup>42</sup> CONIL, Philippe. El control de olores en las plantas anaerobias de tratamiento de aguas residuales: estudios de casos. [En línea]. Red Internacional Biotec. Cali, 2003. Disponible en Internet: <http://www.bio-tec.net/publicaciones/conil9.doc>

<sup>43</sup> CHÁVEZ, Op cit., p. 15.

<sup>44</sup> CASTAÑO, Juan *et al.* Limitación y posibilidades del tratamiento de aguas residuales mediante la utilización de guadua. Pereira: Noviembre 2002. [Monografía en CD room]. Versión para V congreso internacional del medio ambiente y desarrollo sostenible.

tecnología que involucre bacterias fotosintéticas del azufre para lograr disminuir el H<sub>2</sub>S contenido en el efluente de las unidades de tratamiento biológico.

Los resultados son prometedores, ya que se ha podido verificar que los consorcios microbianos establecidos han sido capaces de oxidar los sulfuros desde un 30 hasta un 99 %, este último bajo las mejores condiciones de temperatura e intensidad de luz, lo que indica que un adecuado aprovechamiento de la luz solar y un complementario uso de luz sintética, permiten estimular el proceso de biooxidación de sulfuros, buscando siempre los mejores niveles de remoción del contaminante generador de olores ofensivos<sup>45</sup>.

---

<sup>45</sup> DUARTE, Cesar. Evaluación del proceso de biooxidación de H<sub>2</sub>S presente en el efluente de un reactor UASB para el control de olores. Bucaramanga. [En línea]. Disponible en internet: <http://www.geocities.com/biooxidacion/>

#### 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La presente investigación se llevó a cabo en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (RAP) de la Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga y simultáneamente se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) sede UIS-Guatiguará.

La caracterización de *T.denitrificans* se realizó en 4 etapas como se observa en la figura 1. Se comenzó trabajando simultáneamente la caracterización biológica y determinación de la concentración de sulfuros totales del agua residual del RAP, y el aislamiento de *T.denitrificans*. Una vez concluida la fase de aislamiento se llevó a cabo la identificación taxonómica de la bacteria y la adaptación a las condiciones del RAP. Posteriormente, se inoculó *T.denitrificans* sobre guadua para dar paso a la formación de biopelícula.

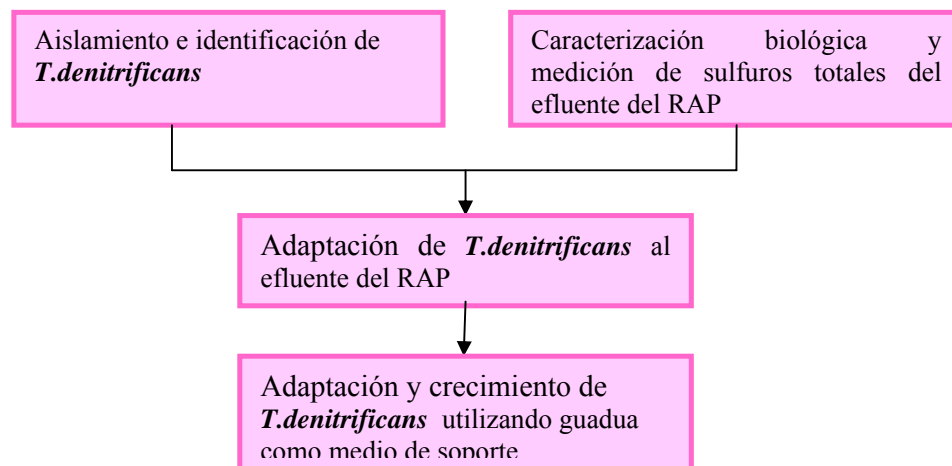


Figura 1. Diagrama del Desarrollo experimental

#### **4.1 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SULFUROS TOTALES EN EL EFLUENTE DEL RAP.**

Para trazar el comportamiento de las concentraciones de sulfuro en el efluente del RAP, se realizaron muestreos dentro del Campus Universitario, en jornada laboral con el fin de determinar la incidencia de la variación poblacional de la comunidad universitaria en la producción de sulfuros dentro del RAP. De acuerdo con los estudios realizados sobre la producción de olores ofensivos debidos al funcionamiento del RAP<sup>46</sup>, la jornada de muestreo se realizó de 9:00 am – 3:00 pm, franja del día en la que se concentra la mayor población estudiantil y producción de sulfuros.

El muestreo se llevó a cabo en dos semanas, donde se alternó las mediciones, en la primera semana se muestreó los días Martes y Jueves y en la segunda semana los días Lunes, Miércoles y Viernes para así simular el comportamiento de una semana completa.

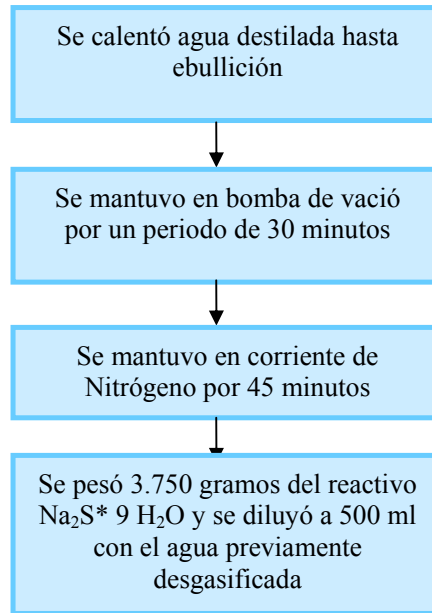
El equipo utilizado para la determinación de sulfuros totales corresponde a un METTLER TOLEDO DL 50 Graphix, un titulador automático con un electrodo de medición de potencial (DM 141-SC). Los resultados se reportan como concentración de sulfuros totales, incluyendo las formas disueltas como  $H_2S$  y  $HS^-$  al igual que los sulfuros metálicos presentes en la materia suspendida. Los equipos METTLER TOLEDO están normalizados de acuerdo a estándares ISO 9001 y el procedimiento usado para la medición de sulfuros corresponde a la norma ASTM D-3227.

Para validar las mediciones realizadas con el titulador automático, periódicamente se evaluó su desempeño mediante la titulación de una solución patrón de sulfuro de concentración conocida (1000 ppm de  $S^{2-}$ ). Para la preparación de la solución patrón se

---

<sup>46</sup> OROZCO, Op. cit., p.77.

utilizó el reactivo  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  marca Aldrich con un porcentaje de pureza de 99.99% como muestra la Figura 2 <sup>47</sup>:



**Figura 2. Procedimiento seguido para la preparación de sulfuro de 1000 ppm**

Las muestras para la determinación de sulfuros totales fueron tomadas en una botella Winkler de 100 ml de capacidad a la salida del RAP. Para eliminar interferencias y preservar los sulfuros, se agregaron 4 gotas de acetato de Zinc 2N y 2 gotas de solución de Hidróxido de Sodio 6N en la botella antes de agregar la muestra. Después de tomar la muestra se agregaron nuevamente 2 gotas de Hidróxido de Sodio 6N y se dejó precipitar por un período de 30 minutos. Después de los 30 minutos se eliminó el sobrenadante y se restituyó con agua destilada para posteriormente determinar los sulfuros totales.<sup>48</sup>

<sup>47</sup> AWWA,APHA. Standard Methods: For the examination of water and waste water. USA: Lenore S, 1998. p. 4-163

<sup>48</sup> Ibid, p.4-164.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL AGUA RESIDUAL DE LA UPB

En esta fase del proyecto se trabajó con el efluente del Reactor Anaerobio de Flujo a Pistón (RAP) de la UPB. Se sumergieron anillos de guadua durante 30 días en un contenedor de agua residual para formar biopelícula. El análisis microbiológico de la biopelícula se realizó para identificar que tipo de microorganismos se encuentran en el efluente del RAP. Este análisis constó de tres etapas:

-**Caracterización:** Se tomó biopelícula de los anillos de la guadua y se hizo siembra en agar Mac Konkey para aislar los microorganismos presentes en el efluente y en medios selectivos y diferenciales para el aislamiento de *T. denitrificans*. Por medio de pruebas bioquímicas se identificó el tipo de microorganismos encontrados.

- **Recuento de Mesófilos:** se tomó 0.1 ml de la dilución 1/10.000 de agua residual y se hizo siembra en agar de recuento servido en cajas de Petri estéril y se incubó a 37 ° C por 24-48 horas. Después del crecimiento se realizó el recuento de colonias en la cámara de Québec y se multiplicó por el factor de dilución utilizado, informando el resultado como U.F.C. / ml.

- **Recuento de Coliformes Totales y Fecales:** se realizó tomando 0.1 ml de dilución 1/5.000 de agua del RAP y se sembró en agar Chromocult (medio de cultivo selectivo y diferencial para coliformes). Se contaron tanto las colonias de color rojo o rosado y las violeta para Coliformes Totales y solamente las de color violeta para el recuento de Coliformes Fecales. Ambos recuentos se informaron como U.F.C / ml.

El análisis microbiológico se hizo con el fin de determinar la calidad sanitaria del agua del RAP y la convivencia de *T.denitrificans* dentro de consorcios microbianos.

### 4.3 AISLAMIENTO DE *Thiobacillus denitrificans*

Para el aislamiento de *T.denitrificans*, se tomaron muestras de distinta procedencia, composición biológica y composición físico-química, proporcionando una gama de microhabitats y de esta manera aumentar la probabilidad de obtención de una cepa pura de la bacteria en estudio.

- **Muestra del efluente del RAP de la UPB:** las muestras fueron tomadas de la salida del RAP, usando recipientes plásticos de 5 litros de capacidad y preservándolas con hielo dentro de una cava.

- **Muestra del lodo del RAP de la UPB:** la muestra se tomó de un válvula de purga del RAP mediante una jeringa de 100 ml de capacidad, que posteriormente fue sellada para mantener el lodo en condiciones anóxicas.

-**Muestra del lodo de un Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente y Manto de Lodos (UASB) de la PTAR de Río Frío (Bucaramanga):** se siguió el mismo procedimiento que se aplicó para la muestra del lodo de la UPB.

-**Muestra del efluente de la mina Reina de Oro en el municipio de Vetas Santander:** se tomaron muestras en el punto de vertimiento de la mina Reina de Oro al río Vetas en recipientes plásticos de 5 litros de capacidad y se preservaron en hielo dentro de una cava.

Posteriormente, se preparó medio selectivo, con reactivos de marca MERCK (grado analítico) para *T.denitrificans* (Ver Anexo A) y se hicieron siembras con cada una de las muestras de diferente procedencia.

Luego se realizaron sucesivos repiques con el fin de descartar especies no deseadas en el estudio. Paralelamente se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas (Tinción de Gram.) a las colonias.

La identificación del microorganismo se realizó por medio de las pruebas para la clasificación de *T.denitrificans* según el Manual de Bergey <sup>49</sup>. Se utilizó el kit BBL CRISTAL para la identificación de anaerobios y enterobacterias; y las reacciones típicas en baterías de series bioquímicas comparativas para poder determinar el tipo de microorganismo encontrado.

Para la identificación de la cepa sospechosa previamente aislada se realizaron las siguientes pruebas:

**- Prueba de nitritos y nitratos.** La producción de nitritos se evidencia mediante el cambio de color del caldo nitrato inoculado con la bacteria. Partiendo de la propiedad de *T.denitrificans* de utilizar nitrato como único aceptor final de electrones en la oxidación de los compuestos azufrados, la prueba adquiere gran importancia en la identificación del microorganismo en estudio (Ver Anexo B).

**-Prueba de azúcares:** la prueba diferencia entre microorganismos autótrofos y microorganismos heterótrofos. Las fuentes de obtención del carbono pueden ser orgánicas (organismos fermentativos) o inorgánicas (organismos heterótrofos), siendo el resultado de la prueba de gran utilidad en la identificación de *T.denitrificans* por su condición de microorganismo no fermentador. (Ver Anexo C)

**-Prueba citrato:** de igual manera que los hidratos de carbono, el citrato puede ser utilizado como única fuente de carbono, adquiriendo gran importancia en la identificación de *T.denitrificans* como organismo quimioautótrofo (Ver Anexo D).

---

<sup>49</sup> JAMES, S et al. Bergey's of Systematic Bacteriology. 2 ed. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkims, 2000. V.3,p.1856-1858.

**-Prueba de Motilidad:** como característica morfológica *T.denitrificans*, posee flagelación polar, razón por la cual el resultado de esta prueba es clave para la identificación del microorganismo en estudio. (Ver Anexo E).

#### **4.4 ENSAYOS PRELIMINARES PARA LA ADECUACIÓN DE *T. denitrificans* A LAS CONDICIONES DEL EFLUENTE DEL RAP.**

En esta fase del proyecto, se diseñaron modelos a escala de laboratorio con el objetivo de definir la capacidad de remoción de sulfuro totales y las condiciones de crecimiento bacteriano. Los experimentos se montaron en agitación continua para proporcionar mezcla completa y se recubrieron en papel aluminio para evitar la oxidación debida a la radiación natural y artificial.

Para la experimentación, se utilizaron soluciones de sulfuro, partiendo de una solución patrón de 1.000 ppm preparada según el procedimiento descrito anteriormente...Véase numeral 5.1.

**4.4.1 Curva de crecimiento de *T. denitrificans* en medio selectivo.** Un primer diseño experimental, se llevó a cabo con el fin de conocer el comportamiento bacteriano a través del tiempo en medio selectivo para *T. denitrificans*. El montaje consistió en un recipiente de vidrio (Vol. 500 ml) en el que se puso en contacto el inóculo y medio selectivo en una relación volumétrica 30/70 respectivamente (Ver Figura 3).

El crecimiento se evaluó mediante la metodología de Mc Farland<sup>50</sup>, que mide la absorbancia de una solución de inóculo correspondiente a la población bacteriana presente en un tiempo determinado (Ver Anexo F). Para la realización de la prueba, se utilizó un espectrofotómetro HASH DR 2000.

---

<sup>50</sup> KANDEL, Judith. Microbiology. [En línea]. Versión en HTML. USA, 2003. Disponible en Internet: <http://biology.fullerton.edu/biol302/302labf99/quant.html>



**Figura 3. Montaje experimental para el crecimiento de *T. denitrificans* en medio selectivo.**

Se tomaron muestras periódicamente durante 24 horas acorde con las fases de crecimiento del microorganismo, es decir, cuando el resultado de las lecturas indicaron que el crecimiento se hallaba en fase exponencial, las muestras se tomaron en intervalos de tiempo cortos (30 min.), a diferencia, de los intervalos de toma de muestra para las fases de adaptación y estacionaria, que fueron mas largos (60 min.).

Se tomaron muestras de 3 ml en tubos de ensayo para ser leídas en el espectrofotómetro, previa agitación. Las lecturas se hicieron por duplicado para garantizar reproductividad en los datos obtenidos.

**4.4.2 Curva de crecimiento de *T. denitrificans* en solución de sulfuro.** Un segundo diseño experimental, se realizó con el objetivo de determinar el crecimiento bacteriano en solución de sulfuro y la cinética de remoción. El montaje consistió en un Erlenmeyer (Vol. 1000 ml) con desprendimiento lateral para la toma de muestra, en el que se puso en contacto inóculo de *T. denitrificans* con solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm, en la misma relación volumétrica del experimento anterior (Ver Figura 4).

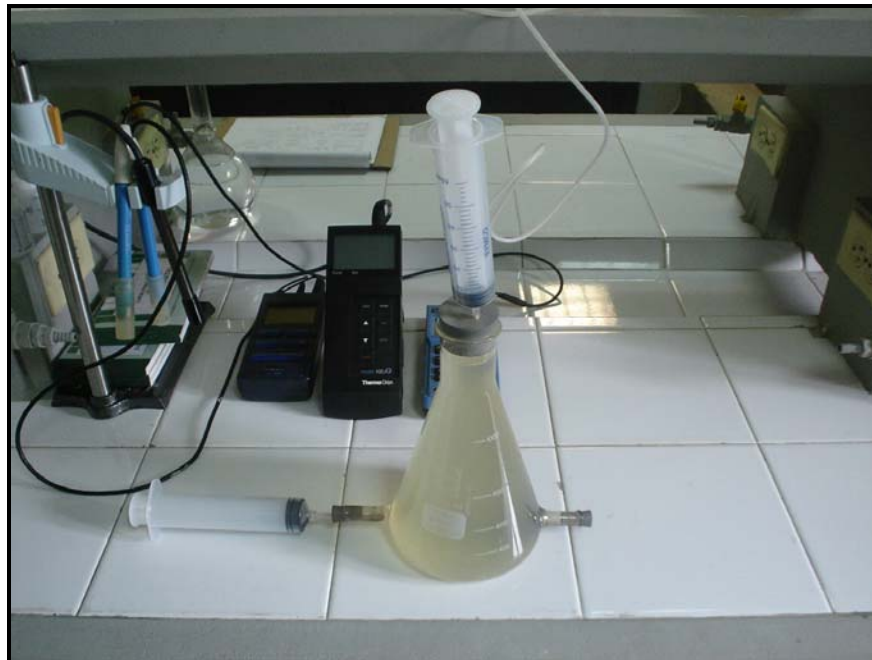


**Figura 4. Montaje experimental para el crecimiento de *T. denitrificans* en solución de sulfuro.**

El crecimiento bacteriano se evaluó mediante conteo directo de colonias, para lo cual se hicieron siembras profundas en agar selectivo para *T. denitrificans* cada hora durante 24 horas. Para la siembra profunda se diluyó el inóculo en una proporción 1/5000, seguidamente se depositó 1ml de la dilución en una caja de Petri y se agregó medio selectivo fundido, se homogenizó y dejó solidificar. Las cajas de Petri se incubaron a una temperatura de 37°C durante un periodo de 24 horas para realizar el conteo en la cámara de Québec. Los resultados obtenidos se reportaron como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro.

La cinética de remoción de sulfuros totales, se evaluó tomando muestras de 1ml cada hora durante 24 horas, a la par con las tomadas para la siembra, con una jeringa de 2 ml a través de un tapón de caucho esterilizado, para evitar la entrada de oxígeno y la alteración del sistema. Las muestras se vertieron en una botella Winkler de 100 ml y se aforaron al volumen del recipiente con agua destilada; previamente se fijaron los sulfuros según el procedimiento descrito en el numeral 5.1 y se realizó la determinación de sulfuros totales en el titulador automático METTLER TOLEDO DÑL 50Graphix.

**4.4.3 Determinación de porcentajes de remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* en solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm.** Para determinar los porcentajes de remoción y la variación de estos en el tiempo, se realizó un tercer experimento en el que se dispuso inóculo de *T. denitrificans* y solución de sulfuro a una concentración de 140 ppm a la misma relación volumétrica de los experimentos anteriores, en un Erlenmeyer (Vol. 1000 ml) con desprendimiento lateral para la toma de muestra (Ver figura 5).



**Figura 5. Montaje experimental para la determinación de remoción de *T. denitrificans* en solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm.**

Periódicamente (cada 3 horas), se introdujo 100 ml de solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm, al tiempo que se le extraía muestra (100 ml) para evaluar la eficiencia de remoción y su variación con respecto al tiempo según el procedimiento de toma de muestra y determinación de sulfuros totales descrito anteriormente... Véase numeral 4.1... Tanto la inyección de solución de sulfuro como la extracción de muestra, se llevaron a cabo mediante jeringas de 50ml y 2ml respectivamente, a través de tapones de caucho previamente esterilizados, garantizando la hermeticidad del sistema.

**4.4.4 Incidencia del flujo de solución de sulfuro a una concentración de 50 ppm, sobre el comportamiento del crecimiento de *T. denitrificans* en la fase de crecimiento estacionaria.** El montaje experimental, comprendió un Erlenmeyer (Vol. 1000 ml) a la misma relación volumétrica de inóculo y solución de sulfuro de 100 ppm del experimento anterior. Se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la técnica de siembra profunda y la determinación de sulfuros totales, de igual manera a lo especificado anteriormente... Véase numeral 4.4.2...

Cuando el microorganismo entró en fase estacionaria se procedió a introducir solución de sulfuro a una concentración de 50 ppm, cada 3 horas durante un período de 9 horas, con el objetivo de determinar su incidencia en el comportamiento de *T. denitrificans*.

#### **4.5 ADAPTACIÓN, CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE SULFUROS TOTALES CON *T. denitrificans* EN AGUA RESIDUAL DEL EFLUENTE DEL RAP.**

Una vez aislada la bacteria, se procedió a bioaumentar mediante la siembra en medio líquido (tioglicolato) e incubación (temperatura de 37°C) hasta observar crecimiento mediante el aumento en la turbidez del medio. Posteriormente se inoculó, utilizando agar selectivo para la bacteria (medio líquido) y nuevamente se sometió a bioaumentación en incubadora. Con el inóculo bioaumentado de *T. denitrificans*, se procedió a llevar a cabo una adaptación al agua residual del RAP y la evaluación de la remoción de la remoción de sulfuros totales.

**4.5.1 Adaptación de *T. denitrificans* al efluente del RAP.** La metodología empleada consistió en poner en contacto solución de inóculo con medio selectivo para observar el crecimiento de *T. denitrificans*, utilizando diferentes porcentajes de agua del efluente del RAP (10, 50, 70, 100%) dentro de la preparación del medio selectivo. Durante el desarrollo experimental, los montajes en los que se utilizó diferente proporción de agua residual del RAP, se mantuvieron en microaerofilia.

Para evaluar la adaptación y viabilidad del inóculo a las condiciones del efluente del RAP, se realizaron periódicamente recuentos bacterianos por siembra profunda para todos los montajes con los diferentes porcentajes de agua residual empleada.

**4.5.2 Remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* en agua residual del efluente del RAP.** Con el fin de determinar la capacidad de remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* en el agua residual, se diseñó un montaje compuesto por dos Erlenmeyers de 1000 ml de capacidad cada uno. En el primero se puso en contacto el inóculo de *T. denitrificans* con agua residual del RAP en una proporción 30/70 respectivamente y el segundo se usó únicamente con agua residual como control (Ver Figura 6)



**Figura 6. Montaje experimental para la remoción de sulfuros totales en agua residual.**

El tiempo de retención hidráulico fue escogido basado en los resultados de las curvas de crecimiento y de la curva de cinética. La inserción y extracción de muestra se hizo con jeringas de 50 ml a través de tapones esterilizados. La toma de muestras y medición de sulfuros totales se realizó de acuerdo con la metodología mencionada anteriormente... Véase numeral 4.1.

#### **4.6 ADAPTACION, CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE SULFUROS TOTALES CON *T. denitrificans* EN EL AGUA RESIDUAL EFLUENTE DEL RAP COMO SUSTRATO Y GUADUA A COMO MEDIO DE SOPORTE.**

Esta fase del proyecto se elaboró con el objetivo de determinar la remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* y cuantificar la biopelícula sobre la guadua como soporte utilizando agua del RAP como sustrato.

**4.6.1 Formación de biopelícula con *T. denitrificans* sobre guadua como medio de soporte.** El procedimiento empleado consistió en colocar en contacto el inóculo bioaumentado de *T. denitrificans* con agua del efluente del RAP (en una relación volumétrica de 30/70 respectivamente) y guadua extraída de la UPB previamente esterilizada, esto mediante el cultivo tipo Batch en un Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad, que permitiera observar la formación de biopelícula sobre la guadua (Ver figura 7).



**Figura 7. Montaje para la adaptación de *T. denitrificans* al efluente del RAP como sustrato y a la guadua como soporte.**

Para evaluar la formación de biopelícula se hicieron recuentos bacterianos extrayendo guadua ubicada a un tercio de la altura total del Erlenmeyer, debido a la condición de

aerobio facultativo de *T. denitrificans*. Luego de extraerla, se raspó con un asa la totalidad de la biopelícula para diluirla en agua destilada estéril en una proporción de 1/100.000 y se midió el área superficial de la guadua. Posteriormente se sembró 1 ml de la dilución en medio selectivo por la técnica de siembra profunda y se dejó en incubación (temperatura 37°C) por un periodo de 24 horas. Pasadas las 24 horas, se realizó el conteo directo en la cámara de Québec. Los resultados se reportaron como UFC/cm<sup>2</sup>.

**4.6.2 Remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* en el efluente del RAP utilizando guadua como medio de soporte.** La metodología empleada para determinar los porcentajes de remoción de sulfuros totales en el efluente del RAP por *T. denitrificans* sobre guadua como medio de soporte se realizó de la siguiente manera: se hicieron tres mediciones para un tiempo de residencia de 1 hora y 2 horas, teniendo en cuenta los resultados de los experimentos anteriores donde se había utilizado *T. denitrificans* sin medio de soporte, para comprobar si la biopelícula incrementa el porcentaje de remoción de sulfuros.

El montaje empleado para la prueba fue el mismo de la prueba anterior...Véase numeral 4.61... pero suministrando agua del efluente del RAP (Ver figura 8). El procedimiento de preparación, inyección y toma de muestra se realizó según la metodología descrita en los numerales anteriores...Véase numeral 4.1... Las mediciones se hicieron por duplicado para garantizar mayor representatividad.



**Figura 8. Montaje experimental para la determinación de remoción de sulfuros totales del efluente del RAP utilizando *T. denitrificans* sobre guagua como medio de soporte.**

## 5. ANALISIS DE RESULTADOS

### 5.1 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SULFUROS TOTALES EN EL EFLUENTE DEL RAP.

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante el periodo laboral (Ver Anexo G), dio como resultado una media aritmética por día de 2,073 ppm. De forma paralela, el promedio aritmético de la totalidad de los datos a cierta hora determinada, permite graficar el comportamiento de la concentración de sulfuros totales a lo largo del día (Ver figura 9).

En esta gráfica, se observa el pico más alto de concentración de sulfuros totales (2,979 ppm) a las 9a.m y el valor mas bajo de concentración (1,381 ppm) a las 11 a.m.

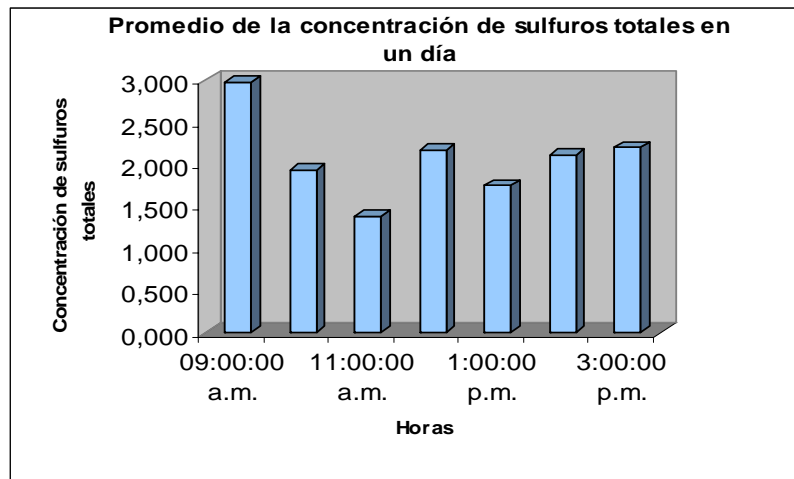


Figura 9. Promedio de las concentraciones de sulfuros totales en un día

Promediando los valores correspondientes a un mismo día se puede graficar el comportamiento de las concentraciones de sulfuros a lo largo de una semana (Ver figura 10) y se observa que las mayores concentraciones de sulfuros se presentan el día lunes (3,307 ppm). De lo anterior, podemos inferir que tanto en la concentración de sulfuros

totales a lo largo del día como lo largo de una semana, se presentan valores de concentración de sulfuros indeseables (tomando como límite un valor de 1 ppm) perjudicando la salud de la población estudiantil.

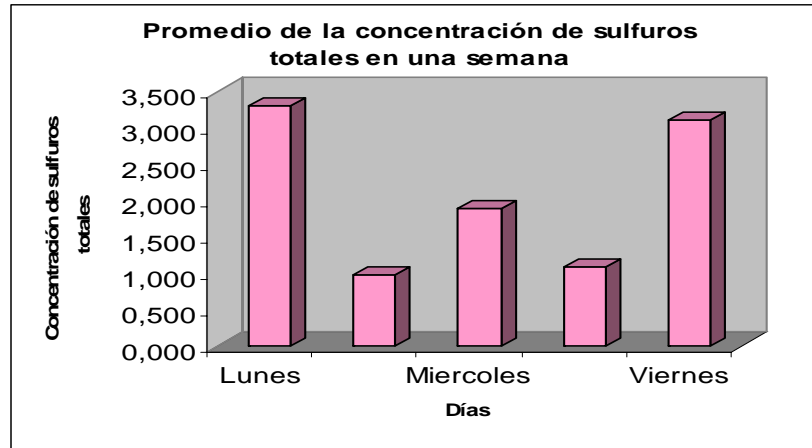


Figura 10. Promedio de la concentración de sulfuros totales en una semana.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL AGUA RESIDUAL DE LA UPB

De la siembra en agar Mac Konkey para bacterias Gram Negativas, se identificaron las siguientes especies (Ver tabla 4)

**Tabla 4.** Lista de especies encontradas en el efluente del RAP

Orden	Familia	Género	Especie
Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Kluyvera</i>	<i>cryocrescens</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>aglomerans</i>
		<i>Klebsiella</i>	<i>ozaenae</i>
		<i>Flavobacterium</i>	<i>spp</i>
Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	<i>spp</i>

Estas especies bacterianas, procedentes del tracto intestinal humano y animal, presentan una amplia distribución en cuerpos de agua contaminados y en PTAR'S, debido al alto contenido de materia orgánica.

Las especies encontradas en el efluente no interfieren con el crecimiento de *T. denitrificans*, debido a su condición de organismos quimioorganotrofos cuyo crecimiento depende de la presencia de compuestos orgánicos, hecho que difiere de la característica quimioautótrofa de *T. denitrificans*.

La posibilidad de formar consorcios microbianos entre bacterias sulfatorreductoras como las especies del género *Flavobacterium* y sulfuroxidantes como *T. denitrificans*, mediante la producción (sulfatorreductoras) y el consumo de sulfuros (sulfuroxidantes), permite garantizar la presencia de *T. denitrificans* en los biofiltros.

El recuento de mesófilos del agua residual del RAP, reportó un valor de  $165 \times 10^5$  UFC/ml y el recuento de coliformes totales y fecales mostró valores de  $19 \times 10^5$  y  $85 \times 10^4$  UFC/ml respectivamente. Estos resultados, constituyen un indicador indirecto de la polución del agua con materia fecal.

### **5.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *T. denitrificans***

Los análisis macroscópicos y microscópicos de los cultivos realizados con muestras del lodo del reactor UASB de Río Frío, así como los llevados a cabo con lodo y agua residual del RAP de la UPB, no mostraron la morfología típica de *T. denitrificans*, ni cumplieron con las pruebas claves para la identificación de bacterias del género *Thiobacillus*. Una de las pruebas claves fue la de citrato que permite identificar la fuente de obtención de carbono dentro del metabolismo bacteriano.

Los resultados obtenidos con las muestras de la PTAR de la UPB y la PTAR de Río Frío, se deben principalmente al tipo de microorganismos presentes en las respectivas unidades de tratamiento (RAP y UASB), en la cuales se lleva a cabo una degradación anaerobia de la materia orgánica contenida en agua residual que da lugar a la presencia de bacterias sulfatorreductoras permitiendo la formación de sulfuros, mientras que el papel de *T. denitrificans* es oxidar sulfuros para producir sulfatos y azufre elemental.

El análisis macroscópico y microscópico de las colonias aisladas del efluente de la mina Reina de Oro de Vetas reveló colonias con apariencia poco opalescentes (Ver figura 11 y figura 12) y se observó la presencia de bacilos cortos Gram negativos con una distribución típica del microorganismo de interés, dando la pauta para realizar las pruebas bioquímicas básicas de identificación. El mejor crecimiento ocurrió a temperatura ambiente, a un pH de 7 en el medio selectivo para *T. denitrificans* y en condiciones de microaerofilia.

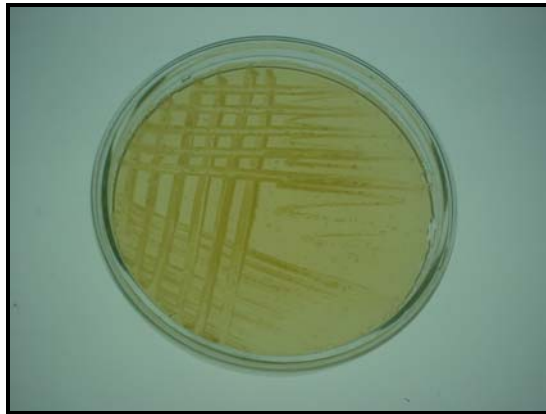


Figura 11. Cepa de *Thiobacillus denitrificans* aislada del efluente de la mina de Reina Oro

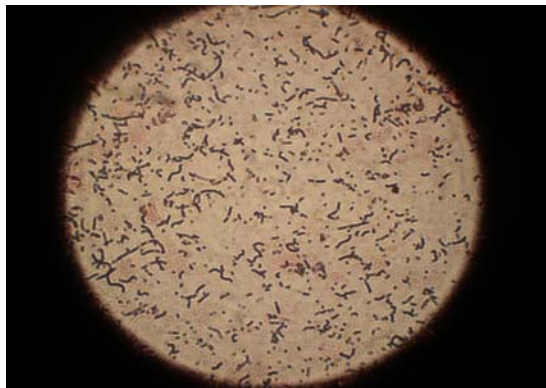


Figura 12. Morfología microscópica de *Thiobacillus denitrificans* (40X)

Los resultados de las pruebas bioquímicas mostrados en la tabla 5, cumplen con lo establecido según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática<sup>51</sup> para la identificación de *T. denitrificans*.

---

<sup>51</sup> JAMES, S et al., Op. Cit., 1856-1858.

**Tabla 5.**Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *T. denitrificans*.

<b>Pruebas bioquímicas</b>	<b>Resultado</b>
<b>Azucres</b>	
Lactosa	(-)
Maltosa	(-)
Ribosa	(-)
Glucosa	(-)
Sorbitol	(-)
Sacarosa	(-)
Manitol	(-)
Fructosa	(-)
Xilosa	(-)
Arabinosa	(-)
Manosa	(-)
Melibiosa	(-)
Ramosa	(-)
Galactosa	(-)
<b>Nitratos</b>	
	(+)
<b>Motilidad</b>	
	(+)
<b>Citrato</b>	
	(-)
<b>Aminoácidos</b>	
L-Histidina	(-)
L-Serina	(-)
L-Isoleucina	(-)
L-Alanina	(-)
L-Metionina	(-)

Los resultados anteriores permiten afirmar que se obtuvo una cepa de *T.denitrificans*, la cual posteriormente se bioaumentó para llevar a cabo las fases siguientes del desarrollo experimental.

## 5.4 ENSAYOS PRELIMINARES PARA LA ADECUACIÓN DE *T. denitrificans* A LAS CONDICIONES DEL EFLUENTE DEL RAP.

**5.4.1 Curva de crecimiento de *T. denitrificans* en medio selectivo.** El crecimiento bacteriano en medio selectivo permite observar claramente las tres fases de crecimiento microbiano: una fase de latencia entre las primeras 9 horas, una segunda fase exponencial entre las 9 y las 18 horas (9 horas), y finalmente, una fase estacionaria de las 18 horas en adelante. Esto permite esbozar una primera idea del comportamiento de *T. denitrificans* bajo nutrientes limitados (Ver figura 13)

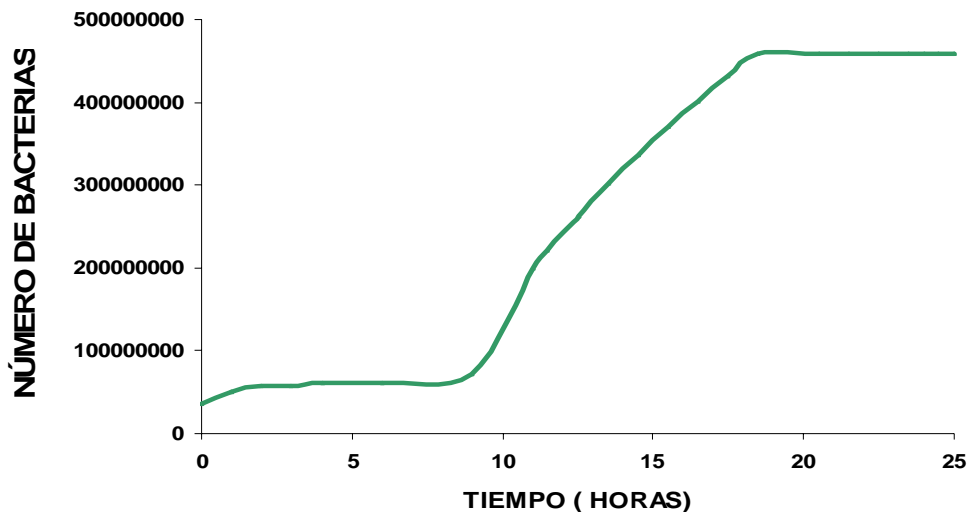


Figura 13. Curva de crecimiento de *T. denitrificans* en medio selectivo

**5.4.2 Curva de crecimiento de *T. denitrificans* en solución de sulfuro.** A diferencia de la curva anterior, cuando se determinó el comportamiento del crecimiento bacteriano en función del tiempo, utilizando como fuente de energía solución de sulfuro, los periodos de adaptación, crecimiento exponencial y fase estacionaria, fueron considerablemente menores (1,5 horas, 4 horas, 15 horas respectivamente). Esta variación en el comportamiento bacteriano, se puede relacionar con el estado de

oxidación de los compuestos azufrados disponibles como fuente de energía. Para el caso del segundo experimento, es mayor la energía que se puede obtener por la oxidación del compuesto mas reducido del azufre (sulfuro), a diferencia, de la energía aportada por compuestos menos reducidos presentes en el medio (tiosulfato) en el primer experimento. Otro factor que puede influir en la variación de los comportamientos del crecimiento bacteriano, es el margen de error debido al conteo de tanto células viables como no viables que ofrece la metodología de Mc Farland.

Complementariamente, la curva de crecimiento realizada por conteo directo mediante siembra profunda, permite observar una fase de muerte exponencial, que se desarrolla a partir de las 21 horas de comenzado el experimento, en adelante (Ver figura 14)

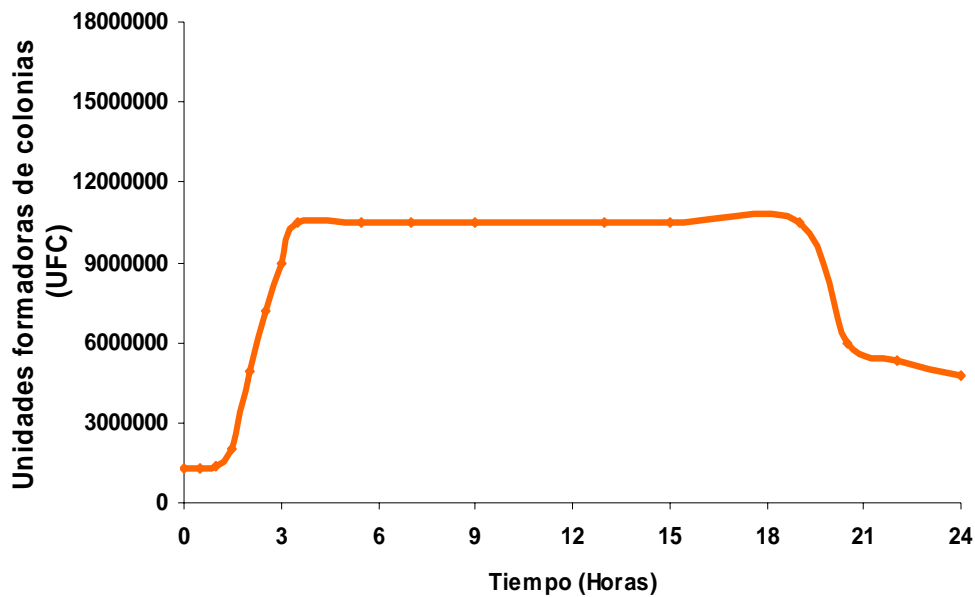


Figura 14. Curva crecimiento de *Thiobacillus denitrificans* en solución de sulfuro

Al analizar la curva que relaciona la concentración del sulfuro versus tiempo, se observa que la tendencia de los datos obtenidos es exponencial, lo cual permite deducir que la degradación de sulfuro tiene lugar, en su mayoría, durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano, lo que explicaría las altas remociones conseguidas (mayores al 80%).(Ver figura 15)

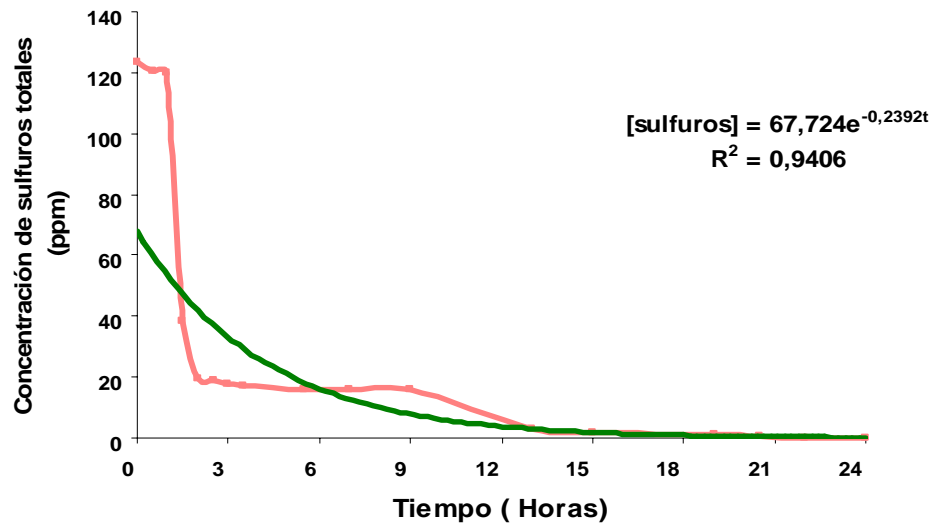


Figura 15. Cinética de consumo de sulfuros totales

Mediante análisis gráfico, se determina que la tendencia de consumo de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans*, corresponde a una cinética de primer orden, con constante de degradación de  $0,2392 \text{ h}^{-1}$  (0,2392 por hora). (Ver figura 16)

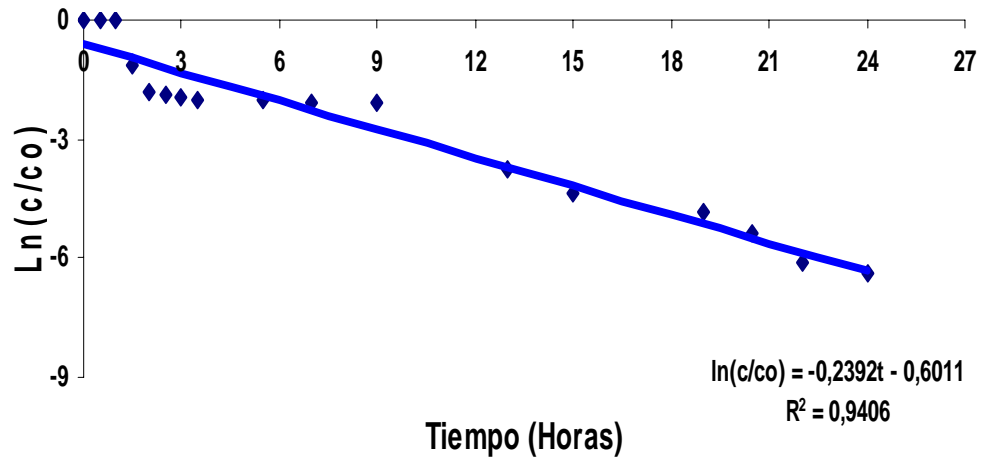
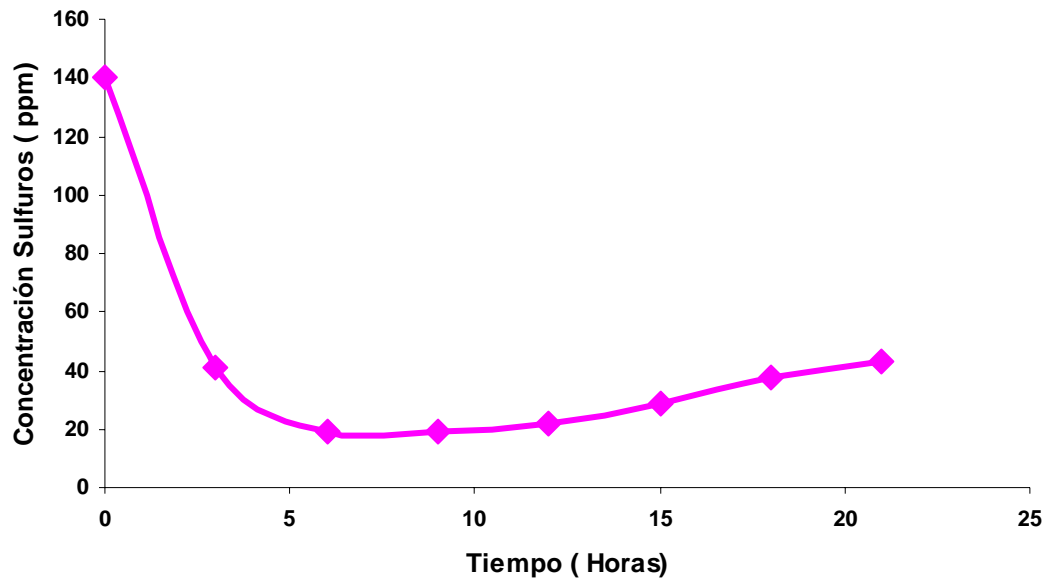


Figura 16. Determinación de constante cinética

**5.4.3 Determinación de porcentajes de remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* en solución de sulfuro a una concentración de 100 ppm.** Al evaluar la concentración residual de sulfuros totales, se observa un descenso en las primeras 5 horas del experimento, coincidentes con la fase de crecimiento exponencial de *T. denitrificans*. En el intervalo comprendido entre las 5 y las 15 horas, el valor de la concentración residual se mantiene aproximadamente constante debido al desarrollo de la fase estacionaria de *T. denitrificans*, en el cual no hay un incremento en la población bacteriana. Finalmente, a partir de las 15 horas el comportamiento de la concentración residual es de tipo ascendente, debido a la disminución de la población bacteriana de *T. denitrificans* asociada a la fase de muerte exponencial del microorganismo (Ver figura 17).



**Figura 17. Concentración residual de sulfuro sintético versus tiempo**

El análisis de los porcentajes de remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* con un tiempo de residencia de 3 horas, reporta un valor promedio de 73.2% (Ver tabla 6)

**Tabla 6.** Porcentajes de remoción con tiempo de residencia de 3 horas en medio sintético.

[Inicial]	[Final]	% Remoción
140.04	38,463	72,5
100	15,593	84,4
100	14,986	85,01
100	18,167	81,83
100	25,664	74,35
100	34,866	65,13
100	40,712	59,28
100	36,928	63,07

**5.4.4 Incidencia del flujo de solución a una concentración de 50 ppm, sobre el comportamiento del crecimiento de *T. denitrificans* en la fase de crecimiento estacionaria.** Los resultados obtenidos en la prueba de evaluación de la incidencia del suministro continuo de solución de sulfuro en el crecimiento bacteriano, confirman una alta remoción de sulfuro (85%), que coincide con la fase de crecimiento exponencial de *T. denitrificans*. Posteriormente, cuando la curva de crecimiento entró en fase estacionaria se comenzó a introducir solución de sulfuro a una concentración de 50 ppm cada 3 horas, se observó que la población bacteriana se mantuvo casi constante, al igual que el valor de la concentración residual a la salida (en el rango de 23 ppm y 27 ppm), reportando remociones del orden del 57%. La población bacteriana y las concentraciones de salida casi constantes, son un indicio del comportamiento microbiano dentro del experimento, manteniéndose la fase estacionaria, en la cual no hay un incremento neto o disminución del número de células. Sin embargo, a pesar que no se reporta incremento neto en el experimento, si existe un consumo de sulfuro, representado por los porcentajes de remoción (57%), debido a que todavía ocurren muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético.

Al analizar la concentración de sulfuro total residual versus unidades formadoras de colonias, se encuentra que la línea de tendencia corresponde a una curva exponencial, la cual corresponde a una curva de cinética de primer orden. (Ver figura 18).

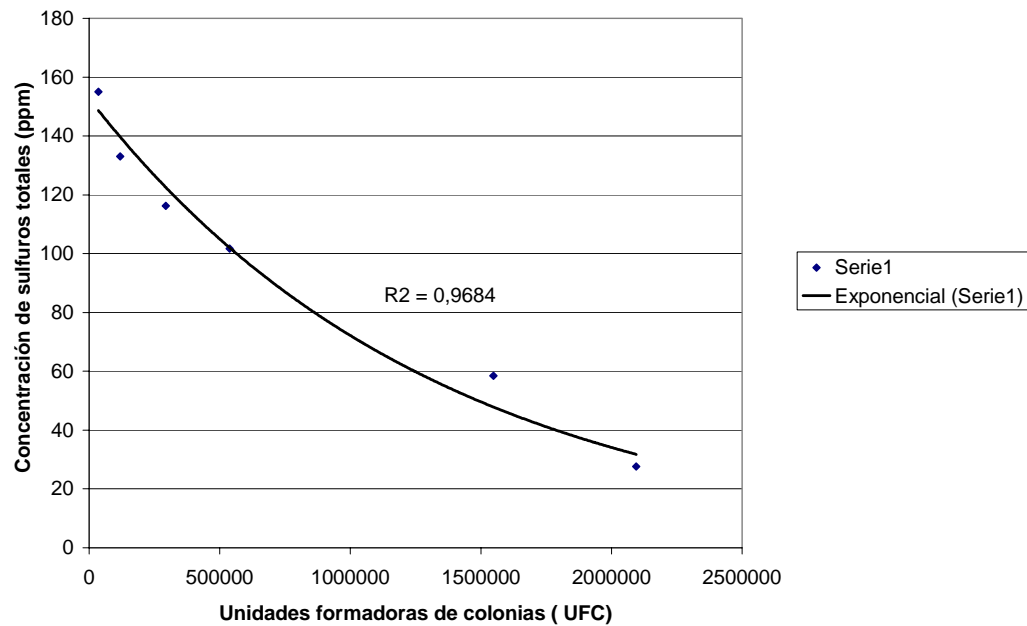


Figura 18. Concentración de sulfuros totales (ppm) versus Unidades formadoras de colonias (UFC)

## 5.5 ADAPTACION, CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE SULFUROS TOTALES DE *T. denitrificans* EN AGUA RESIDUAL DEL EFLUENTE DEL RAP.

**5.5.1 Adaptación del *T. denitrificans* en agua del efluente del RAP.** Los recuentos bacterianos realizados en los montajes en los que se varió el porcentaje de agua residual, reportan aumento en la biomasa, reflejado en el aumento de viables (UFC/ml) lo cual es un indicio de la adaptación de la bacteria a las condiciones del RAP (Ver tabla 7)

**Tabla 7.** Recuentos bacterianos de *T. denitrificans* en la adaptación a las condiciones del efluente del RAP.

<b>Día</b>	<b>Porcentaje de Agua del RAP</b>	<b>UFC7ml</b>
Agosto 16/2005	10%	806.000
	50%	1.240.000
	70%	1.860.000
	100%	2.170.000
Agosto 26/2005	10%	4.960.000
	50%	5.580.000
	70%	8.680.000
	100%	9.920.000
Agosto 30/2005	10%	13.950.000
	50%	15.624.000
	70%	18.414.000
	100%	21.204.000
Septiembre 3/2005	10%	34.020.000
	50%	39.690.000
	70%	51.030.000
	100%	79.380.000
Septiembre 6/2005	10%	94.500.000
	50%	113.400.000
	70%	126.000.000
	100%	151.200.000

Se observa que la biomasa aumenta de manera proporcional a la concentración de agua residual presente en el medio, posiblemente debido al aporte de nutrientes y en especial de nitritos procedentes del agua residual que estimulan el crecimiento de *T.denitrificans*, lo que explicaría el mayor número de UFC/ml en el montaje con 100% de agua residual dentro de la preparación del medio selectivo.(Ver figura 19)



Figura 19. Adaptación de *T. denitrificans* a las condiciones del efluente del RAP

La adaptación de *T.denitrificans* al agua residual del RAP, se evidencia por el aumento en la biomasa para cada uno de los porcentajes de agua residual evaluados a través del tiempo (Ver figura 20).

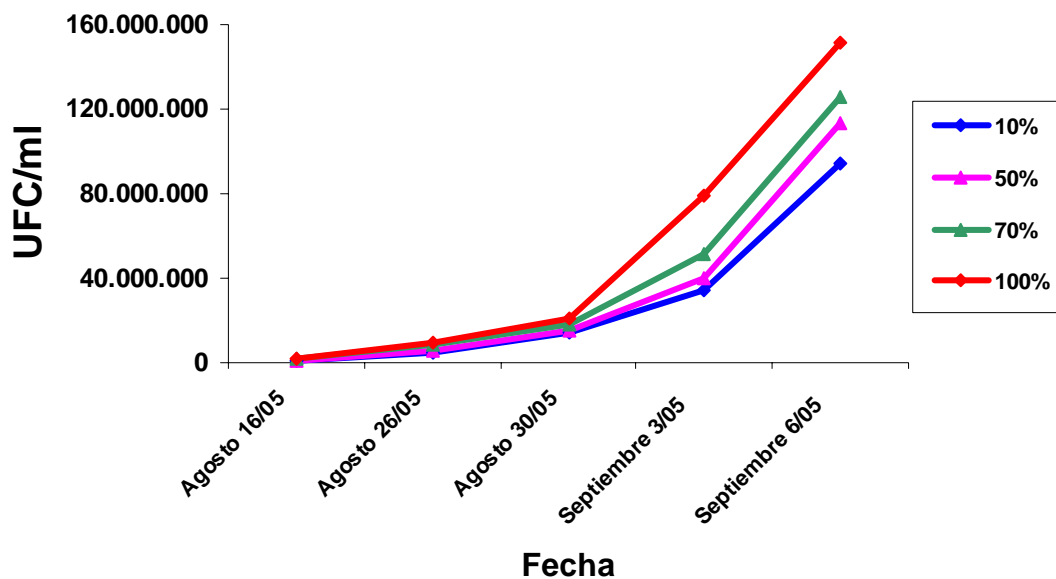
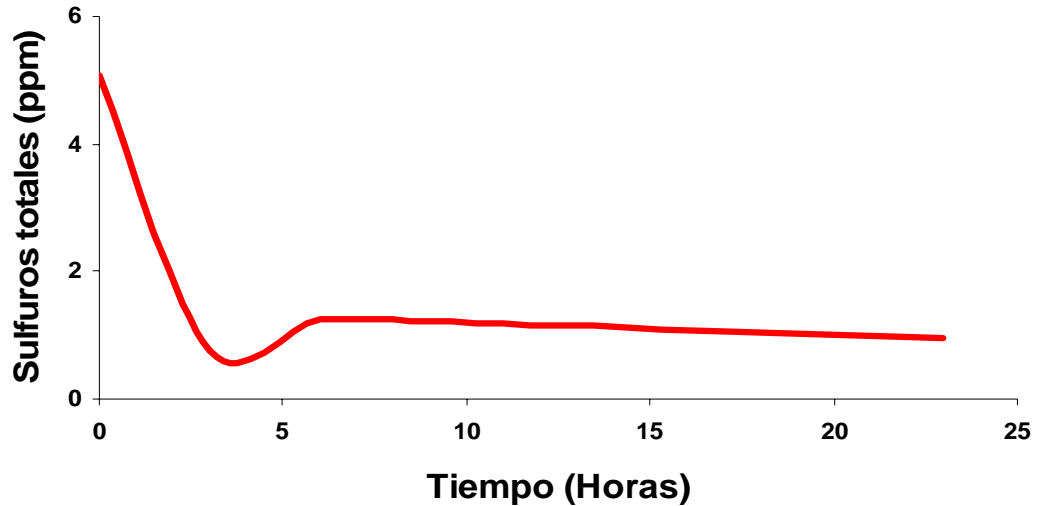


Figura 20. Crecimiento a través del tiempo para cada uno de los porcentajes de agua residual del RAP

**5.5.2 Remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* en agua residual del efluente del RAP.** El análisis de la concentración residual de sulfuros totales versus tiempo en el montaje que contiene inóculo de *T. denitrificans*, muestra un descenso en las primeras 3 horas del experimento, el cual coincide con el resultado obtenido en la curva que relaciona concentración residual de sulfuros totales versus tiempo en medio sintético, debido al desarrollo de la fase exponencial de crecimiento bacteriano. Posteriormente, la concentración se mantuvo constante en el intervalo comprendido entre las 5 y las 15 horas (al igual que la curva en medio sintético). A partir de las 15 horas, la concentración muestra un comportamiento descendente debido al descenso en la concentración afluente al sistema experimental. (Ver figura 21)



**Figura 21. Concentración residual de sulfuros totales del efluente del RAP versus tiempo**

Como se puede observar, el comportamiento entre la concentración residual de sulfuros totales versus tiempo en medio sintético y en agua residual, siguen una misma tendencia independiente de la concentración de sulfuros presentes en el medio

El análisis del comportamiento de los datos de la concentración de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans*, con un tiempo de residencia de 3 horas, reporta un valor promedio de 71.72% (Ver tabla 8)

**Tabla 8.** Porcentajes de remoción con tiempo de residencia de 3 horas en agua residual.

[Inicial]	[Final]	% Remoción
5.06	0,54	89,37
3.14	1.00	68,15
3.63	1,10	69,67
2.37	0,95	59,67

Por el contrario, la tendencia de los datos obtenidos para el control, muestra un aumento en la concentración de sulfuros totales, llegando a reportar producciones de sulfuro de hasta un 181% (Ver tabla 9), confirmando la producción de sulfuros que hay en el RAP debido a la presencia de bacterias sulfatorreductoras.

**Tabla 9.** Porcentajes de remoción con tiempo de residencia de 3 horas en agua residual para el control.

[Inicial]	[Final]	% Remoción
5.06	7,25	-43,15
3.14	5,94	-89,17
3.63	7,03	-93,77
2.37	6,65	-181,06

La comparación de las tendencias de los datos de concentración de sulfuros totales entre el montaje del inóculo y el control, demuestra la capacidad de remoción de *T. denitrificans* en agua residual.

## 5.6 ADAPTACION, CRECIMIENTO Y REMOCION DE SULFUROS TOTALES DE *T. denitrificans* EN AGUA RESIDUAL DEL EFLUENTE DEL RAP COMO SUSTRATO Y GUADUA COMO MEDIO DE SOPORTE.

**5.6.1 Formación de biopelícula de *T. denitrificans* sobre guadua como medio de soporte.** Los resultados obtenidos del crecimiento de *T. denitrificans* sobre guadua como medio de soporte, muestran un incremento de UFC/ml\*cm<sup>2</sup> a través el tiempo, permitiendo establecer una relación proporcional entre el área superficial de la guadua y la formación de biopelícula con *T. denitrificans* (Ver figura 22)



Figura 22. Sección de guadua con formación de biopelícula de *Thiobacillus denitrificans*

El incremento porcentual de la formación de biopelícula (UFC/ml\*cm<sup>2</sup>) entre el valor del recuento del segundo dato, con respecto al inicial es de 26.48% en 4 días, y el recuento del tercer dato con respecto al segundo, reporta un incremento porcentual de 79% en 3 días, tal como se observa en la tabla 10. Los resultados anteriores son un claro indicio de la adaptación de *T. denitrificans* a la guadua como soporte, hecho que permite la formación de biopelícula.

**Tabla 10.** Evaluación de la formación de biopelícula de *T. denitrificans* sobre guadua como soporte.

Fecha	UFC/ml	Área superficial	UFC/ml*cm <sup>2</sup>
Agosto 30/05	180000	18,8	9574
Septiembre 3/05	250000	19,2	13020
Septiembre 6/05	1100000	17,6	62500

**5.6.2 Remoción de sulfuros totales por parte de *T. denitrificans* en el efluente del RAP utilizando guadua como medio de soporte.** Los promedios de los porcentajes de remoción de sulfuros totales obtenidos con la biopelícula de *T. denitrificans* sobre la guadua con el tiempo de residencia de 1 y 2 horas se muestran a continuación en la tabla 11.

**Tabla 11.** Porcentajes de remoción de sulfuros totales en el efluente del RAP por parte de *T. denitrificans* sobre guadua como medio de soporte.

Tiempo de Residencia	[Inicial] (ppm)	[Final] (ppm)	% Remoción
1 Hora	3,29	0,28	92,38
	1,67	1,49	10,72
	1,22	0,02	98,36
2 Horas	2,71	0,34	87,29
	2,71	0,22	99,26
	1,07	0,08	92,53

La mayor eficiencia de remoción fue obtenida con un tiempo de retención hidráulico de 2 horas (99,26%) para concentraciones de entrada de 2,707 ppm. El menor porcentaje de eficiencia obtenido (10,72%) corresponde a una medición realizada a las 12 del mediodía, horario en que se lleva a cabo el lavado en la Universidad, produciendo

deficiencia en la remoción debidas al vertimiento de tensoactivos, sin embargo, se obtuvieron remociones por encima del 90% para concentraciones de entrada de 3,729 ppm con tiempo de residencia de 1 hora.

La presencia de un medio de soporte (guadua) mejoró notablemente la eficiencia de remoción de sulfuros totales en el efluente del RAP (superiores al 99%). Por otro lado no se presentaron disminuciones en la eficiencia de remoción de sulfuros en las últimas horas de experimentación, debidas al arrastre del inóculo de *T. denitrificans* durante la toma de muestras.

## 6. CONCLUSIONES

El análisis estadístico de las concentraciones de sulfuros totales en el RAP de la UPB reporta concentraciones indeseables (por encima de 1 ppm). Las mayores concentraciones se presentan en horas de la mañana con valores de 3 ppm.

En la caracterización biológica del efluente del RAP de la UPB se identificaron especies bacterianas como: *Kluyvera cryocrescens*, *Alcaligenes spp*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella ozaenae*, y especies del género *Flavobacterium*, las cuales presentan una amplia distribución en cuerpos de agua contaminados y en PTAR'S, debido al alto contenido de materia orgánica.

Se consiguió aislar una cepa de *Thiobacillus denitrificans* procedente del efluente de un campo de extracción minera ubicado en Vetas, Santander. (Mina Reina de Oro).

La adaptación de *Thiobacillus denitrificans* a las condiciones del RAP, se verificó por el incremento en la población bacteriana de los montajes en los que se varió los porcentajes de agua residual dentro de la preparación del medio selectivo, siendo mayor el recuento bacteriano en el montaje que contiene 100% de agua residual, mostrando viabilidad para su aplicación en biofiltros a flujo continuo, utilizando como sustrato agua residual.

Es posible metabolizar un 99% de sulfuros totales del agua residual del RAP de la UPB utilizando *Thiobacillus denitrificans* y guadua como medio de soporte, con tiempo de residencia de 2 horas en condiciones de laboratorio.

El análisis gráfico de las remociones de sulfuros totales en medio sintético por parte de *Thiobacillus denitrificans* muestra que la degradación de sulfuros corresponde a una cinética de primer orden con constante de  $0,2392 \text{ h}^{-1}$  y la mayor remoción se presenta durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano.

La curva de crecimiento del *Thiobacillus denitrificans* en medio selectivo, difiere notablemente de la curva de crecimiento en solución de sulfuro. El crecimiento en presencia de sulfuros fue mas rápido, debido principalmente a los compuestos azufrados disponibles como fuente de energía, demostrando la viabilidad de la bacteria en estudio, para la remoción de sulfuros en medio acuoso.

La introducción de solución de sulfuro, durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano de *Thiobacillus denitrificans*, tiene como resultado la prolongación de dicha fase, en la cual no hay un incremento neto de la masa bacteriana pero si existe remoción por parte del inóculo, mostrando viabilidad para su utilización en reactores a flujo continuo con presencia de sulfuro como fuente de energía.

La cepa de *Thiobacillus denitrificans* mostró desarrollo de biopelícula estable sobre la guadua, mejorando el proceso de remoción de sulfuros totales del agua residual del RAP de la UPB.

## 7. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la formación de biopelícula en función de la forma de la guadua como medio de soporte, diferente a la usada en esta investigación (canaletas).

Se recomienda utilizar otro tipo de soporte, que permita evaluar la formación de biopelícula y remoción de H<sub>2</sub>S a nivel de laboratorio usando el efluente del RAP de la UPB, con el fin de determinar si existe un incremento en la eficiencia de *Thiobacillus denitrificans* en función del medio de soporte seleccionado.

Se recomienda determinar la concentración de subproductos (sulfatos, azufre elemental, etc.) del metabolismo de *Thiobacillus denitrificans* en el efluente del RAP, para definir la vía metabólica usada por el microorganismo y optimizar las condiciones para el diseño del biofiltro.

Inmovilizar la cepa de *T.denitrificans* sobre el medio de soporte (guadua) para estabilizar la biopelícula mejorando su eficiencia.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE, Enrique. Efectos físicos del envenenamiento por ácido sulfhídrico. [En línea]. Versión en HTML. México, Enero de 2000. Disponible en Internet: <http://www.estrucplan.com.ar/Articulos/sulfhidrico.asp>

ANDRADES BALAO, José *et al.* Compuestos de azufre en los sistemas de saneamiento. En: Tecnología del agua. No. 193 (oct.1999); p. 71-86.

AROCA, German; ARANCIBIA, Fernando y OYARZÚN, Patricio. Tratamiento de aire contaminado con H<sub>2</sub>S utilizando un biofiltro de turba inoculado con *Thiobacillus thioparus*. [En línea]. Versión para Microsoft Word. Universidad Católica de Valparaíso. Chile, 2001. Disponible en Internet: [http://www.inf.ucv.cl/~usr\\_fac/revista/Biofiltro.doc](http://www.inf.ucv.cl/~usr_fac/revista/Biofiltro.doc)

AWWA, APHA. Métodos normalizados: para el análisis de aguas potables y residuales. España: Ediciones Díaz de Santos S.A , 1992 ; p. 9-132- 9-144.

AWWA, APHA. Standard Methods: For the examination of water and waste water. USA: Lenore S, 1998; p. 4-162 – 4-168.

BALDASANO, Juan *et al.* Control de olores debido a la formación de H<sub>2</sub>S en las EDARS. En : Tecnología del agua. No 217 (oct 2001) ; p.22-28.

BARTHA, Richard y ATLAS, Ronald. Ecología microbiana y Microbiología Ambiental. 4a. ed. España: Addison Wesley., 1998. p.420,425,445,601.

CASTAÑO, Juan *et al.* Limitación y posibilidades del tratamiento de aguas residuales mediante la utilización de guadua. [Monografía en CD room]. Versión para V congreso internacional del medio ambiente y desarrollo sostenible. Pereira, Noviembre 2002.

CHÁVEZ, Carlos *et al.* Biofiltración de ácido sulfhídrico ( H<sub>2</sub>S ) utilizando bagazo de caña de azúcar y piedra pómez como material de soporte. En : Ingeniería y Competitividad. . No 2 (May 2004) ; p. 7-15.

CHUNG, Yin *et al.* Comparison of autotrophic and mixotrophic biofilters for H<sub>2</sub>S removal [En línea]. Versión en HTML. Journal of environmental engineering. USA, 1998. Disponible en Internet: <http://search.epnet.com/direct.asp?an=412163&db=ath>

CONIL, Philippe. El control de olores en las plantas anaerobias de tratamiento de aguas residuales: estudios de casos.[En línea]. Versión para Microsoft Word. Red Internacional Biotec. Cali, 2003. Disponible en Internet: <http://www.biotec.net/publicaciones/conil9.doc>.

DEPARTAMENTO DE SANIDAD DEL ESTADO DE NUEVA YORK. Manual de tratamiento de aguas negras. México: Limusa Noriega, 1998. p. 15.

DIAZ, Erika. Determinación de la calidad y potencialidad del lodo del reactor anaerobio de flujo a pistón (RAP) de la Universidad Pontificia Bolivariana Bucaramanga, 2002; p.19. Trabajo de grado (Ingeniera Sanitaria y Ambiental). Universidad Tesis de grado. Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga. Facultad de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.

DUARTE, Cesar. Evaluacion del proceso de bioxidacion de H<sub>2</sub>S presente en el efluente de una reactor UASB para el control de olores. [En línea]. Versión en HTML. Bucaramanga, Octubre de 2000. Disponible en Internet: <http://www.geocities.com/bioxidacion/>

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. [Base de datos en línea]. Versión en HTML. Braunschweig (Germany), 2000. Disponible en Internet: <http://www.dsmz.de/media/med832.htm>

GARNER, Loren. Case studies in odor and H<sub>2</sub>S control using biological systems. [En línea]. Versión en PDF. Bio-Reaction Industries. Tualatín, 2002. Disponible en Internet: <http://www.bioreaction.com/papers/papers/70482.pdf>

HERNER, Brian y SHAREEFDEEN, Z. Expansion of the performance of BIOREM's Biosorbens<sup>TM</sup> Biofilter Media operating at neutral pH in the removal of Hydrogen Sulphide & reduced sulphur compounds from contaminated air streams. [En línea]. Versión en PDF. BIOREM Technologies Inc. Canadá, 2002. Disponible en Internet: <http://www.biorem.biz/resources/H2SDataReport-NuetralpH.pdf>.

HUMBERT, Francisco *et al.* Nitrato cálcico para la eliminación de olores en la depuradora de Lloret de Mar. En: Tecnología del agua. España. No 225 (jun 2002); p. 44-49.

JAMES, S *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkilms, 2000. v. 3, p.1852-1858.

JONES, Kim. Evaluation of Sulfur Toxicity and Media Capacity for H<sub>2</sub>S Removal in Biofilters Packed with Both Natural and Commercial Media. [En línea]. Versión en PDF. Kingsville (Texas), 2003. Disponible en Internet: <http://www.bioreaction.com/papers/papers/69751.pdf>

KANDEL, Judith. General Microbiology. [En línea]. Versión en HTML. USA, 2003. Disponible en Internet: <http://biology.fullerton.edu/biol302/302labf99/quant.html>

KONEMAN, Elmer *et al.* Diagnóstico microbiológico. Bogotá : Panamericana. 1983;p. 157,178,184,185.

MADIGAN, Michael; PARKER, Jack y MARTINKO, Jhon. Brock Biología De Los Microorganismos. España: Prentice Hall .,1998. p.168,491-494,500,526,540,638,661-664.

MANNAN, Stanley. Environmental Chemistry. 7<sup>th</sup> ed. USA: Lewis Publishers., 2000. p. 197.

NAVIA, Rodrigo y VIDAL, Gladys. Tratamiento del biogas generado por la digestión anaerobia de efluentes: sustratos orgánicos con elevado contenido en sulfato. En : Tecnología del agua. No 202 (ene 2002) ; p. 64-70.

OROZCO, Jacinto y SOTO, José Ricardo. Evaluación del sistema de Tratamiento de Gases de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga. Bucaramanga, 2000; p.73- 77. Trabajo de grado (Ingeniero Civil). Universidad Tesis de grado. Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga. Facultad de Ingeniería Civil.

RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las Aguas.España: Acribia S.A., 1987. p. 200-201, 229.

ROMERO ROJAS, Jairo. Tratamiento de Aguas Residuales: Teoría y principios de diseño. Santa Fé de Bogotá: Escuela Colombiana de Ingeniería., 1999. p. 28,29.

SAWYER, Clair and Mc CARTY, Perry. Chemistry for Environmental Engineering. 3<sup>th</sup> ed. USA: Mc Graw –Hill., 1978. p. 476-481.

PARK, Jeong-Jin *et al.* Treatment of hydrogen sulfide in lab-scale biofilter. Pohang University. Japón, 1998.

STRAYHORN, Ellen. Selection, operation & start-up of odor control biofilter systems at the city of san angelo waste water treatment plant. [En línea]. Versión en PDF. Freese and Nichols Inc. Texas, 2003. Disponible en Internet: [http://www.bioway.com/tech\\_reviews/San\\_Angelo\\_Texas.pdf](http://www.bioway.com/tech_reviews/San_Angelo_Texas.pdf).

UNDA OPAZO, Francisco. Ingeniería Sanitaria Aplicada a Saneamiento en Salud Pública. México: Limusa S.A., 1993. p. 94,128,188-192,270,271.

# **ANEXOS**

## ANEXO A

### MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO PARA *Thiobacillus denitrificans*.

#### Solution A:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0	g
KNO <sub>3</sub>	2.0	g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.8	g
Trace element solution SL-4 (see medium 14)	2.0	ml
Distilled water	940.0	ml

Adjust pH to 7.0 with NaOH.

#### Solution B:

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	5.0	g
Distilled water	40.0	ml

#### Solution C:

NaHCO <sub>3</sub>	1.0	g
Distilled water	20.0	ml

#### Solution D:

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2.0	mg
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.1 N)	1.0	ml

Solutions A, B and D are sterilized separately by autoclaving at 121°C for 15 min. Solution C is sterilized by filtration or by autoclaving in a tightly closed vessel under an atmosphere of CO<sub>2</sub>.

After sterilization combine the four solutions and distribute as required under nitrogen atmosphere.

For solid medium add 15 g agar to solution A.<sup>52</sup>

---

<sup>52</sup> DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. [Base de datos en línea]. Versión en HTML. Braunschweig (Germany), 2000. Disponible en Internet: <http://www.dsmz.de/media/med113.htm>

## ANEXO B

### PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE NITRATOS Y NITRITOS



Inóculo de *T. denitrificans*  
(Inocular con asa)



Caldo Nitrato



Incubar a 35 °C (18 – 24 horas)

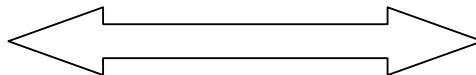


Reactivo A  
(1 ml)

Reactivo B  
(1 ml)



Caldo Nitrato con Inóculo ya incubado



Desarrollo de color rojo  
a los 30 segundos



**PRUEBA POSITIVA**

Ausencia de color



Adición de Polvo de Zinc



Desarrollo de color rojo



**PRUEBA NEGATIVA**

\***Caldo Nitrato:** Extracto de carne (3,0 g), peptona (5,0 g), KNO<sub>3</sub> (1,0 g), Agar libre de nitritos (12,0 g), agua destilada (1000 ml).

\***Reactivo A:** α-naftilamina (5,0 g), ácido acético 5N al 30% (1000 ml).

\***Reactivo B:** Ácido sulfanílico (8,0 g), ácido acético 5N al 30% (1000 ml).

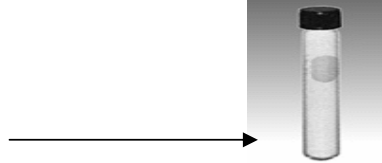
## ANEXO C

### PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE AZÚCARES

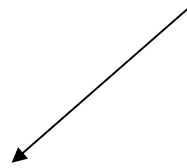
Se hizo por separado para cada azúcar en un tubo estéril:



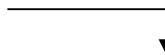
Cepa de *T. denitrificans*



Dilución de bacteria en agua destilada (0,1 ml)



Emulsión para fermentación  
de carbohidratos (3 ml)



Azúcar ( 0.5 ml)



Lactosa
Maltosa
Ribosa
Glucosa
Sorbitol
Sacarosa
Manitol
Fructosa
Xilosa
Arabinosa
Manosa
Melibiosa
Ramosa
Galactosa

La prueba es negativa cuando no se observa ningún cambio en el medio (permanece rosado).

## ANEXO D

### PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA LA PRUEBA DE CITRATO



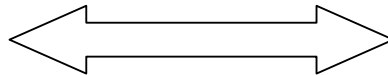
Inóculo de *T. denitrificans*  
(Tomar una colonia bien aislada  
de la superficie e inocular en una  
sola estría en el pico del agar)



Agar citrato (Inclinado)



Incubar a 35 °C (24 – 48 horas)



Desarrollo de color azul o  
formación de colonias



PRUEBA POSITIVA

Ausencia de color azul y  
ausencia de colonias



PRUEBA NEGATIVA

**\*Agar citrato:**

Fosfato diácido de amonio	1,00 g
Fosfato dipotásico	1,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Citrato de sodio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Agar	15,00 g
Azul de bromotinol	0,08 g
Agua destilada	1,00 l

## ANEXO E

### PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA LA PRUEBA DE MOTILIDAD



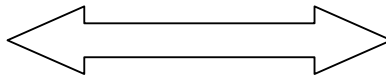
Inóculo de *T. denitrificans*  
(Sembrar por punción profunda  
con asa recta)



Agar para detectar movilidad



Incubar a 35 °C (24 horas)



Turbidez del medio alrededor  
de la punción de la siembra



PRUEBA POSITIVA

Ausencia de turbidez del medio  
alrededor de la punción de la siembra



PRUEBA NEGATIVA

**\*Agar para detectar movilidad:**

Extracto de carne	3g
Peptona	10g
Cloruro de sodio	5g
Agar	4g
Agua destilada	1 litro

## ANEXO F

### METODOLOGÍA DE MC FARLAND PARA LA EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO

La metodología de Mc Farland<sup>21</sup> relaciona la absorbancia de una solución con la concentración bacteriana por mililitro presente en ella.

Materiales:

- 10 tubos tapa rosca (16 x 150 mm)
- Solución de Cloruro de Bario al 1%
- Solución de ácido sulfúrico al 1%

Procedimiento:

Medir y servir en cada tubo los volúmenes que aparecen a continuación

<b>Tubo</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> (ml)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ml)</b>	<b>Concentración bacteriana/ml (x10<sup>8</sup>)</b>
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1	9	30

<sup>21</sup> KANDEL, Judith. General Microbiology. [En línea]. Versión en HTML. USA, 2003. Disponible en Internet: <http://biology.fullerton.edu/biol302/302labf99/quant.html>

## ANEXO G

### MEDICIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE SULFUROS TOTALES EN EL EFLUENTE DEL RAP DURANTE JORNADA NORMAL

Día	Hora	Concentración sulfuros totales (ppm)
Agosto 02/05	9:00 a.m.	1,043
	10:00 a.m.	1,703
	11:00 a.m.	0,9
	12:00 p.m.	0,484
	1:00 p.m.	0,552
	2:00 p.m.	0,942
	3:00 p.m.	1,215
Agosto 04/05	9:00 a.m.	1,602
	10:00 a.m.	0,995
	11:00 a.m.	1,386
	12:00 p.m.	1,081
	1:00 p.m.	1,028
	2:00 p.m.	0,758
	3:00 p.m.	0,746
Agosto 08/ 05	9:00 a.m.	1,985
	10:00 a.m.	2,206
	11:00 a.m.	1,031
	12:00 p.m.	3,903
	1:00 p.m.	4,134
	2:00 p.m.	4,905
	3:00 p.m.	4,987
Agosto 10/ 05	9:00 a.m.	5,386
	10:00 a.m.	0,898
	11:00 a.m.	1,176
	12:00 p.m.	0,972
	1:00 p.m.	1,035
	2:00 p.m.	1,758
	3:00 p.m.	1,991
Agosto 12 /05	9:00 a.m.	4,877
	10:00 a.m.	3,855
	11:00 a.m.	2,412
	12:00 p.m.	4,405
	1:00 p.m.	1,991
	2:00 p.m.	2,168
	3:00 p.m.	2,042